

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AGRICOLTURA, LE
FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA**

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA in

VIVAISTICA E CONSERVEZIONE DELLA BIODIVERSITÀ FORESTALE

XXVII Ciclo

**STUDIO DELL'INFLUENZA DI LAMPADE LED DI NUOVA
GENERAZIONE SULLA CRESCITA E IL METABOLISMO DI
ALCUNE SPECIE FORESTALI (*Fagus sylvatica* L., *Quercus ilex* L.,
Quercus suber L.)**

AGR/05

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Chiara Marianello

Firma

Coordinatore del corso

Prof. Bartolomeo Schirone

Firma

Tutore

Prof.ssa Rosanna Bellarosa

Firma

Co-tutore

Dott.ssa Stefania Astolfi

Firma

09 Luglio 2015

Indice

1. Introduzione	1
1.1 Concetto di biodiversità e strategie per la sua conservazione	1
1.2 Le foreste italiane	10
1.3 Vivaistica forestale	12
1.4 Pre-coltivazione e illuminazione a LED	15
1.5 Il progetto di ricerca europeo Regen-Forest	19
<i>1.5.1 Camere di crescita</i>	<i>20</i>
<i>1.5.2 Il Prototipo</i>	<i>20</i>
<i>1.5.3 I contenitori, il terreno Jiffy e il terreno DAFNE</i>	<i>22</i>
<i>1.5.4 Serra e impianto</i>	<i>23</i>
1.6 Le specie botaniche oggetto di studio	24
<i>1.6.1 Faggio</i>	<i>24</i>
<i>1.6.2 Leccio</i>	<i>28</i>
<i>1.6.3 Sughera</i>	<i>30</i>
1.7 La fotosintesi clorofilliana	33
1.8 La nutrizione delle piante: l’Azoto	39
1.9 La perossidazione lipidica	45
2. Scopo della Tesi	47
3. Materiali e Metodi	50
3.1 I semi	50
<i>3.1.1 Faggio</i>	<i>50</i>
<i>3.1.2 Leccio</i>	<i>51</i>
<i>3.1.3 Sughera</i>	<i>52</i>
3.2 Contenitori e substrato di crescita	52
3.3 Lampade utilizzate e condizioni di crescita	55
3.4 Il Prototipo	60

3.5 Estrazione degli enzimi	60
3.6 Determinazione del contenuto di clorofilla totale e carotenoidi nelle foglie	61
3.7 Determinazione quantitativa delle proteine	62
3.8 Determinazione dell'attività dell'enzima NR	62
3.9 Determinazione dell'attività dell'enzima GS	63
3.10 Determinazione del contenuto di MDA	64
4. Risultati e Discussione	65
4.1 Faggio	68
4.1.1 Esperimenti con terreno Jiffy	68
<u>4.1.1.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita</u>	68
<u>4.1.1.2 Prototipo</u>	73
<u>4.1.1.3 Serra</u>	73
<u>4.1.1.4 Trapianto in campo</u>	73
4.1.1.5 Discussione	79
4.1.2 Esperimenti con terreno DAFNE	82
<u>4.1.2.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita</u>	82
<u>4.1.2.2 Prototipo</u>	88
4.1.2.3 Discussione	91
4.1.3 Differenze di crescita tra il terreno Jiffy e il terreno DAFNE	93
4.1.4 Conclusioni	99
4.2 Leccio	101
4.2.1 Esperimenti con terreno Jiffy	101
<u>4.2.1.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita</u>	101
<u>4.2.1.2 Prototipo</u>	106
<u>4.2.1.3 Serra</u>	109
<u>4.2.1.4 Trapianto in campo</u>	114
4.2.1.5 Discussione	120
4.2.2 Esperimenti con terreno DAFNE	126

<u>4.2.2.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita</u>	126
<u>4.2.2.2 Prototipo</u>	132
4.2.2.3 Discussione	135
4.2.3 Differenze di crescita tra il terreno Jiffy e il terreno DAFNE	138
4.2.4 Conclusioni	146
4.3 Sughera	148
4.3.1 Esperimenti con terreno Jiffy	148
<u>4.3.1.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita</u>	148
<u>4.3.1.2 Prototipo</u>	153
<u>4.3.1.3 Serra</u>	156
4.3.1.4 Discussione	156
4.3.2 Esperimenti con terreno DAFNE	159
<u>4.3.2.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita</u>	159
<u>4.3.2.2 Prototipo</u>	165
4.3.2.3 Discussione	168
4.3.3 Differenze di crescita tra il terreno Jiffy e il terreno DAFNE	171
4.3.4 Conclusioni	179
5. Conclusioni	180
6. Bibliografia	183
Sitografia	203
Abbreviazioni	204

Riassunto

Obiettivo principale della vivaistica forestale è la produzione di piantine che siano in grado di offrire maggiori garanzie d'attecchimento, di adattamento e di rapido accrescimento da utilizzare negli imboschimenti protettivi e produttivi al fine di ridurre la pressione antropica sulle foreste naturali. Per ottenere un esito positivo del restauro ambientale e del rimboschimento forestale, è necessario produrre piantine di alta qualità per garantire il successo degli interventi forestali eseguiti.

La fase di pre-coltivazione (recentemente sperimentata anche nel settore forestale) prevede la produzione sostenibile di piantine forestali (minor uso di risorse quali acqua, energia, fertilizzanti, torba, pesticidi), utilizzando mini-contenitori alveolari, in camere di crescita dotate di luci artificiali e per un periodo piuttosto breve (30-40 giorni) ma sufficiente a garantire un'ottima germinabilità dei semi e il successivo sviluppo delle specie coltivate.

Generalmente, nelle camere di crescita sono utilizzate luci fluorescenti. Recentemente, luci LED sono state utilizzate grazie alla possibilità di definire specifici spettri luminosi soddisfacendo le esigenze di crescita della pianta.

L'obiettivo della ricerca, sviluppata nell'ambito del progetto europeo Regen-Forest, è stato quello di stabilire se i LED possano essere utilizzati nella fase di pre-coltivazione di specie forestali e di valutare la risposta delle piante una volta trasferite nell'ambiente naturale (serra e, successivamente, pieno campo). Sono state analizzate tre specie forestali: il faggio (*Fagus sylvatica* L.), il leccio (*Quercus ilex* L.) e la sughera (*Quercus suber* L.), che sono state allevate sotto quattro diversi spettri LED e il loro comportamento è stato confrontato con quello delle piantine cresciute sotto luci fluorescenti.

In tutte le fasi sperimentali (camera di crescita, serra e pieno campo) sono stati valutati alcuni componenti biochimici coinvolti nella di crescita delle piante (contenuto di clorofilla, pigmenti accessori e proteine), le variazioni dell'attività di enzimi coinvolti nel meccanismo di assimilazione dell'azoto (nitrato reductasi, NR, e glutammina sintetasi, GS) e, infine, l'effetto prodotto dai diversi tipi di illuminazione sul livello di perossidazione dei lipidi, utilizzando come indice la concentrazione di malondialdeide (MDA).

Inoltre, durante il periodo di ricerca, è stata sviluppata e costruita una camera di crescita sperimentale, chiamata Prototipo Regen-Forest, che permette di avere un'alta produzione di piantine forestali con un basso consumo energetico. Il Prototipo è caratterizzato da 10 ripiani in continuo movimento rotatorio esposti all'illuminazione prodotta da solo 3 lampade LED. Per valutare la risposta delle tre specie studiate al nuovo metodo di allevamento rispetto a quello tradizionale, sono state eseguite le medesime indagini riguardanti il contenuto di clorofilla, i pigmenti accessori e le proteine; nonché le variazioni dell'attività degli enzimi NR e GS e la concentrazione di MDA, come indice di stress ossidativo.

I risultati della ricerca hanno evidenziato che i LED sono una valida alternativa alle luci fluorescenti nella fase di pre-coltivazione determinando una buona crescita delle piante, sia a livello fisiologico sia metabolico.

Nel successivo passaggio in serra e in pieno campo, le specie forestali allevate con le luci LED hanno mostrato una buona ripresa vegetativa, indicando quindi che le condizioni adottate durante la fase di pre-coltivazione sono state idonee. Le lampade LED hanno mostrato la loro efficacia nel sostenere lo sviluppo delle piante in ambiente artificiale e quindi sono un'ottima alternativa alle lampade fluorescenti.

Una loro più diffusa applicazione consentirebbe di ridurre notevolmente i costi energetici nella fase di pre-coltivazione grazie alle loro particolari caratteristiche legate soprattutto al basso consumo energetico, ad un alto numero di ore di funzionamento e ad una bassa emissione di calore.

Dai dati ottenuti, il Prototipo può essere considerato un'innovazione tecnologica promettente per un'efficace produzione di materiale forestale permettendo di ottenere un risparmio energetico del 75% rispetto a una camera di crescita a fluorescenza. Inoltre, la produzione di un elevato numero di piantine di buona qualità e l'elevata meccanizzazione fanno del Prototipo una tecnologia adatta per il miglioramento qualitativo e quantitativo della produzione vivaistica forestale.

Abstract

Forest nursery aims to a large production of seedlings with good growth capacity to be used in environment restoration. To obtain a successful outcome of the environmental restoration and forestry reforestation, it is necessary to produce high quality seedlings to ensure the success of forestry plantations.

The pre-cultivation phase provides a sustainable production of forest plants (less use of resources such as water, energy, fertilizers, peat, pesticides) in alveolar containers into growth chambers under artificial lights for a short period (30-40 days) sufficient to guarantee a high seed germination and development of the species.

Growth chambers are generally equipped with fluorescent lights. Recently, LED lights have been introduced as an alternative lamp because it is possible to set up the specific wavelength, according to plants growth requirements, but studies on the development of forest trees under LEDs system are very limited.

The objective of the research, developed within the European project Regen-Forest, was to determine if LEDs can be used as a light source in the pre-cultivation of forest trees and to assess the response of plants when transferred in the greenhouse and then in the open field.

We analyzed three forest species: *Fagus sylvatica* L., *Quercus ilex* L. and *Quercus Suber* L. grown under four different LED spectra and compared with those grown under fluorescent lamps.

In all experimental phases (growth chamber, greenhouse and open field) we evaluated some growth parameters (chlorophyll content, carotenoid content and protein content), changes in extractable activities of key enzymes involved in nitrogen assimilation pathways (nitrate reductase, NR, and glutamine synthetase. GS) and, finally, we studied the changes in lipid peroxidation level in leaves, measured as the content of MDA (malondialdehyde), a widely used stress index of plant membranes.

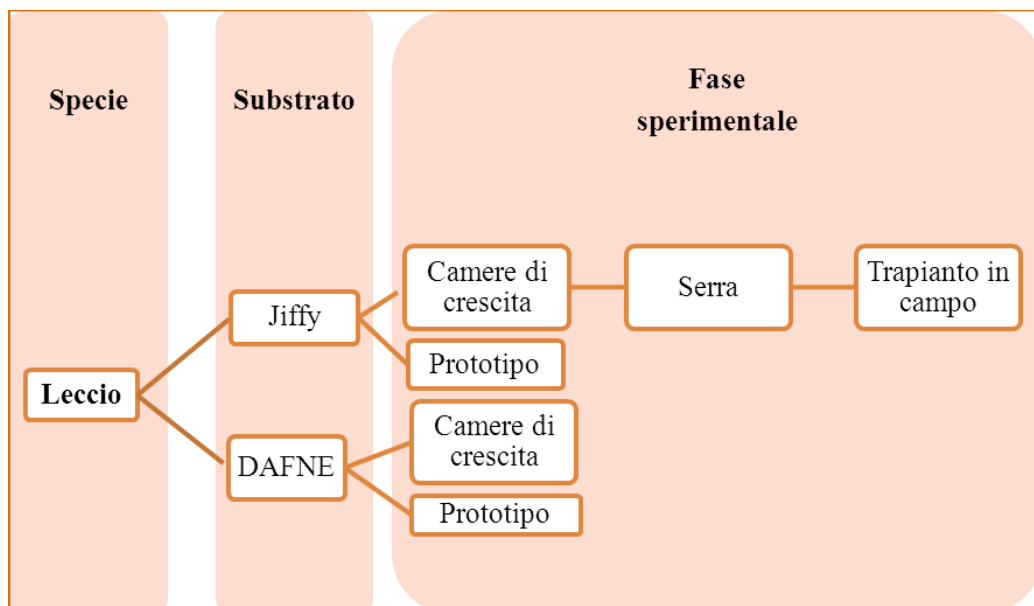
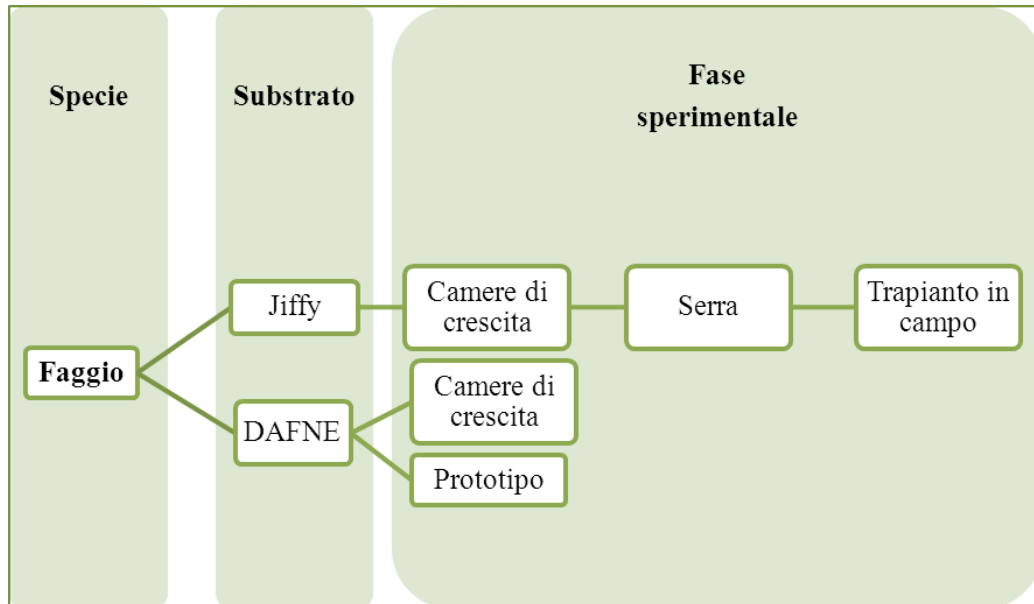
During the research period, it has developed an experimental growth chamber, called Regen-Forest Prototype, which allows to obtain a high forest seedlings production with a low energy consumption. The Prototype made by 10 shelves in continuous rotational movement and exposed to 3 LEDs light. To evaluate the effects of the growth of forest seedlings in the Prototype, compared to a traditional growth

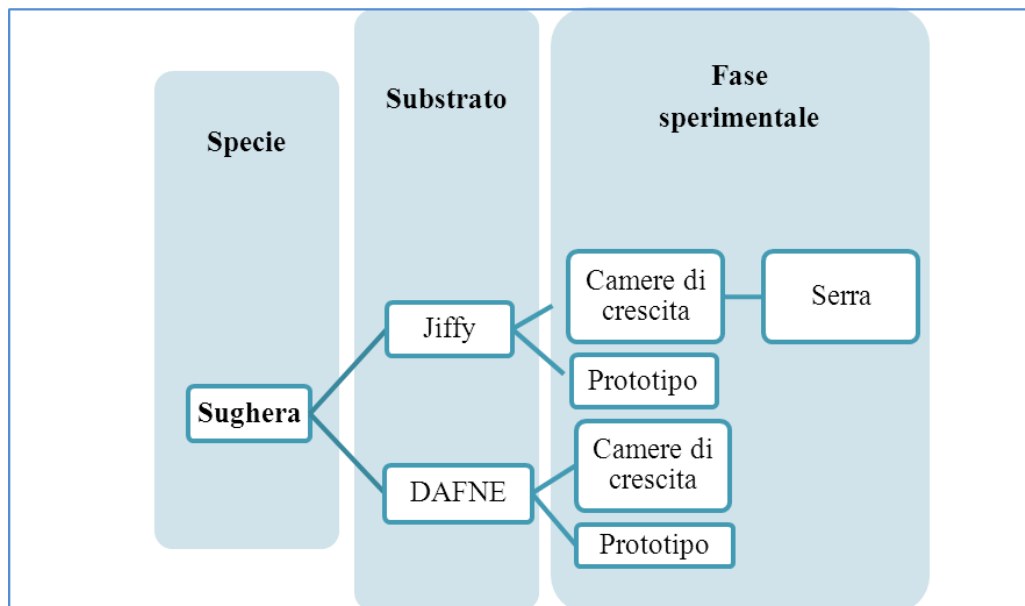
chamber, we evaluated the same growth parameters (chlorophyll content, carotenoid content and protein content), changes in the activity of enzymes NR and GS and concentration of MDA, as an indicator of oxidative stress, on the same tree species (beech, holm oak and cork oak).

The results showed that LEDs are a reliable alternative to fluorescent lights in the pre-cultivation phase improving plant growth. Good results were found when seedlings, grown both under LEDs and under fluorescent lamps, were transplanting in the greenhouse and in open field. This result suggests that the LEDs are a promising alternative to fluorescent lights.

In conclusion, the Prototype performance, in terms of number of plants obtained, energy saving, good quality of seedlings 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.

Schema delle fasi sperimentali





Per ogni fase sperimentale sono state effettuate le seguenti analisi:

1. Contenuto totale di clorofilla;
2. Contenuto di pigmenti accessori;
3. Contenuto totale di proteine;
4. Attività dell'enzima Nitrato Reduttasi;
5. Attività dell'enzima Glutammina Sintetasi;
6. Perossidazione dei lipidi espressa come contenuto di Malondialdeide.

1. Introduzione

1.1 Concetto di biodiversità e nuove strategie per la sua conservazione

Le foreste del nostro pianeta stanno subendo gravissimi danni, causati da fattori abiotici e biotici e da un uso indiscriminato del territorio, che mettono a repentaglio la loro sopravvivenza. Infatti, negli ultimi anni si è assistito a una diminuzione dell'area forestale di circa 13 milioni di ettari all'anno (FAO, 2010) con la conseguente perdita della biodiversità dell'ecosistema, fondamentale per la naturale evoluzione delle specie sia animali che vegetali.

Il termine biodiversità (in inglese "biodiversity") fu utilizzato per la prima volta dallo studioso Rosen (1986) unendo le parole "biological diversity", enunciate da Dasmann (1968), e descrive la varietà di esseri viventi (animali, piante e microrganismi), così come li conosciamo oggi, e i cicli naturali che regolano la vita sul nostro Pianeta. La diversità biologica è frutto dell'evoluzione naturale e, in modo più determinante, dell'azione antropica sull'ecosistema naturale.

Nel 1992 l'Organizzazione delle Nazioni Unite (ONU) organizzò la Conferenza di Rio de Janeiro per valutare lo stato di salute del nostro pianeta stilando il testo della Convenzione per la Diversità Biologica (CBD). La CBD, che il nostro Paese ha sottoscritto nel 1993, descrive come conservare la biodiversità con la progettazione di nuove tecnologie di recupero limitando l'uso di risorse naturali e garantendo un'equa distribuzione dei vantaggi derivanti dalla biodiversità stessa tra i Paesi Sviluppati e quelli in Via di Sviluppo. Inoltre, la CBD ha dato una nuova e definitiva enunciazione del concetto di biodiversità: "L'espressione Diversità Biologica significa la variabilità degli organismi viventi di ogni origine, compresi gli ecosistemi terrestri, marini e altri sistemi acquatici, e i complessi ecologici di cui fanno parte; ciò include la diversità nell'ambito della specie e tra le specie degli ecosistemi".

Introduzione

Nella Convenzione sono inoltre descritti tre livelli di diversità biologica:

- diversità a livello genetico: definisce la variazione genetica della specie e comprende tutte quelle variabilità genetiche sia all'interno di una popolazione che tra popolazioni della stessa specie;
- diversità a livello di specie: riguarda le specie (vegetali, animali, funghi e microrganismi) che si trovano all'interno di un'area, una regione, un continente e sul pianeta;
- diversità a livello di ecosistema: si intende la varietà di specie in ambienti fisici diversi e dei processi di interazione che si stabiliscono tra le specie stesse.

Questi livelli di diversità biologica sono strettamente correlati tra loro secondo un rapporto gerarchico: un'alterazione degli ambienti naturali porterà ad una diminuzione di specie animali e vegetali con conseguenze sulla diversità genetica. Infatti, qualsiasi variazione dell'ambiente, anche se minima, comporta cambiamenti vistosi di composizione all'interno dell'ecosistema.

Fra i fattori abiotici (ossia i fattori fisici, chimici e materiali dell'ambiente) che maggiormente condizionano la sopravvivenza dell'ecosistema, in particolare quello delle foreste, il fattore climatico è sicuramente uno dei più importanti. Il clima, infatti, influenza l'ecosistema forestale e la sua capacità di riprodursi. I cambiamenti climatici che condizionano l'ambiente sono molteplici (Ray, 2008; Gardiner *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2012) ma il fattore che più di ogni altro influisce sulla crescita delle specie arboree e sulla loro distribuzione nel territorio è l'aumento della temperatura (Lindner *et al.*, 2010). Negli ultimi anni è stato riscontrato un aumento della mortalità e un deperimento generale di specie forestali a causa della siccità in Europa (Ciais *et al.*, 2005) e in tutto il resto del pianeta (Allen *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010; Anderegg *et al.*, 2012).

I fattori biotici, definiti anche fattori biologici, sono costituiti dalle componenti viventi dell'ambiente (piante, animali, microrganismi) e rappresentano l'insieme delle relazioni con le altre specie cui l'organismo deve rispondere (come la predazione e il parassitismo), incluse le relazioni con gli altri individui della stessa specie (meccanismi di competizione, riproduzione ecc.). L'impatto che l'uomo ha avuto sui sistemi biotici è estremamente drammatico e peggiora con il trascorrere del tempo (Mooney *et al.*,

Introduzione

2009). Un'indagine mondiale (MA, 2005) ha rivelato una diminuzione del 60% delle risorse offerte dai fattori biotici, con le più gravi perdite verificatesi negli ultimi 50 anni, causate dall'attività umana.

L'influenza antropica è stata talmente forte che è sorta la necessità di dover ridisegnare nuove mappe geografiche con nuovi confini come risultato dell'attività sconsiderata dell'uomo (Alessa e Chapin, 2008).

Come si può ben notare quindi, l'uomo è causa di estinzione di molte altre specie. Infatti, l'intervento dell'uomo a livello forestale, in particolare con deforestazioni, urbanizzazioni selvagge e tecnologie non appropriate, incendi, eccessivo sfruttamento del territorio, inquinamento ambientale, introduzione di specie invasive non autoctone, ha amplificato enormemente questo fenomeno (Butchart *et al.*, 2010).

Le conseguenze di queste forme di erosione della biodiversità saranno certamente molto gravi in quanto le numerose specie animali, vegetali e microbiche sono fonte potenziale di ricchezza (da utilizzare sotto forma di sostanze medicinali, alimenti e altri prodotti di importanza sociale ed economica) e creano, con le loro interazioni, le basi della naturale evoluzione biologica.

La conservazione della biodiversità, essendo una risorsa non rinnovabile, è un imperativo etico perché rappresenta non solo un bene da difendere e da trasmettere alle generazioni future per il miglioramento della qualità della vita, ma anche un bene in se stesso, che ha il diritto alla propria esistenza.

La Convenzione recita inoltre che “ciascuna parte contraente dovrà, in rapporto alle proprie specifiche condizioni e capacità (APAT, 2003):

- Sviluppare strategie, piani o programmi nazionali per la conservazione e l'uso della diversità o adattare a questo obiettivo strategie, piani o programmi esistenti, che riflettano le misure messe a punto in questa Convenzione tra le Parti Contraenti;
- Integrare, quanto più possibile ed in modo appropriato, la conservazione e l'uso della diversità biologica nei piani settoriali ed intersettoriali, nei programmi e nelle politiche.”

L'Italia ha sottoscritto la Convenzione e, di conseguenza, si è impegnata alla costituzione di un Piano nazionale sulla biodiversità. Esso costituisce un atto dovuto in

Introduzione

ottemperanza agli impegni assunti con la sottoscrizione della Convenzione e con quanto stabilito dalla successiva legge 14 febbraio 1994 n.124 (“Ratifica ed esecuzione della convenzione sulla biodiversità, con annessi, fatta a Rio de Janeiro il 15 giugno 1992”). Alla legge ha fatto seguito la deliberazione 16 marzo 1994 del Comitato Interministeriale per la Programmazione Economica con l’*Approvazione delle linee strategiche per l’attuazione della Convenzione di Rio de Janeiro e per la redazione del Piano Nazionale sulla Biodiversità*.

Nel corso del 2010, dichiarato dall’Assemblea Generale delle Nazioni Unite “Anno Internazionale della Biodiversità”, è stata avviata a livello internazionale ed europeo la revisione degli strumenti che consentiranno di arrestare la perdita di biodiversità e dei servizi ecosistemici che da essa derivano nel decennio 2011-2020.

Nell’ottobre 2010 si è tenuta a Nagoya, in Giappone, la decima Conferenza delle Parti della Convenzione per la Diversità Biologica (COP10 della CBD) nel corso della quale è stato adottato un Protocollo sull’Accesso alle Risorse Genetiche e la Giusta ed Equa Condivisione dei Benefici derivanti dal loro Utilizzo (Protocollo ABS), ed è stato rivisto il Piano Strategico per il periodo 2011-2020 con una nuova visione per la biodiversità della CBD, da conseguire per il 2050, e una nuova missione per il 2020, con 5 obiettivi strategici e 20 obiettivi operativi.

Il Piano Strategico ha come scopo fondamentale l’avvio di azioni urgenti e efficaci per contrastare, entro il 2020, la perdita di biodiversità in modo da sostenere gli ecosistemi a recuperare i danni subiti e aiutandoli a fornire i servizi fondamentali per assicurare la varietà della vita sul pianeta. Affinché tutto questo avvenga, bisogna ridurre le pressioni sul sistema Natura, ripristinare i servizi ecosistemici, sfruttare le possibilità biologiche in maniera intelligente e sostenibile, procurare adeguate risorse finanziarie con politiche mirate e, infine, basare l’attività di ricerca sulle basi scientifiche e sul principio di precauzione.

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) la Commissione Europea ha lanciato la nuova Strategia per proteggere e migliorare lo stato della biodiversità in Europa nel prossimo decennio.

Introduzione

La Strategia europea, con la visione per la biodiversità per il 2050 e l'obiettivo chiave per il 2020, prevede il raggiungimento di sei obiettivi prioritari incentrati sui principali fattori responsabili della perdita di biodiversità in modo da ridurre la pressione che questi fattori esercitano sulla natura e sui servizi ecosistemici nell'Unione Europea e a livello globale. Entro il 2050 la biodiversità dell'Unione europea e i servizi ecosistemici da essa offerti saranno protetti, valutati e debitamente ripristinati per il loro valore intrinseco e per il loro fondamentale contributo al benessere umano e alla prosperità economica, onde evitare mutamenti catastrofici legati alla perdita di biodiversità (Commissione Europea 2011).

I sei Obiettivi prioritari sono:

1. Favorire l'attuazione della normativa in materia ambientale;
2. Ripristinare gli ecosistemi, ad esempio utilizzando infrastrutture verdi;
3. Incentivare Agricoltura e 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.

La *Strategia Nazionale per la Biodiversità* (2010) è stata redatta grazie ad una collaborazione e condivisione fra diversi enti istituzionali, sociali e economici che hanno a cuore la conservazione della biodiversità. Grazie alla loro partecipazione, si è giunti a stilare specifici Workshop territoriali presentati nella Conferenza Nazionale per la Biodiversità (Roma, 20-22 maggio 2010). I workshop hanno coinvolto oltre 500 partecipanti, in rappresentanza delle amministrazioni pubbliche, del mondo produttivo, delle associazioni di categoria, delle associazioni ambientaliste, delle tre principali organizzazioni sindacali di livello nazionale, esponenti del mondo accademico e della ricerca così come singoli cittadini.

Questa *Strategia*, nel confermare l'impegno nazionale per il raggiungimento dell'obiettivo di fermare la perdita di biodiversità entro il 2020, si pone come strumento

Introduzione

di integrazione delle esigenze di conservazione e di uso sostenibile della biodiversità nelle politiche nazionali, per il suo valore intrinseco e tangibile e per l'importanza dei servizi (*La Strategia Nazionale per la Biodiversità*, 2010).

Secondo quanto riportato nella *Strategia Nazionale per la Biodiversità*, la Struttura della Strategia è articolata attorno a tre tematiche essenziali:

1. Biodiversità e servizi ecosistemici
2. Biodiversità e cambiamenti climatici
3. Biodiversità e politiche economiche

1. Biodiversità e servizi ecosistemici: La biodiversità, oltre al suo valore intrinseco, è importante anche perché fonte per l'uomo di beni, di risorse e dei cosiddetti servizi ecosistemici, indispensabili per la sopravvivenza e fondamentali per la costruzione dell'economia delle nazioni. Di questi servizi beneficiano, direttamente o indirettamente, tutte le comunità viventi del pianeta. Secondo la definizione data dal Millennium Ecosystem Assessment (MA, 2005) i servizi ecosistemici sono “i benefici multipli forniti dagli ecosistemi al genere umano” e si possono distinguere in quattro grandi categorie: supporto alla vita (es. formazione del suolo), approvvigionamento (es. cibo), regolazione (es. regolazione del clima), culturali (es. estetici o religiosi). In tabella 1 sono riportati i concetti di servizi ecosistemici che si sono poi evoluti nel tempo.

I servizi ecosistemici devono essere gestiti in modo da garantirne la funzionalità nel medio-lungo periodo, in un'ottica di conservazione e valorizzazione, tenendo conto da un lato dei fattori esterni che ne condizionano le dinamiche e, quindi, l'evoluzione nei molteplici possibili scenari futuri (come nel caso delle variazioni climatiche); dall'altro degli effetti collaterali degli interventi proposti e di fatto effettuati nei diversi scenari futuri possibili (per. es. effetti negativi di alcune politiche ambientali per limitare l'emissione dei gas serra).

Introduzione

Tabella 1.1 - Evoluzione del concetto di servizi ecosistemici in studi ecologici, economici e di economia ambientale.

Tipo di studio	Definizione
Ecologico	Le condizioni e i processi attraverso i quali gli ecosistemi naturali e le specie che li compongono sostengono e permettono la vita umana (Daily, 1997). Il set delle funzioni degli ecosistemi che sono utili al genere umano. Molti di questi sono critici per la nostra sopravvivenza mentre altri sono utili a renderla migliore. (Kremen, 2005). I benefici forniti dagli ecosistemi che contribuiscono a rendere la vita umana sia possibile sia piacevole (Diaz <i>et al.</i>, 2006).
Economico	I benefici che le popolazioni umane ricavano direttamente o indirettamente dalle funzioni degli ecosistemi. Questi consistono in una fornitura pressoché continua di materiali, energia e informazioni provenienti dal capitale naturale esistente che, combinati con la manifattura e i servizi del capitale umano, producono il benessere umano. (Costanza <i>et al.</i>, 1997).
Economia ambientale	Servizi ecosistemici fondamentali: servizi che sono essenziali per le funzioni degli ecosistemi e la resilienza come il ciclo dei nutrienti. Questi sono in ultima analisi un prerequisito per l'esistenza umana. I servizi ecosistemici forniti "su richiesta", come ad esempio quelli relativi ai valori ricreazionali, sono formati da valori umani e richiesta e quindi non necessariamente fondamentali per la sopravvivenza delle società umane. (Holmlund e Hammer, 1999). I benefici che la gente ottiene dagli ecosistemi. Questi includono le forniture, le regolazioni e i servizi culturali che hanno un effetto diretto sulle persone e i servizi di supporto necessari a mantenere altri servizi (MA, 2005).

Introduzione

2. Biodiversità e cambiamenti climatici: Le alterazioni climatiche hanno già prodotto impatti sulla biologia, la fenologia, la crescita e la distribuzione delle specie e la composizione degli ecosistemi in Italia, sia sugli ecosistemi naturali sia semi-naturali e agricoli (Maracchi *et al.*, 2005; Thuiller, 2007). Variazioni significative sono state osservate anche su colture importanti e tipiche della nazione, tra cui olivo e vite (Bindi *et al.*, 2006). Man mano che le evidenze scientifiche sull'entità e la natura dei cambiamenti climatici in corso si rafforzano, aumentano anche le preoccupazioni sugli effetti che essi potranno avere in futuro (IPCC, 2007b). Le proiezioni per il futuro segnalano che fino alla fine di questo secolo, i cambiamenti climatici procederanno molto più velocemente di quelli attuali e che le variazioni più rilevanti (in termini di aumento della temperatura media e di riduzione delle precipitazioni) si verificheranno nel bacino del Mediterraneo (IPCC, 2007a; EEA, 2008).

Esistono due approcci principali per contrastare gli impatti dei cambiamenti climatici: la mitigazione e l'adattamento. La mitigazione, a livello globale, implica la riduzione netta dei gas serra e la protezione e la promozione degli ecosistemi vegetali quali serbatoi di carbonio, attraverso una opportuna gestione del territorio e degli habitat, e la fornitura di fonti di energia (bio-energia) in sostituzione delle fonti fossili che aumentano la concentrazione di gas-serra in atmosfera. La mitigazione a livello locale, invece, prevede la gestione del territorio per la creazione di habitat che possano mantenere una certa stabilità microclimatica. Queste attività funzionano in maniera simile allo sviluppo di aree verdi urbane come lotta agli effetti delle "isole di calore" nelle città. L'adattamento ai cambiamenti climatici può avvenire nell'ambito di una risposta naturale dei sistemi ai cambiamenti climatici o può essere pianificata e indotta dall'uomo per limitare e contrastare gli impatti negativi, pur sempre nella consapevolezza dell'estrema complessità degli ecosistemi e quindi della difficoltà di prevedere le reali conseguenze dei cambiamenti, consapevolezza che richiede, ove possibile, l'applicazione del principio di precauzione.

3. Biodiversità e politiche economiche: Gli attuali modelli di produzione e di consumo globali dipendono in larga parte dalla biodiversità e dai servizi ecosistemici derivanti. Le differenti politiche di sviluppo possono influire sulla resistenza degli

Introduzione

ecosistemi naturali e semi-naturali: dai trasporti all'energia, dall'agricoltura al benessere culturale, le azioni intraprese possono avere molte conseguenze negative non previste.

L'insostenibilità dell'attuale percorso di crescita socio-economica, spesso guidato da criteri puramente economici di tipo privatistico che non tengono conto delle disfunzioni di mercato e delle carenze normative, non riesce ad assicurare attraverso le scelte operate dalle diverse politiche di settore un'adeguata conservazione della biodiversità e dei servizi ecosistemici.

Il vantaggio della conservazione di una specie per le generazioni future è di portata globale, mentre i costi per la sua conservazione sono locali e non vengono indennizzati: per tale motivo la specie è destinata all'estinzione. La perdita di biodiversità e dei servizi ecosistemici può generare costi particolarmente elevati per la società derivanti dalla conseguente perdita di vari servizi di approvvigionamento e di regolazione, come la produzione alimentare, la regolazione delle acque e la resilienza all'inquinamento e al cambiamento climatico.

La Comunità internazionale sta lavorando per l'identificazione di strumenti che possano rivelarsi effettivamente utili in questo ambito nonché per la creazione di sistemi nuovi ed innovativi. A principi vecchi, anche se ormai comunemente accettati come quello del *polluter pays* (ossia chi inquina paga) si sta cercando di aggiungerne di nuovi come i PES (Payments for Ecosystem Service), ossia pagamenti per i servizi ecosistemici, ma ancora non esistono delle vere basi scientifico-economiche per l'adozione di veri strumenti innovativi.

L'attuazione della Strategia Nazionale per la Biodiversità richiede un approccio multidisciplinare ed una forte condivisione e collaborazione tra i decisori politici e le amministrazioni centrali e regionali, con il supporto del mondo accademico e scientifico, raccogliendo le istanze dei portatori di interesse.

Per questo la Conferenza Stato-Regioni è stata individuata quale sede di decisione politica in merito alla Strategia e sono stati istituiti degli appositi organi di *governance* (DM del 6 giugno 2011 (G.U. 143 del 22/6/2011)).

Il Comitato paritetico per la Biodiversità, a supporto delle attività della Conferenza stessa, è composto da rappresentanti delle Amministrazioni centrali e delle Regioni e Province Autonome.

Introduzione

Il Comitato paritetico è supportato per gli aspetti tecnico-scientifici dall'Osservatorio Nazionale per la Biodiversità composto da rappresentanti di istituzioni, Enti di Ricerca, aree protette di valenza nazionale e regionale e società scientifiche.

Il primo rapporto, relativo al biennio 2011-2012, è stato presentato ad aprile 2013.

Il 10 luglio 2014 la Conferenza Stato-Regioni ha approvato i primi documenti prodotti dal Comitato paritetico per la Biodiversità. La Conferenza ha espresso accordi su “I rapporti sull’attuazione della Strategia Nazionale per la Biodiversità (periodo 2011-2012)” e accordi su “Linee Guida per il recupero, soccorso, affidamento e gestione delle tartarughe marine”. Inoltre, ha sancito l’intesa su “prime indicazioni programmatiche fino al 2015”.

1.2 Le foreste italiane

Le foreste italiane sono contraddistinte da un’elevata diversità specifica, (fisionomica, strutturale e paesaggistica), conseguenza di un’eterogeneità ambientale tipica del nostro Paese (biogeografia, bioclimatica e pedologica).

In generale, le foreste italiane sono tra le più ricche e varie a livello europeo, contenendo 117 specie differenti solamente tra quelle arboree (2/3 del patrimonio floristico europeo). Allo stesso tempo, secondo l’Agenzia Ambientale Europea (EEA), il nostro Paese ospita 10 delle 14 categorie forestali ritenute più rappresentative della variabilità ecologica forestale del continente europeo (EEA, 2006). A questa variabilità delle comunità forestali si associa una componente floristica e faunistica estremamente ricca.

Analizzando i risultati disponibili dell’Inventario Nazionale delle Foreste e dei Serbatoi Forestali del Carbonio (INFC) la superficie forestale italiana è stimata intorno al 34,7% del territorio nazionale. Considerando la contrazione delle aree agricole e pastorali, la superficie stimata risulta in progressivo aumento. È stato calcolato che la superficie forestale italiana è cresciuta dai 5,6 milioni di ettari del 1950 fino a 6,8 milioni di ettari nel 2005. Il tasso di crescita è stato piuttosto veloce nei primi decenni,

Introduzione

mentre negli ultimi tempi la superficie è rimasta pressoché invariata per la maggior parte dei distretti regionali di indagine.

Non bisogna dimenticare che le foreste italiane, come tutte le foreste dell'Europa meridionale, sono ecosistemi che sin dall'antichità sono stati condizionati dall'intervento umano con la conseguente alterazione della loro complessità naturale.

Estremamente rari e di fatto poco conosciuti sono invece quei lembi di foresta che, seppur utilizzati in passato, hanno sviluppato caratteri di “vetustà” a seguito di un periodo sufficientemente lungo di assenza del disturbo antropico. Essi sono ritenuti fondamentali per la conservazione della biodiversità, garantendo un habitat idoneo alla conservazione di ecosistemi ricchi e diversificati. Anche i boschi urbani (strutture urbane vegetazionali il più possibile simili ai boschi naturali, utilizzando specie autoctone, a scopo protettivo e di conservazione), pur costituendo una percentuale minima della copertura forestale italiana, rappresentano peculiari serbatoi di biodiversità floristica e faunistica.

La protezione delle foreste europee è attualmente incentrata sulla Gestione Forestale Sostenibile (GFS) e sui potenziali impatti che una gestione non sostenibile avrebbe sulla biodiversità in foresta (MCPFE, 2007). La GFS viene definita come “ la gestione corretta e l'uso delle foreste e dei terreni forestali nelle forme e a un tasso di utilizzo che consentano di mantenere la loro biodiversità, produttività, capacità di rinnovazione, vitalità e una potenzialità che assicuri, ora e nel futuro, rilevanti funzioni ecologiche, economiche e sociali a livello nazionale e globale e non comporti danni ad altri ecosistemi”.

Oltre alla produzione di legna e di altri prodotti secondari del bosco, le foreste offrono ulteriori servizi ecosistemici essenziali: esse rappresentano i principali serbatoi di carbonio e costituiscono una componente fondamentale nell'equilibrio climatico globale, contribuendo alla salute del nostro Paese e alla riduzione dell'emissione di gas serra. Infine contribuiscono alla produzione di energia rinnovabile fornendo ingenti quantitativi di biomassa.

In Italia, come in altri paesi mediterranei, una delle principali cause di danno alle risorse forestali e alla loro diversità biologica sono gli incendi, che nel decennio passato hanno causato nel nostro paese la perdita di più di 500 mila ettari di bosco (Lavecchia e Pietramellara, 2012).

Introduzione

Secondo gli esperti, l'aumento della temperatura media e la diminuzione delle precipitazioni, soprattutto nel periodo estivo, rischiano di aumentare la frequenza e la severità del fenomeno. Ne consegue un indiscusso danno ambientale che si traduce in perdita di diversità biologica dei suoli e nella perdita di gran parte dei servizi ecosistemici forniti dalle foreste.

Inoltre, l'incremento delle fitopatologie sistemiche, fungine ed entomologiche, l'espansione delle aree urbanizzate e delle infrastrutture, l'invasione di specie allogene invasive a scapito di boschi di origine naturale, la mancanza di un programma di monitoraggio della biodiversità forestale univoco, inclusa la biodiversità dei suoli forestali e una mancata predisposizione degli strumenti di pianificazione e gestione previsti dagli enti preposti contribuiscono a aumentare la criticità del problema.

Quindi, in ambito forestale, un buon programma di tutela della biodiversità deve essere in grado di operare a diversi livelli: sulla gestione del patrimonio di foreste, sulla riqualificazione ambientale e infine sulla vivaistica forestale.

1.3 Vivaistica forestale

Obiettivo principale del vivaismo forestale è quello di produrre specie che, grazie alle caratteristiche genetiche, morfologiche e fisiologiche siano in grado di poter offrire maggiori garanzie d'attecchimento, d'adattabilità e di rapido accrescimento per assicurare il successo dell'arboricoltura da legno e degli imboschimenti produttivi e protettivi al fine di ridurre la pressione antropica sulle foreste naturali.

La vivaistica forestale svolge un ruolo cruciale nel sostenere il restauro delle foreste in quanto, la considerevole produzione di piantine in vivaio, offre la possibilità di recuperare in minor tempo l'integrità dell'ecosistema rispetto alla colonizzazione naturale o alla semina diretta (Harmer e Kerr, 1995; Whisenant, 1999; Willoughby *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2011).

La crescente richiesta di piantine di ottima qualità, che possano sopravvivere e crescere con buone probabilità di sopravvivenza dopo l'impianto in ambiente naturale (Duryea, 1985; Mattsson, 1997; Colombo, 2004; Wilson e Jacobs, 2006), sottolinea l'importanza dei processi colturali in vivaio, utilizzando substrati idonei e pratiche di

Introduzione

fertilizzazione moderne, per ottenere il successo dei programmi di restauro ambientale e di rimboschimento (Grossnickle, 2005; Navarro *et al.*, 2006).

Recentemente è aumentato l'interesse nei confronti dell'attività vivaistica forestale, probabilmente grazie all'introduzione e all'applicazione di regolamenti comunitari per l'imboschimento dei terreni agricoli e ad una più ampia, diffusa e convinta politica di rinaturalizzazione del territorio (Calvo, 1996; Mezzalana, 1998).

Tale fenomeno ha influito anche sull'orientamento della ricerca italiana, nonostante il nostro Paese sia in ritardo rispetto al resto d'Europa dove la vivaistica forestale è in continuo sviluppo sia sotto un profilo tecnico che tecnologico. Malgrado questo ritardo, da diversi anni in Italia si è assistito a un'aumentata attività di afforestazione e riforestazione artificiale che ha visto trasformare migliaia di ettari di terreno in piantagioni forestali per scopi ambientali specifici come la stabilizzazione dei suoli, il recupero di aree degradate, la ricostituzione del paesaggio, la conservazione e l'incremento della biodiversità. Di conseguenza la vivaistica forestale si è dovuta necessariamente adeguare dotandosi di modalità di coltivazione moderne e razionali nel rispetto del patrimonio genetico delle specie legnose autoctone, approfondendo gli aspetti tecnici del settore sementiero e della coltivazione.

Le nuove tecnologie devono essere quindi introdotte per sostenere la rigenerazione forestale in modo più efficace e conveniente. Tutto ciò può essere ottenuto attraverso una razionale gestione del condizionamento colturale o pre-coltivazione. Gli studi più recenti in questo ambito hanno focalizzato l'attenzione sullo sviluppo di nuove tecniche per una produzione economicamente e ambientalmente sostenibile di piante forestali (minor uso di risorse quali acqua, energia, fertilizzanti, torba, pesticidi) in un'unità di produzione chiusa (generalmente una camera di crescita) non influenzata dal clima esterno. Inoltre, si sta cercando di sviluppare una tecnologia innovativa basata sulla robotica per poter disporre di un sistema funzionale e flessibile che possa permettere una produzione su larga scala di materiale vegetale pre-coltivato adatto al trapianto meccanizzato, senza l'utilizzo di serre tradizionali (Mattsson *et al.*, 2010).

Nonostante il riconoscimento che qualche cosa sia cambiato, il panorama generale non è confortante: le tematiche del settore vivaistico continuano ad essere campo di studio e ricerca minoritario, marginali rispetto ad altri settori; la sistematicità,

Introduzione

l'organicità e la continuità delle attività continuano ad essere più un'ambizione ed un sogno che una scelta operativa chiara e coerente; il distacco tra mondo della ricerca e mondo degli operatori è ancora troppo spesso elevato; la coscienza del ruolo delle conoscenze sperimentali relative, per esempio, alla diversità genetica delle specie forestali, non è affatto patrimonio diffuso.

Alla luce di queste riflessioni sembra di poter indicare in queste direzioni gli orientamenti della ricerca necessari a sostenere attività vivaistiche moderne ed adeguate agli scopi più attuali delle attività di forestazione e di rinaturalizzazione del territorio:

- inventario delle risorse genetiche non solo delle specie arboree principali ma anche di quelle secondarie e almeno delle principali specie arbustive, con priorità per le specie di maggior impiego, per quelle rare e minacciate e per quelle rappresentative dei differenti modelli di riproduzione e di colonizzazione;
- sviluppo di aree di raccolta di semi (boschi da seme) e di produzione specializzata e migliorata (arboreti da seme);
- miglioramento delle tecniche di conservazione dei semi e di idonee procedure per l'aumento della germinabilità;
- miglioramento e sviluppo delle tecniche di produzione e di coltivazione;
- identificazione di procedure e standard di qualificazione del materiale vivaistico;
- identificazione e selezione di varietà idonee all'utilizzo in ambienti inquinati.

Da qualche tempo, è aumentata la richiesta ai vivai forestali di una più vasta varietà di specie arboree e arbustive, latifoglie piuttosto che conifere, piante autoctone anziché alloctone, per essere utilizzate nell'arboricoltura da legno o per interventi di restauro ambientale.

Purtroppo, il sistema vivaistico forestale nazionale, sia pubblico sia privato, non riesce a offrire materiale d'impianto per gli scopi prima menzionati anche grazie all'introduzione sul mercato italiano di materiale vivaistico prodotto in altri Paesi, immettendo sul mercato nazionale materiale genetico di origine non certificata e sconosciuta (Mezzalana, 1995).

Per favorire l'utilizzo di materiale di propagazione di provenienza conosciuta o l'uso di ecotipi locali, è stata avanzata la necessità di ricorrere agli strumenti legislativi vigenti (Giordano, 1997; Ciancio, 1997) o a nuovi sistemi di certificazione.

La situazione italiana è particolarmente delicata dal punto di vista legislativo soprattutto a causa da un lato della parziale applicazione delle norme comunitarie di riferimento, dall'altro della difficile fase di passaggio tra un periodo a gestione centralizzata (ante DPR 616/77) ed una fase di progressivo decentramento delle competenze dallo Stato alle Regioni.

1.4 Pre-coltivazione e l'illuminazione a LED

Alla luce di quanto detto, emerge la necessità di incrementare l'attività di ricerca a livello vivaistico forestale al fine di salvaguardare i boschi naturali.

L'introduzione in ambito vivaistico di una nuova tecnologia, basata sul concetto di pre-coltivazione, ha permesso di ottenere una produzione di piantine forestali, da poter essere utilizzate per gli imboschimenti protettivi e produttivi, con minor uso di risorse e con un minor impatto energetico e, quindi, economico.

La pre-coltivazione in mini-contenitori prevede l'allevamento di specie forestali in ambiente controllato, o camere di crescita, per un periodo di 4-5 settimane, in modo da sostenere la crescita delle piante durante le loro prime, e più delicate, fasi di vita (Bellarosa *et al.*, 2007).

Grazie all'utilizzo di camere di crescita, si possono coltivare piante con condizioni climatiche ottimali il più possibile vicino alle condizioni naturali. Tutto questo può essere ottenuto grazie ad un preciso e costante controllo dei parametri quali temperatura, umidità e fotoperiodo, riproducendo le condizioni climatiche adatte per l'allevamento di diverse specie vegetali.

Le piante hanno bisogno di nutrienti, acqua, CO₂, luce e livelli adeguati di temperature per potersi sviluppare e crescere (Zuchi e Astolfi, 2012). È noto infatti che i cambiamenti delle condizioni di allevamento, in particolar modo la disponibilità di acqua e di luce, influenzano direttamente la crescita della pianta e la loro produttività (Niinemets, 2010; Yamori *et al.*, 2010). Il fattore che più di ogni altro è determinante per lo sviluppo di specie vegetali e arboree è sicuramente l'illuminazione in quanto i processi di fotosintesi e fotomorfogenesi sono strettamente dipendenti dalla luce.

Introduzione

Le variabili principali applicabili alla luce sono: la qualità (lunghezze d'onda differenti), la quantità (valori diversi di densità di flusso fotonico) e la durata (o fotoperiodo). È stato dimostrato che processi importanti quali la crescita della parte aerea, l'allungamento dello stelo e degli internodi, la capacità fotosintetica e l'apertura stomatica sono influenzate dalla qualità della luce (Chen *et al.*, 2004; Zuchi e Astolfi, 2012).

D'altra parte, è noto che le piante sono in grado di reagire a variazioni nei livelli d'intensità luminosa attraverso particolari adattamenti morfologici, biochimici e fisiologici che dipendono principalmente dalle caratteristiche genetiche della pianta. Tali risposte consentono l'adeguamento della velocità di crescita della pianta alle mutate disponibilità energetiche (Smith *et al.*, 1999; Ariz *et al.*, 2010).

Tradizionalmente, per la coltivazione delle piante nelle camere climatiche sono utilizzate lampade fluorescenti (soprattutto cool-white), che emettono nel visibile (400-700 nm) e nell'invisibile (700-850 nm) con un picco di emissione nel giallo (~589 nm), spesso usate in combinazione con l'aggiunta di lampade ai vapori di sodio e / o di lampade a incandescenza, fornendo uno spettro di luce più ampio riproducendo condizioni il più possibile simili a quelle naturali (Bubenheim *et al.*, 1988).

Tuttavia, queste lampade presentano varie limitazioni. Innanzitutto, non permettono di variare alcuni parametri, quali le caratteristiche dello spettro, impedendo così di studiarne l'effetto. Inoltre, la loro durata può essere influenzata dal numero di accensioni e spegnimenti e perdono leggermente in quantità di flusso luminoso emesso nel corso del tempo (Sager e McFarlane, 1997). Inoltre, le lampade fluorescenti trasformano la gran parte dell'energia assorbita in calore che dovrà poi essere dissipato dalle camere di crescita.

Recentemente, diodi ad emissione luminosa (LED) sono stati introdotti in alternativa alle tradizionali lampade fluorescenti (Yeh e Chung, 2009).

I LED sono particolarmente adatti per essere utilizzati nelle camere di crescita per l'allevamento di piante grazie al fatto di presentare diversi vantaggi: sono meno ingombranti, hanno una maggior durata media stimata in 50.000 ore, producono una minor dispersione di calore e consentono di ottenere un risparmio energetico fino all'80% rispetto alle luci tradizionali (Tennessee *et al.*, 1994; Yeh e Chung, 2009). Al contrario delle luci fluorescenti, dato che sono disponibili nell'intera regione dello

Introduzione

spettro efficace che va dall'infrarosso all'ultravioletto, i LED possono poi essere costruiti per emettere luce di un colore preciso in modo da poter variare lo spettro secondo le esigenze di coltivazione.

Nei primi anni '90, l'illuminazione a LED è stata utilizzata per la prima volta per la crescita di piante in ambiente controllato. In particolare, l'allevamento di lattuga con LED rossi (R) in combinazione con una lampada fluorescente blu era equivalente alla crescita della specie utilizzando lampade fluorescenti cool-white insieme a lampade a incandescenza (Bula *et al.*, 1991). Al momento di questo studio non sono stati utilizzati LED blu (B) in quanto non erano disponibili.

Studi successivi dimostrarono l'allungamento degli ipocotili e dei cotiledoni di piantine di lattuga esposti a LED R (660 nm), fenomeno che era inibito quando si aggiungeva una luce B (Hoenecke *et al.*, 1992).

Questi risultati hanno spinto la ricerca a indagare l'influenza dei LED su altre specie orticole e agrarie, come per esempio sulle piantine di grano e di rapa (Morrow *et al.*, 1995), sulle patate utilizzando le foglie come talee (Croxdale *et al.*, 1997), sulle specie *Arabidopsis thaliana* (Stankovic *et al.*, 2002) e soia (Zhou, 2005).

Altri studi dimostrarono che l'attività fotosintetica delle piantine di fragole era maggiore quando le piante erano esposte ai LED R (660 nm) rispetto a quelli B (450 nm) (Yanagi *et al.*, 1996). Inoltre, Brown *et al.* (1995) dimostrarono le eccessive emissioni di onda lunga delle lampade a ioduri metallici rispetto ai LED analizzando piante di peperone, indicando quindi i vantaggi a livello termico dell'utilizzo di questa nuova tecnologia per la coltivazione di specie orticole.

Studi recenti hanno dimostrato che una combinazione di luci LED R (660 nm) e B (470 nm) aumentavano l'attività fotosintetica nelle foglie di riso rispetto alle piante cresciute solamente con la luce LED R, probabilmente causata dall'aumento del contenuto di azoto rilevato nelle piantine cresciute in presenza della luce B (Matsuda *et al.*, 2004).

L'utilizzo della luce LED R ha effetti sull'attività fotosintetica, in quanto le lunghezze d'onda rosse (comprese fra 600 e 700 nm) sono facilmente assorbite dai pigmenti della pianta (Sager e McFarlane, 1997). Inoltre, i primi LED utilizzati in questi studi avevano un picco di emissione a 660 nm molto vicino al picco di assorbimento della clorofilla.

Introduzione

Un'altra lunghezza d'onda importante dello spettro visibile è la regione del blu (400-500 nm). La luce B sembra avere un ruolo decisivo per l'apertura stomatica (Schwartz e Zeiger, 1984), per l'allungamento dello stelo (Cosgrove, 1981) e nei processi di fototropismo (Blaauw e Blaauw-Jansen, 1970).

I primi studi sull'utilizzazione dei LED R con una luce B dimostrarono una buona crescita delle piante di lattuga (Hoenecke *et al.*, 1992). Sono numerose le ricerche effettuate nel tempo sulla combinazione luce rossa-blu (RB), per esempio grano (Tripathy e Brown, 1995), lattuga, spinaci e ravanella (Yorio *et al.*, 1998), dimostrando che la crescita di queste specie era incentivata quando veniva aggiunta la luce B, anche in piccole percentuali, alla luce R.

I LED possono essere utilizzati anche per studiare gli effetti sulle piante della luce rosso lontano (FR) e delle lunghezze d'onda della regione del verde (G).

Studi eseguiti sulle piante di peperone utilizzando lampade LED R, con emissione nei 660 nm, combinate con FR (735 nm) o luce B, hanno evidenziato che lo spessore fogliare e il numero dei cloroplasti dipendeva più dalla luce B che dal rapporto luce R:FR (Schuerger *et al.*, 1997).

Ulteriori ricerche evidenziarono gli effetti sulla morfologia, sull'evolversi di malattie e sull'accumulo di nitrati nelle piante quando esposte alla luce FR prodotta da lampade LED (Kim *et al.*, 2005).

Tutti questi studi hanno dimostrato che la combinazione della luce R con la luce B, prodotte da lampade LED, migliorava la crescita delle piante rispetto alla luce fluorescente utilizzata fino a quel momento. La combinazione di questi due colori produce un colore che all'occhio umano è percepito come grigio-viola, impedendo così di diagnosticare malattie della pianta visibili a occhio nudo. Per ovviare a questo problema venne proposto di aggiungere una piccola percentuale di luce G nella miscela RB (Kim *et al.*, 2004a) senza causare impatti sulla crescita delle piante. Successivamente, vennero indagati gli effetti causati da un aumento di luce G sulle piante e si notò che la lattuga esposta a una miscela di luce RBG aumentava il suo peso fresco e secco e l'area fogliare rispetto alle piante allevate con una lampada fluorescente cool-white o con solo la miscela RB (Kim *et al.*, 2004b).

Grazie a questi studi, è stato possibile sviluppare nuove tecnologie LED multispettrali, in modo che potessero soddisfare le esigenze di crescita delle piante, e

quindi essere utilizzati come fonte di luce per la produzione di specie orticole (Stutte *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012).

Nonostante queste caratteristiche interessanti dell'illuminazione a LED, e le conoscenze acquisite sugli effetti della qualità della luce sulla morfogenesi della pianta, sulla sintesi della clorofilla e la fotosintesi (Tennessen *et al.*, 1994; Schuerger e Brown, 1994; Massa *et al.*, 2008), studi sulla crescita e lo sviluppo di specie forestali con diversi sistemi LED sono molto limitati (Astolfi *et al.*, 2012; Marianello *et al.*, 2012; Marianello *et al.*, 2013; Marianello *et al.*, 2014).

1.5 Il progetto di ricerca europeo Regen-Forest

E' acclarato che le foreste svolgano un ruolo cruciale nella conservazione della biodiversità, nella regolazione del clima globale e di come siano una risorsa vitale per alcuni Paesi.

Purtroppo una continua pressione antropica sull'ecosistema forestale, una produzione vivaistica forestale di qualità piuttosto limitata e l'impiego di risorse, quali acqua, pesticidi, fertilizzanti e energia, hanno contribuito al peggioramento delle condizioni delle formazioni forestali della gran parte del pianeta.

L'obiettivo del progetto di ricerca Regen-Forest è stato quello di introdurre una nuova metodologia per la coltivazione di materiale di propagazione forestale basata su una produzione economicamente e ambientalmente sostenibile utilizzando camere di crescita.

L'ambiente di allevamento controllato non è influenzato dalle condizioni climatiche esterne e la sorgente di luce è costituita da lampade sperimentali a luci LED per i loro vantaggi rispetto alle tradizionali lampade fluorescenti.

Il progetto Regen-Forest si prefiggeva 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 queste specie;
- sviluppo di lampade LED adatte alla crescita di piante forestali in camere climatiche;

- definizione delle caratteristiche per la costruzione di una camera di crescita mobile, focalizzando l'attenzione sulle prestazioni tecniche e sulle condizioni di allevamento, da immettere sul mercato vivaistico nazionale ed europeo.

L'utilizzo della nuova tecnologia d'illuminazione a LED sarà una grande rivoluzione nella produzione vivaistica forestale odierna. Infatti, i LED, oltre a migliorare economicamente la gestione della produzione forestale, contribuiranno anche a tutelare l'ambiente tramite un minor consumo di energia con una conseguente riduzione delle emissioni di gas serra.

1.5.1 Camere di crescita

Università ed enti di ricerca necessitano di apparecchiature per la coltivazione di specie vegetali, in grado di riprodurre le condizioni ambientali ideali per la germinazione di sementi e la successiva crescita delle piante.

Le camere di crescita che si trovano in commercio sono prodotte in tutto il mondo e hanno diverse misure di grandezza (da unità portatili a vere e proprie stanze) in modo da soddisfare le esigenze di studio e 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, anche la presenza dell'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, forestali e floreali.

1.5.2 Il Prototipo

Il Prototipo, sviluppato nell'ambito del progetto di ricerca Regen-Forest, si caratterizza per l'utilizzo innovativo di particolari lampade a luci LED capaci di creare uno spettro luminoso continuo con lunghezze d'onda che comprendono le regioni del blu, del verde, del rosso, del rosso-lontano e dell'infrarosso (Figura 1.1).

Il Prototipo altro non è che un sistema automatico composto da 10 ripiani in continuo movimento esposti all'illuminazione di solo tre lampade LED. Nello stesso

Introduzione

tempo, il Prototipo garantisce condizioni ambientali interne omogenee di temperatura e umidità idonee alla crescita di piantine forestali.



Figura 1.1 - Il Prototipo realizzato nell'ambito del progetto di ricerca Regen-Forest. È possibile notare i ripiani e i contenitori con le piante.

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.

Introduzione

Questo nuovo modello di camera di crescita, a basso impatto ambientale, potrebbe soddisfare le esigenze di vari settori, non solo forestale, ma anche agronomico e florovivaistico.

1.5.3 I contenitori, il terreno Jiffy e terreno DAFNE

Attualmente, in Italia la maggior parte dei vivai forestali produce materiale a radice nuda o in contenitore (Mohammed *et al.*, 2001; Ciccarese *et al.*, 2005).

Proprio i contenitori di nuova generazione (Quick-pot; Forest-pot, disponibili in diverse dimensioni) sembrano essere la modalità di coltivazione preferibile poiché consentono l'air-pruning radicale e permettono alle piante di poter beneficiare, anche dopo la vendita, di condizioni edafiche simili a quelle vissute precedentemente in vivaio (Figura 1.2).

La pianta viene nutrita durante lo sviluppo dell'apparato radicale e protetta nei confronti di stress idrici e meccanici durante la fase di confezionamento, trasporto e messa a dimora, consentendo di ottenere percentuali d'attecchimento superiori a quelle ottenibili con materiale a radice nuda.

Per questo motivo, nel progetto di ricerca si è optato per l'utilizzo di contenitori di plastica (sia nella fase di pre-coltivazione che nella fase successiva in serra) per lo sviluppo delle piante.

I vassoi di plastica sono stati riempiti con torba (Preforma PP01, Jiffy® Products, Norvegia) contenente dell'amido come legante per stabilizzare la radice e facilitare l'operazione di trapianto successiva.



Figura 1.2 – Contenitori utilizzati per le semine nelle camere di crescita. Nella foto è possibile notare la particolarità di tali contenitori che consentono l'air-pruning radicale.

Questo substrato è stato positivamente testato in un precedente progetto europeo chiamato Pre-Forest (Mattsson *et al.*, 2010), così come i contenitori, e ha la caratteristica di proteggere l'apparato radicale durante le operazioni di out-planting rimanendo aderente alle radici e riducendo, quindi, i problemi associati alla crisi di trapianto.

Oltre al substrato commerciale Jiffy, piuttosto costoso e di complessa reperibilità, è stato sperimentato un terriccio la cui formulazione è stata definita dal gruppo di ricerca del DAFNE.

1.5.4 Serra e impianto

La serra è una struttura protettiva (riscaldata o no) utilizzata per la coltivazione di piante orticole, floreali, arboree al fine di controllare al meglio le condizioni climatiche di allevamento.

Dopo la fase di pre-coltivazione in ambiente controllato, le piantine prodotte sono state trapiantate in contenitori più grandi per sostenere la loro ulteriore crescita e trasferite in serra per l'ambientamento alle condizioni naturali.

Questo passaggio è di fondamentale importanza per garantire la sopravvivenza delle piante. Infatti, terminato il periodo di pre-allevamento, che comprende le prime 4-5 settimane di vita della specie, le piante non possono subito essere trapiantate in campo aperto in quanto, date le loro esili strutture anatomiche e le premature condizioni di crescita, non sopravviverebbero senza costosi interventi colturali di sostegno.

Il passaggio successivo, quindi, è stato il trapianto delle specie pre-coltivate con i diversi sistemi d'illuminazione LED nell'ambiente naturale.

Infatti, un obiettivo del progetto di ricerca Regent-Forest è quello di stabilire se i vantaggi della pre-coltivazione con i LED vengono mantenuti, in termini di crescita delle piante, una volta che queste saranno esposte all'ambiente naturale.

1.6 Le specie botaniche oggetto di studio

1.6.1 Faggio (*Fagus sylvatica* L.)

Il faggio (Figura 1.3) 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.

<i>Classificazione Scientifica</i>	
Dominio	Eukaryota
Regno	Plantae
Divisione	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordine	Fagales
Famiglia	Fagaceae
Genere	Fagus
Specie	F. sylvatica



Figura 1.3 - Pianta di faggio.

Il faggio è un albero non particolarmente longevo (200-300 anni) e raggiunge facilmente un'altezza di 30-35 metri, caratterizzato da fogliame denso di forma ovale e con fusto slanciato e dritto. 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.

La fase giovanile della pianta è lunga. Infatti la riproduzione non inizia fino a quando la specie non ha raggiunto circa 50-60 anni di età. La fruttificazione non è costante tutti gli anni, ogni 4-5 anni è buona ma solo ogni decina d'anni è abbondante, fenomeno chiamato pasciona.

Introduzione

I semi sono dormienti e per germinare hanno bisogno di un periodo di vernalizzazione (necessità di essere esposti a basse temperature) piuttosto lungo, che può andare dai 45 giorni fino a 5 mesi. I semi di faggio sono ortodossi (mantiene per lunghi periodi la facoltà germinativa se portato a un ridotto contenuto di umidità e conservato a basse temperature in contenitori ermetici) ma non è agevole reidratarli.

Questa prassi può essere importante nelle tecniche vivaistiche poiché una reidratazione parziale, con un contenuto di acqua pari al 30% del peso, permette di ottenere una vernalizzazione senza rischi di una germinazione anticipata (Suszka *et al.*, 1994).

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 (ricoperte da una peluria densa e sottile) con il margine dentato o ondulato.

L'optimum di intensità luminosa per la crescita delle piante è circa il 40% di quella di pieno sole (Gellini e Grossoni, 1997a).

L'areale del faggio interessa quasi l'intera Europa occidentale, dalla Scandinavia meridionale alla Sicilia settentrionale e alla Grecia (Figura 1.4).

Il faggio è una pianta che resiste bene alle stazioni esposte grazie alla caducità delle foglie e alla capacità di rinnovarsi agamicamente (riproduzione asessuata) e la sua distribuzione è condizionata dalla ripartizione annuale della piovosità in quanto 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. Nel Nord Europa sono le basse temperature che agiscono da fattore limitante, mentre a est è il clima continentale che impedisce l'espansione del faggio al di là dei rilievi balcanici.

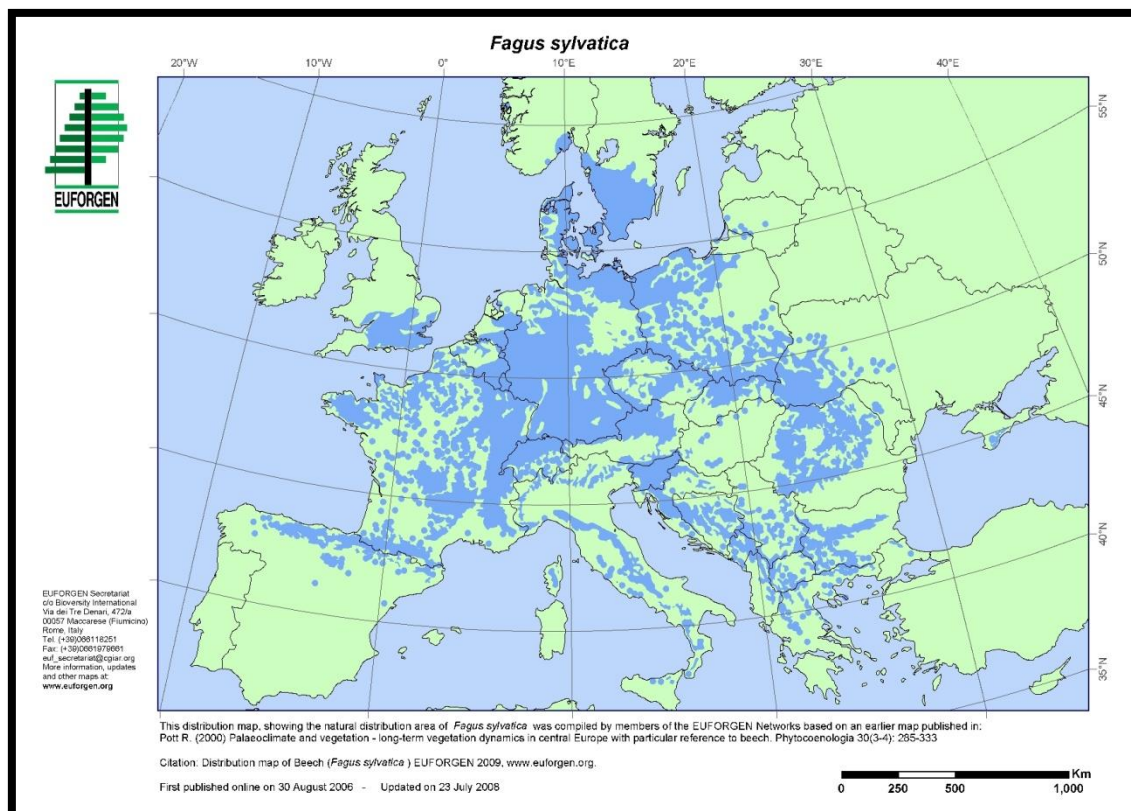


Figura 1.4 - Mappa areale del faggio in Europa.

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, mentre le faggete depresse eterotopiche del Gargano, del Lazio e della Toscana scendono a 400-500 metri.

Nel territorio viterbese, situata sul monte Cimino, è presente una delle più importanti faggete italiane (Figura 1.5). Questa è una vecchia foresta secondaria (Frelich e Reich, 2003), probabilmente un bosco sacro fin dall'età del bronzo, che si estende su 62 ettari tra i 950 e i 1050 m s.l.m. in cima alla montagna.

Il territorio di origine vulcanica ha permesso la crescita degli alberi fino a ottenere degli esemplari di dimensioni imponenti con altezze di oltre 40 metri.

L'aspetto della faggeta è definito "a cattedrale", conferito dalle cime degli alberi che, toccandosi, impediscono l'ingresso della luce solare, creando un'atmosfera suggestiva.

Introduzione

Gli esemplari più vetusti hanno una chioma estesa con grandi rami situati nella parte inferiore del fusto, sviluppo probabilmente causato da un ambiente passato più ampio e aperto rispetto a quello attuale.

La particolarità di questa faggeta è legata al fatto che gli alberi possono completare il loro ciclo vitale senza correre il rischio di essere tagliati. Infatti, dal 1949 non sono state effettuate pratiche di taglio forestale e il bosco è stato inserito nella rete delle foreste antiche dell'Unesco. Il fattore unico responsabile della caduta degli alberi è il vento e, come conseguenza, si ha la nascita di nuove piantine di faggio ma anche di altre specie autoctone (aceri, ciliegi e sambuchi).

La faggeta del monte Cimino è un classico esempio di Foresta Vetusta presente in Europa e, fino ad oggi, è prevalsa una politica conservativa che ha protetto il bosco e il suo inestimabile valore (Di Filippo *et al.*, 2004).

Il termine “foreste vetuste” viene utilizzato per indicare comunità forestali che hanno raggiunto una fase di sviluppo caratterizzata da un'elevata eterogeneità strutturale. Molte definizioni sono state formulate da diversi studiosi, al fine di meglio delimitare l'ambito di applicazione di questo termine.

L'acquisita consapevolezza che tra diverse tipologie forestali esistano alcune analogie e molte differenze negli attributi utilizzati per caratterizzare un bosco vetusto, ha però impedito fino ad oggi di mettere a punto una definizione unanimemente condivisa.

La definizione proposta è stata: “Una foresta vetusta è un bosco primario o secondario che abbia raggiunto un'età nella quale specie e attributi strutturali normalmente associati

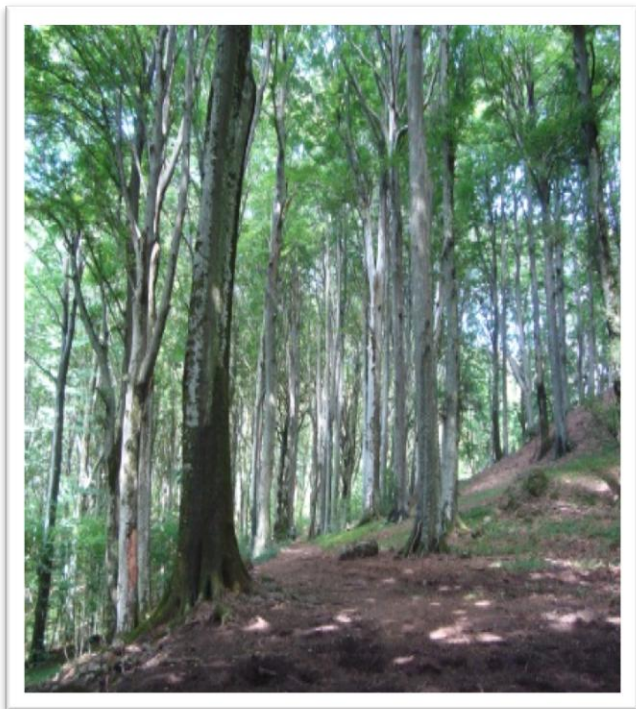


Figura 1.5 - Faggeta vetusta situata sui Monti Cimini in provincia di Viterbo

con foreste primarie senescenti dello stesso tipo, si siano sufficientemente accumulati così da renderlo distinto come ecosistema rispetto a boschi più giovani” (Foreste vetuste in Italia, 2010).

1.6.2 Leccio (*Quercus ilex* L.)

Il leccio, chiamato anche elce (Figura 1.6), è un albero sempreverde molto importante nei Paesi del bacino mediterraneo (Barbero *et al.*, 1992). L’impiego quasi esclusivo dei boschi di leccio è il governo a ceduo per legna da ardere e il miele che si ottiene dai suoi fiori presenta proprietà astringenti e è ricco di ferro.

Classificazione Scientifica	
Dominio	Eukaryota
Regno	Plantae
Divisione	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordine	Fagales
Famiglia	Fagaceae
Genere	Quercus
Specie	Q. ilex



Figura 1.6 - Pianta di leccio

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, la ghianda, matura nello stesso anno della fioritura della pianta. L’antesi, ossia il periodo in cui il fiore è completamente aperto e funzionale, avviene nella tarda primavera (aprile-giugno) e la ghianda matura nell’autunno inoltrato. Le ghiande hanno una colorazione castano scura con striature scure più evidenti e germina prontamente.

I semi di questa specie sono definiti recalcitranti (non riesce a sopravvivere al congelamento e all'essiccazione, non essendo in grado di sopravvivere alla fase di

Introduzione

disidratazione, deve necessariamente germinare in tempi brevi) quindi 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 plantula ha foglie pelose (bianche) alla germinazione, per poi diventare glabrescenti, di colore verde, con il margine dentato e pungente, mentre il fusticino è fittamente pubescente.

Il leccio è una sclerofilla mediterranea che cresce nell'areale circummediterraneo (Figura 1.7), mancando solo in Egitto, e si estende longitudinalmente per 6.000 chilometri dal Portogallo alla Siria, e latitudinale per 1500 km dal Marocco alla Francia (Valladares *et al.*, 2000a), dove forma, nella regione occidentale, boschi puri anche molto vasti e, nel settore orientale, boschi misti con altre specie in regioni che garantiscono una certa umidità.

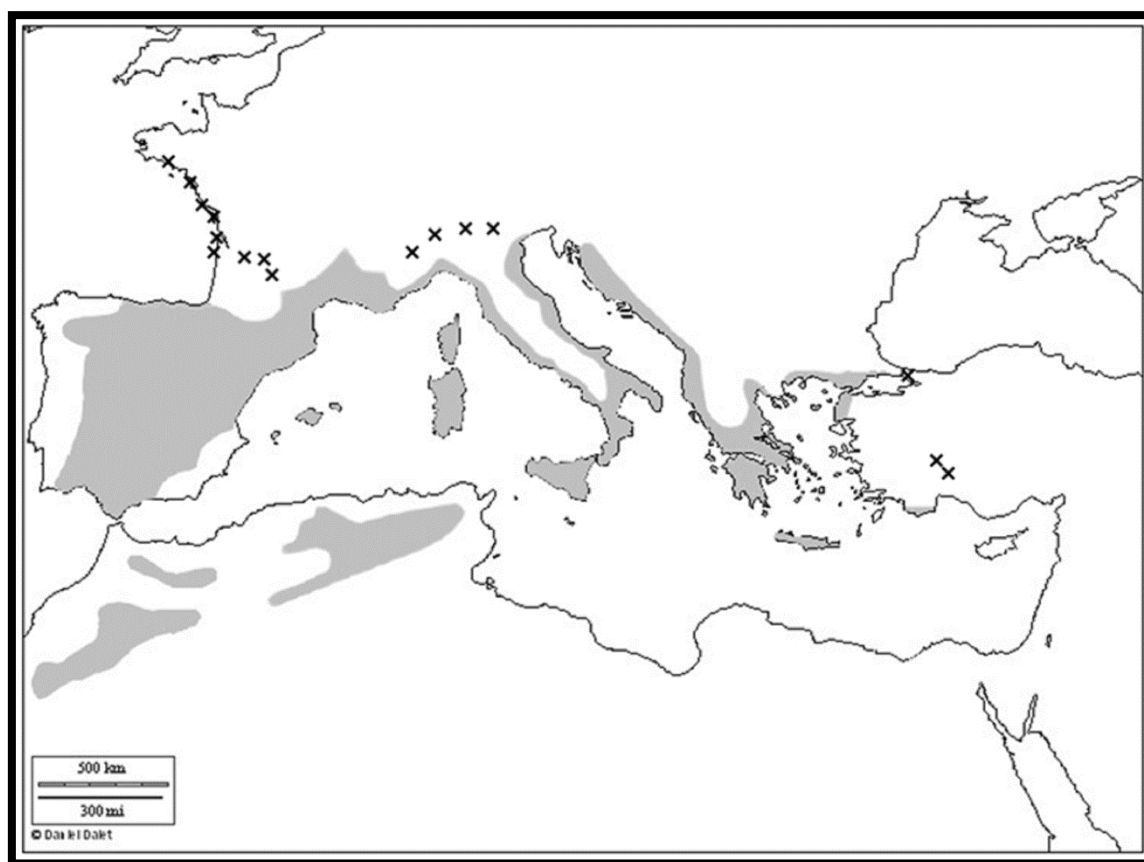


Figura 1.7 - Mappa areale del leccio nel bacino mediterraneo (Delzon *et al.*, 2013).

Introduzione

Il leccio presenta un'elevata flessibilità fenotipica a livello morfologico che fenologico (Gratani, 1995; Gratani *et al.*, 1996; Sabaté *et al.*, 1999; Gratani *et al.*, 2000) permettendo quindi una maggior adattabilità della pianta (Valladares *et al.*, 2000b; Gratani e Bombelli, 2001; Gratani *et al.*, 2003).

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 (vive bene nei terreni molto umidi) ed è relativamente termofila dimostrandosi resistente al freddo, alle basse intensità luminose e alle brusche variazioni di temperatura (Gellini e Grossoni, 1997b).

1.6.3 Sughera (*Quercus suber* L.)

La quercia da sughero, o sughera (Figura 1.8), è una specie sempreverde distribuita in tutto il bacino del Mediterraneo occidentale. Le foreste di sughera

Classificazione Scientifica	
Dominio	Eukaryota
Regno	Plantae
Divisione	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordine	Fagales
Famiglia	Fagaceae
Genere	Quercus
Specie	Q. suber

svolgono un ruolo importante sia a livello ecologico che socio-economico.

L'importanza ecologica di queste foreste è correlata con molte funzioni ambientali come per esempio la conservazione del suolo e la conservazione della biodiversità (Bugalho *et al.*, 2011), mentre la sua importanza socio-economica è strettamente legata all'estrazione di sughero dalla corteccia. La produzione di sughero, comunemente utilizzato come materia prima per la fabbricazione di tappi per bottiglie, è basata sulla rimozione periodica dello strato di sughero che copre il tronco e i rami della pianta, dato che la pianta è in grado

di rigenerare dopo ogni rimozione sughero nuovo.

È una pianta che raggiunge 20 metri di altezza e diametri di 1,50 metri ed è abbastanza longevo purché non sfruttato, in media 250-300 anni. Il tronco difficilmente è dritto, si ramifica presto e ha rami disposti irregolarmente formando una chioma poco simmetrica di un verde meno intenso rispetto al leccio.

Introduzione

La corteccia, inizialmente liscia e grigiasta, dopo pochi anni si ispessisce formando una corteccia successiva spugnosa, rugosa, screpolata e solcata da profonde fessure.

La fioritura avviene in primavera avanzata, fra aprile-giugno, oppure dopo il periodo di siccità estiva (settembre-ottobre). Quindi, in funzione della fioritura, la maturazione delle ghiande può avvenire o nell'autunno dello stesso anno o nella tarda estate-inizio autunno dell'anno successivo.

Il seme, di dimensioni variabili da 2 a 3.5 cm, è di colore bruno quando matura altrimenti di colore verde. Il seme è recalcitrante, quindi la sua conservazione è influenzata dal tasso di umidità. Come per la ghianda di leccio, anche la sughera dovrà essere conservata in contenitori arieggiati a basse temperature per un periodo inferiore a un anno. Le plantule hanno foglie pubescenti alla germinazione che diventano rapidamente glabre e, durante l'estate, solamente la nervatura primaria rimane pelosa.



Figura 1.8 - Sughereta naturale situata in Toscana in provincia di Viterbo.

La sughera è una specie eurimediterranea diffusamente coltivata nella penisola iberica (Portogallo e Spagna forniscono il 75% della produzione mondiale di sughero), in Francia, in Italia e nelle coste settentrionali dell'Africa (Figura 1.9).

Introduzione

In Italia è presente in Liguria, nei territori costieri di Toscana e Lazio, della Calabria ionica e della Puglia e nelle isole Sicilia e Sardegna.

È una pianta che predilige l'esposizione diretta alla luce solare e necessita perciò di un'illuminazione intensa, soffrendo, al contrario, l'ombreggiamento, con un contenuto (in termini di peso secco) in clorofilla e carotenoidi maggiori rispetto al leccio.

Predilige inverni miti e un certo grado di umidità atmosferica e si trova su terreni derivanti da rocce di natura granitica con preferenza per terreni acidi.

In condizioni ottimali, la sughera riesce a affermarsi per la sua velocità di crescita che presenta nell'età giovanile, per la longevità e, in particolare, per la possibilità di sfuggire agli incendi grazie alla protezione della sua corteccia (Gellini e Grossoni, 1997c).

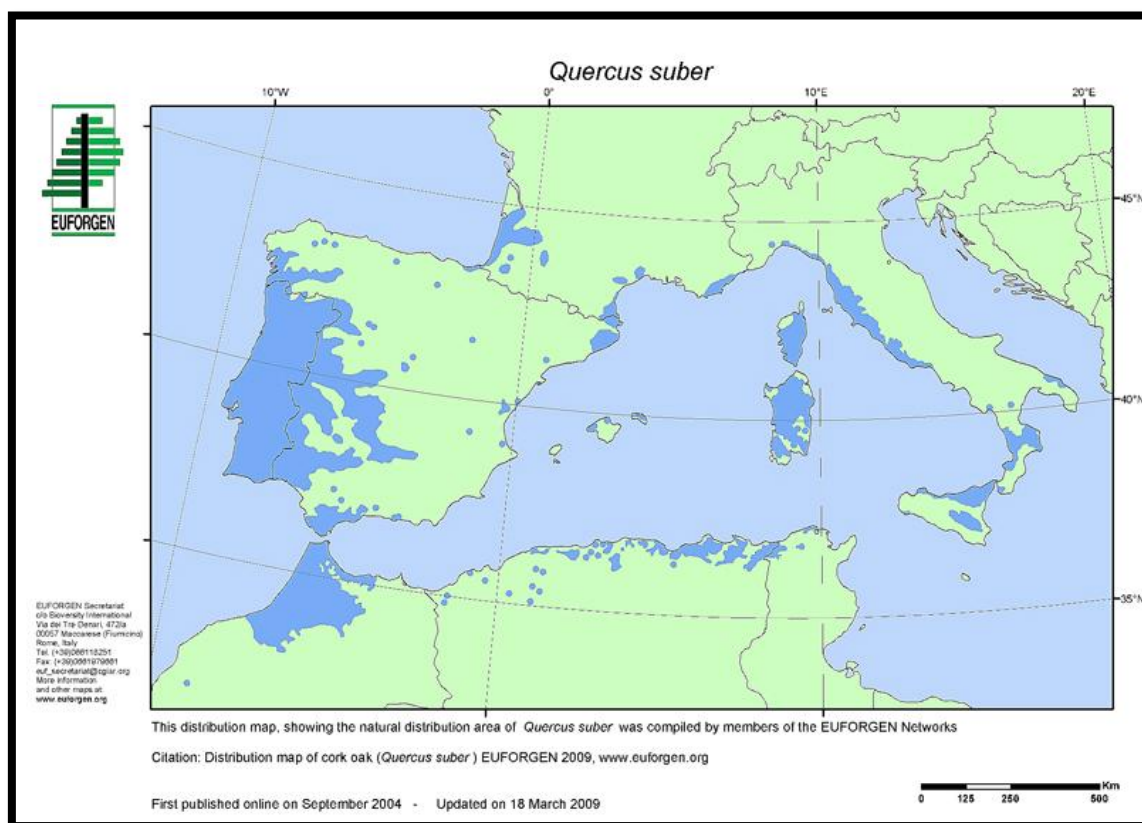


Figura 1.9 - Mappa areale della sughera nel bacino mediterraneo.

Introduzione

1.7 La fotosintesi clorofilliana

La vita sulla terra dipende fundamentalmente dall'energia che proviene dal sole. La fotosintesi è l'unico processo biologicamente importante in grado di raccogliere tale energia. Gli organismi fotosintetici utilizzano l'energia solare per sintetizzare composti organici che non potrebbero essere formati senza un input energetico.

Solamente una banda ristretta dello spettro elettromagnetico solare può essere utilizzato dalle piante per svolgere il processo fotosintetico ed è quella parte di spettro che viene definito comunemente “luce”, ossia lo spettro del visibile (Figura 1.10).

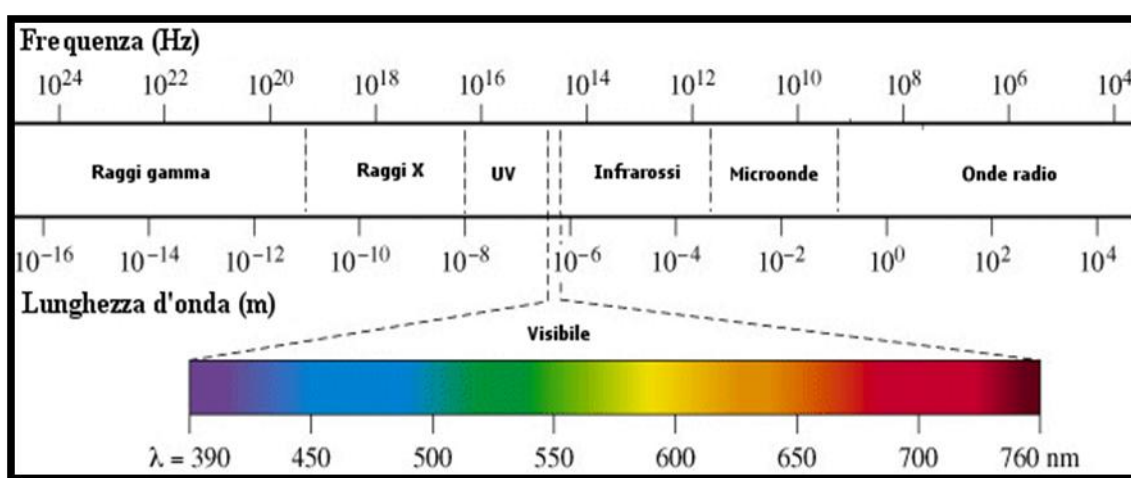
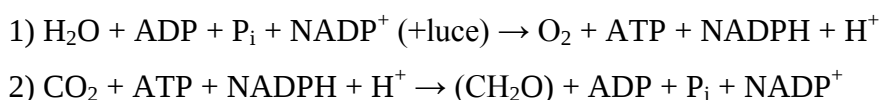


Figura 1.10 - Spettro elettromagnetico.

Specificatamente l'energia luminosa permette la sintesi di carboidrati e la generazione di ossigeno dal biossido di carbonio e l'acqua (Smith, 1997). Questo processo può essere schematizzato con due reazioni:



La prima reazione è chiamata “fase luminosa” in quanto dipende dalla luce. L'energia solare viene utilizzata dalla pianta per ossidare le molecole di acqua e ottenere O_2 e protoni che sono poi utilizzati nella sintesi chemiosmotica di ATP e NADPH.

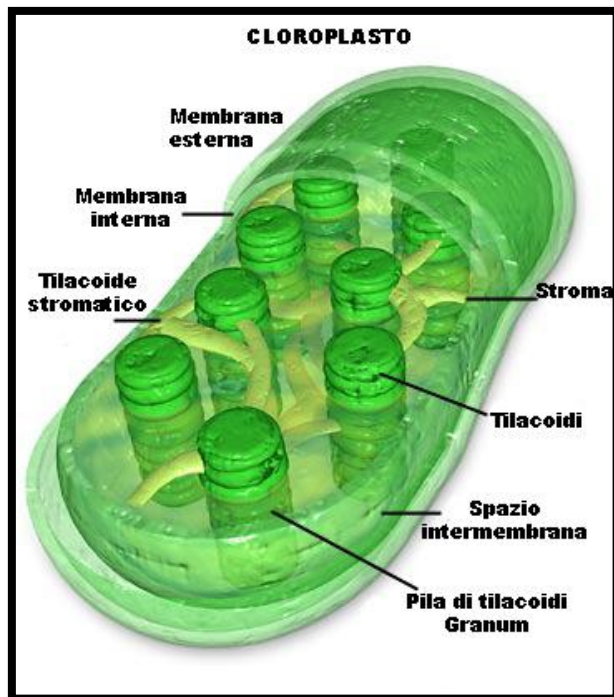


Figura 1.11 - Struttura interna del cloroplasto.

Nella seconda reazione, chiamata “fase oscura”, l’ATP e il NADPH, prodotti precedentemente, sono utilizzati per ridurre l’anidride carbonica atmosferica (CO_2) in composti organici, principalmente zuccheri.

Queste due reazioni avvengono simultaneamente all’interno di un organulo citoplasmatico chiamato cloroplasto (Figura 1.11).

Il cloroplasto nel suo interno contiene una matrice acquosa (stroma) dove sono presenti enzimi (che prendono parte alla riduzione del carbonio), il plastoma (materiale genetico del cloroplasto) e carboidrati di accumulo. All’interno dello stroma si trovano anche delle membrane che possono essere ripiegate tra loro (tilacoidi) o impilate (grana) che creano la porzione di stroma chiamata lume.

I tilacoidi hanno il compito di catturare i quanti di luce e di portare a termine le reazioni di riduzione dove vengono prodotti O_2 e ATP. Inoltre, i tilacoidi contengono diversi pigmenti essenziali per il processo fotosintetico tra cui il principale è la clorofilla.

Nelle piante superiori sono presenti due diverse tipologie di clorofilla:

- la clorofilla *a* (più abbondante), che assorbe soprattutto la luce blu-violetta e rossa (Figura 1.12);
- la clorofilla *b*, che assorbe soprattutto la luce blu e arancione (Figura 1.12).

La clorofilla viene percepita di colore verde dall’occhio umano in quanto assorbe la luce nelle regioni rossa e blu dello spettro, riflettendo così solo la luce verde (circa 550 nm).

Introduzione

La funzione delle clorofille è quella di assorbire la luce. Tutto ciò può avvenire grazie alla presenza di doppi legami coniugati nella molecola e quanto maggiore è il numero di doppi legami maggiore sarà la lunghezza d'onda assorbita, quindi ogni pigmento assorbirà determinate lunghezze d'onda. La clorofilla *a* ha uno spettro di assorbimento con un picco massimo a 430 nm (blu) e a 663 nm (rosso) e un minimo a 450 nm e a 640 nm. La clorofilla *b* invece ha due picchi di assorbimento più interni rispetto alla clorofilla *a* e di altezze invertite.

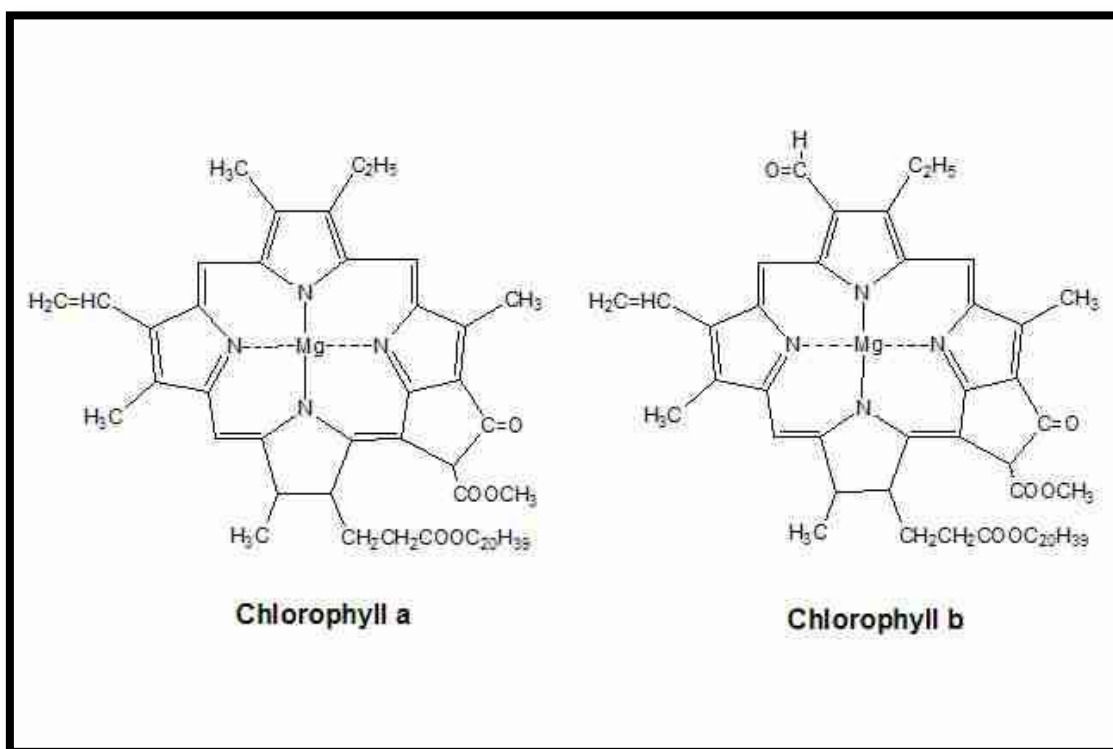


Figura 1.12 - Struttura molecolare della clorofilla *a* e della clorofilla *b*. La struttura consiste in un anello porfirinico contenente al centro un atomo di magnesio e intorno quattro atomi di azoto circondati da atomi di carbonio; inoltre la clorofilla è composta da una lunga catena di idrocarburi attaccati all'anello porfirinico. La differenza molecolare tra la clorofilla *a* e *b* riguarda la sostituzione di un gruppo metilico ($-\text{CH}_3$) con un gruppo aldeidico sull'anello porfirinico.

Inoltre, oltre alle clorofille, sono presenti pigmenti accessori quali i carotenoidi. I carotenoidi, oltre a catturare la luce con lunghezze d'onda differenti rispetto alla clorofilla, svolgono l'importante funzione di agenti fotoprotettivi, impedendo i danni dovuti a processi fotoossidativi.

Sono antiossidanti efficienti perché trasformano l'ossigeno singoletto, che si origina in condizioni di stress, in ossigeno molecolare non più tossico. I carotenoidi

Introduzione

interagiscono sinergicamente con gli altri antiossidanti, inoltre l'azione congiunta di più carotenoidi è più efficace nella protezione rispetto all'effetto di singoli composti. Il loro meccanismo d'azione permette di convertire l'energia contenuta nei radicali dell'ossigeno in calore che viene smaltito dalla pianta attraverso la superficie fogliare.

Le bande di assorbimento nella regione fra i 400 e i 500 nm impartiscono ai carotenoidi il loro caratteristico colore arancio.

L'apparato fotosintetico, nei tilacoidi, è composto da due centri di reazione: il fotosistema I (PSI) e il fotosistema II (PSII).

Il PSI è formato da un LHC (Light Harvesting Complex), o complesso antenna, con un picco di assorbimento a 700 nm, mentre il PSII, anch'esso composto da un LHC, ha un picco di assorbimento a 680 nm,

Entrambi i fotosistemi, grazie ai LHC, captano l'energia luminosa e la convogliano verso il centro di reazione dove sono presenti molecole di clorofilla.

La fase luminosa della fotosintesi ha inizio quando le molecole di clorofilla del PSII assorbono un fotone (proveniente dalla luce) passando a un livello energetico superiore o stato eccitato che viene gradatamente trasferito al centro di reazione (Figura 1.13).

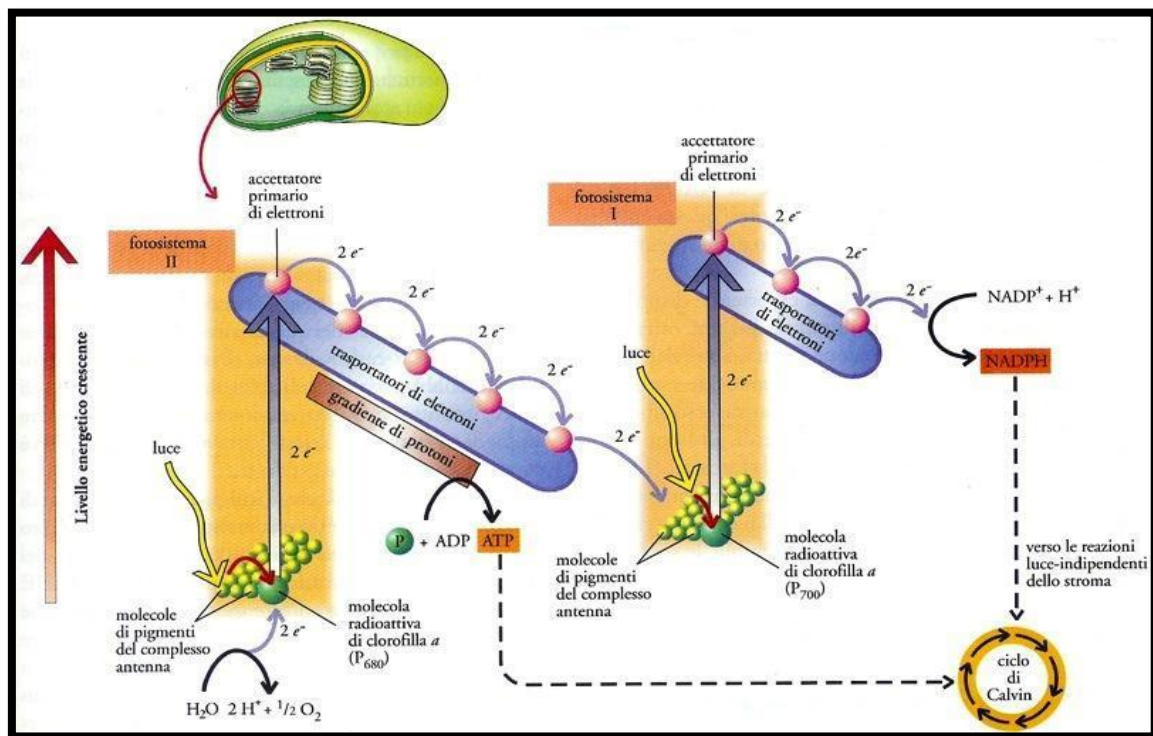


Figura 1.13 - Rappresentazione schematica delle reazioni luce-dipendenti della fotosintesi.

Introduzione

Il PSII quindi diventa un riducente e provoca la scissione di due molecole d'acqua in O_2 e protoni che vengono trasferiti nella catena di trasporto elettronico, che a sua volta, trasporta gli elettroni verso il PSI.

Il PSI, dopo l'assorbimento di un fotone da parte della clorofilla, si trova in una forma eccitata e tenderà a cedere gli elettroni acquistati precedentemente a degli accettori che ridurranno il NADP in NADPH.

Durante questo processo vi è un cambio di distribuzione dei protoni fra stroma e lume (scissione H_2O e formazione NADPH) creando un gradiente protonico. La dissipazione del gradiente protonico transmembrana fornisce energia per la sintesi di ATP tramite l'enzima ATP-sintetasi.

L'ATP e il NADPH sintetizzati durante la fase luminosa della fotosintesi, sono poi utilizzati nella fase oscura (ciclo di Calvin) per l'organizzazione della CO_2 con la formazione finali di zuccheri (Figura 1.14).

Il processo fissa un atomo di carbonio proveniente da una molecola di anidride carbonica gassosa su una molecola a 5 atomi di carbonio, il ribulosio-1,5-bisfosfato (RuPB), grazie ad un enzima chiamato RuBisCO (ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi ossigenasi) portando alla formazione del glucosio.

In generale tutte le reazioni del ciclo di Calvin sono riassumibili con la seguente espressione:

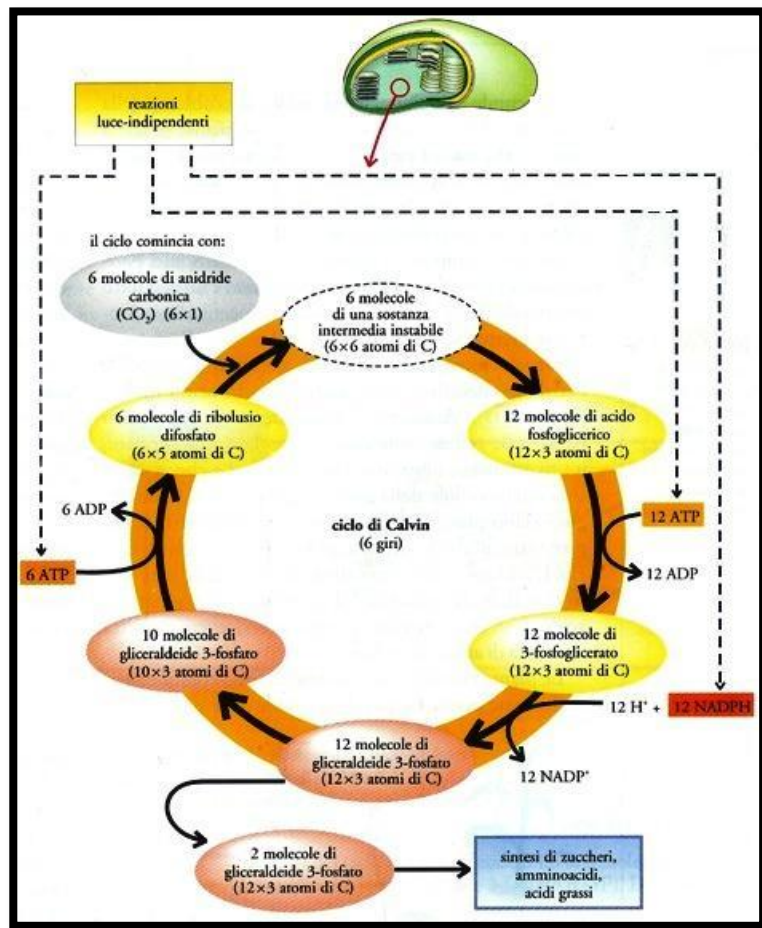
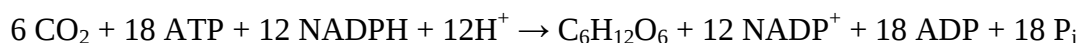


Figura 1.14 - Ciclo di Calvin. Nello schema sono rappresentati sei giri, il numero necessario affinché si ottengano due molecole di gliceraldeide 3-fosfato.

Introduzione



L'intensità luminosa è un fattore fondamentale del determinare l'attività fotosintetica di una pianta.

Per descrivere il comportamento delle piante, e quindi dell'attività fotosintetica, in funzione dell'intensità luminosa si utilizza una curva che mette in relazione la velocità fotosintetica (P) e l'irradianza (I) (Figura 1.15).

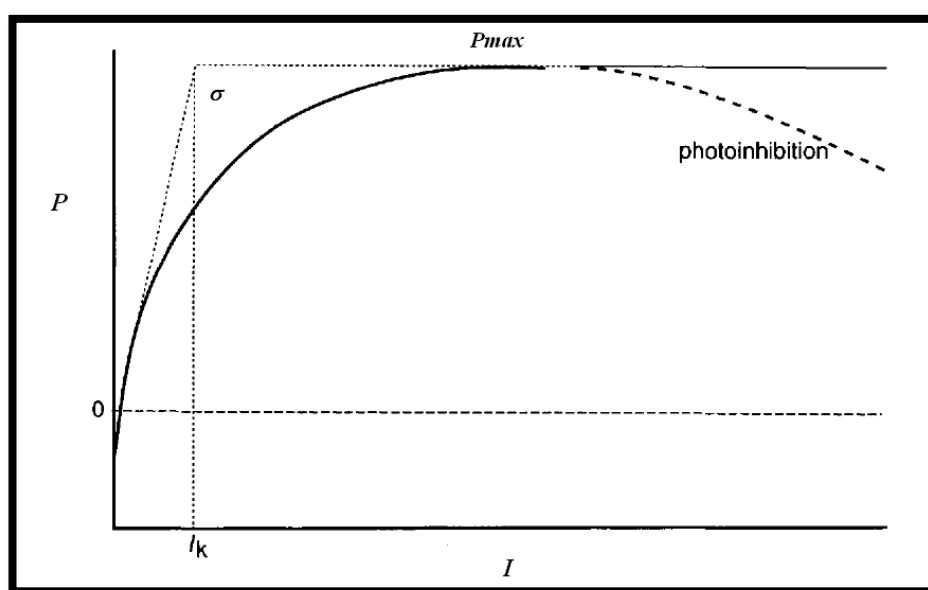


Figura 1.15 - Variazione della capacità fotosintetica P in funzione dell'intensità luminosa I a cui sono sottoposte le piante. (Richmond A., 2004).

Inizialmente, la velocità di fotosintesi è direttamente proporzionale all'intensità luminosa. Questa prima fase è definita “luce limitante” in quanto la velocità di assorbimento dei fotoni determina la velocità di trasporto degli elettroni dall'acqua all'anidride carbonica.

Successivamente viene raggiunto un plateau, ossia una saturazione, dato che la fotosintesi non è più dipendente dalla luce. In questa fase, chiamata “luce saturante”, vi è una diminuzione dell'efficienza fotosintetica dovuta al fatto che la relazione tra l'attività fotosintetica e la luce non è più lineare. Il valore di fotosintesi che viene raggiunto durante la fase di saturazione rappresenta la velocità fotosintetica massima ($P_{\max}$), chiamato anche “capacità fotosintetica”. Inoltre, $P_{\max}$ risulta essere fortemente

Introduzione

dipendente dalla temperatura e da fattori correlati con il metabolismo cellulare, in particolare dalle reazioni della fase oscura della fotosintesi. L'intensità luminosa I_k è il prolungamento della retta della pendenza iniziale che interseca il prolungamento della retta di P_{max} e rappresenta l'intensità luminosa in cui avviene la saturazione.

Infine, c'è la fase di "luce inibente" in cui la fotosintesi diminuisce all'aumentare dell'intensità di luce. Questo fenomeno sembra essere una conseguenza della fotossidazione e sembra diventi più pronunciato quando le piante sono sottoposte a prolungate esposizioni ad alte intensità luminose, ad elevate temperature e a carenza di nutrienti, determinando danni alle componenti del fotosistema.

Una bassa intensità luminosa limita la fotosintesi creando squilibri nella crescita della specie, ma anche un'alta intensità causa danni da stress all'apparato fotosintetico fino a comprometterne gravemente il funzionamento.

L'effetto dell'irradianza crea quindi due risposte da parte della pianta:

1. risposta statica, causata dall'acclimatamento verso esposizioni di intensità luminose costanti nel tempo;
2. risposta dinamica, causata dall'adattamento fotosintetico in risposta a cambi improvvisi di intensità luminose, processo definito fotoacclimatazione.

Queste capacità di adattamento della pianta variano a seconda della specie e delle situazioni, tanto da poter affermare che le diverse risposte fotosintetiche alle condizioni ambientali siano un carattere fortemente conservativo (Jones, 2006).

1.8 La nutrizione delle piante: l'Azoto

Gli elementi essenziali vengono di solito classificati come macronutrienti o micronutrienti, secondo le loro concentrazioni relative nel tessuto vegetale.

I macronutrienti (C, H, O, N, P, S, Ca, Mg, K, Cl) sono richiesti in notevoli quantità per la crescita della pianta. Si tratta di molecole che formano strutture biologiche rilevanti.

Introduzione

I micronutrienti, invece, sono richiesti in tracce o in piccole quantità per la crescita della pianta. Si tratta di metalli (Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo) ed hanno funzioni enzimatiche (parte integrante di enzimi).

Tuttavia, è stato riscontrato in alcuni casi che la quantità dei microelementi era maggiore dei macronutrienti, quindi è stata avanzata l'idea di una nuova classificazione dei nutrienti.

In questo modo gli elementi nutritivi sono stati classificati in quattro gruppi principali:

1. Azoto e zolfo costituiscono il primo gruppo. Questi elementi nutritivi sono assimilati dalla pianta nelle reazioni biochimiche di ossidazione e riduzione per formare legami covalenti con il carbonio e creare composti organici ad elevato valore biologico come gli amminoacidi, le proteine, gli acidi nucleici, etc;
2. Il secondo gruppo (P, Si, B) è importante nelle reazioni di stoccaggio dell'energia o nel mantenere l'integrità strutturale.
3. Il terzo gruppo di elementi (K, Ca, Mg, Cl, Mn, Na) è presente nei tessuti vegetali sotto forma di ioni liberi disciolti nell'acqua dei tessuti, o legati elettrostaticamente a sostanze di vario tipo.
4. Il quarto gruppo (Fe, Zn, Cu, Ni, Mo) riveste un ruolo importante nelle reazioni di trasferimento ionico.

Questi elementi vengono assorbiti dalle piante mediante le radici dal suolo. L'assorbimento minerale vegetale è un processo ad alta efficienza garantito dalla grande superficie delle radici e dalla loro capacità di assorbire ioni inorganici, anche a basse concentrazioni, dal terreno. Gli elementi minerali, dopo essere stati assorbiti dalle radici, sono traslocati alle varie parti della pianta, dove sono impiegati in importanti funzioni biologiche.

La disponibilità di questi elementi, la luce solare e la capacità di assimilare CO₂ permette alle piante di crescere e di sintetizzare tutti i composti di cui hanno bisogno per crescere normalmente (Stitt e Krapp, 1999).

Tra i macroelementi richiesti dalle piante, l'azoto è senza dubbio quello più utilizzato e quello maggiormente limitante la crescita (Marschner, 1995) e è l'elemento

Introduzione

minerale più richiesto dai vegetali che nel suolo devono competere per la sua acquisizione con fattori abiotici e biotici.

Rappresenta il 2-4%, in termini di peso secco, della pianta ed è il componente essenziale degli amminoacidi, delle proteine (e quindi degli enzimi), acidi nucleici e di composti meno fondamentali ma essenziali quali clorofilla, citochine e poliammine.

L'energia e le strutture carboniose indispensabili per l'incorporazione dell'N derivano dalla fotosintesi, che a sua volta dipende dalla clorofilla, un composto a base di N. 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.

Le piante sono in grado di assorbire e assimilare l'azoto legato inorganicamente e per questo vengono definiti organismi autotrofi per l'N, che viene assorbito dal terreno sotto forma di ione ammonio (NH_4^+) e ione nitrato (NO_3^-). Queste forme inorganiche rappresentano solamente una piccola parte della disponibilità di azoto presente nel nostro pianeta poiché si trova per lo più (circa l'80% di azoto totale) in forma molecolare (N_2) nell'atmosfera. Purtroppo solo pochi microrganismi sono in grado di convertire l'azoto molecolare per renderlo disponibile alle piante.

In particolare, la pianta predilige l'assorbimento dal suolo dello ione NO_3^- seguito dalla sua riduzione a ammonio nei tessuti vegetali. L'ammonio prodotto viene organicato tramite l'attività di enzimi che sono in grado di fissarlo in scheletri carboniosi forniti a loro volta dai processi metabolici di base (glicolisi o fotosintesi).

Il nitrato assorbito dalle radici può essere ridotto e assimilato nelle radici stesse, oppure può essere trasferito alle foglie come NO_3^- per essere poi, successivamente, ridotto ed assimilato. Inoltre, lo ione nitrato può anche essere immagazzinato nei vacuoli delle cellule di entrambi gli organi come riserva.

L'incorporazione dell'azoto nitrico in composti organici azotati è divisa in tre fasi principali:

1. riduzione del nitrato a ione ammonio ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$);

Introduzione

2. assimilazione dello ione NH_4^+ in composti organici tramite il ciclo della glutammina;
3. sintesi degli amminoacidi attraverso l'utilizzo del glutammato e/o della glutammina come fonte di gruppi amminici o ammidici.

La prima reazione di riduzione del nitrato è catalizzata dal complesso metalloenzima nitrato riduttasi (NR) presente nel citoplasma e consiste nella riduzione del nitrato a ione nitrito (NO_2^-).

La NR è localizzata nel citosol delle cellule di tutti gli organi vegetativi della pianta (radici e foglie soprattutto) e la sua distribuzione dipende dalle condizioni ambientali di crescita e dalla specie.

La regolazione della NR gioca un ruolo chiave nell'assimilazione del nitrato catalizzando il passaggio che limita la velocità di conversione del nitrato ad ammonio.

L'attività della NR è regolata da diversi fattori, tra i quali la luce assume un ruolo molto importante. Nei tessuti verdi la luce, attivando i fotosistemi, stimola il trasporto dello ione nitrato accumulato nel vacuolo al citosol e la sua successiva riduzione a NO_2^- in quanto la disponibilità di ferredossina ridotta (impiegata nella successiva fase di riduzione dalla nitrito riduttasi per la formazione di ammonio, $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$) assicura che il nitrito non si accumuli a livelli tossici.

Poiché nelle piante la riduzione dei nitrati può avvenire sia a livello radicale che nelle foglie, la localizzazione della riduzione dipende dalla quantità di nitrati assorbiti, dalla specie vegetale e dall'età della pianta. In presenza di basse quantità di nitrati la riduzione avviene preferibilmente nelle radici.

Aumentando la quantità di nitrato la capacità delle radici di ridurre questo anione diventa un fattore limitante e di conseguenza aumenta la quantità di nitrato ridotto a livello fogliare.

Nelle foglie esposte a basse intensità luminose può verificarsi una competizione tra la riduzione della CO_2 (per la formazione di zuccheri) e quella dei nitrati. Quando le piante vengono esposte al nitrato, esse deviano il carbonio dalla sintesi di amido verso la produzione di amminoacidi ed acidi organici controllando la sintesi e l'attività di enzimi chiave.

Introduzione

Il nitrato, quindi, agisce come un segnale che permette alle piante di modificare il flusso di carbonio verso composti che favoriranno l'assimilazione dell'azoto negli amminoacidi (Izzo e Quartacci, 2010).

Le piante assimilano l'azoto inorganico negli amminoacidi (glutammato, glutammina, aspartato e asparagina). L'azoto assimilato nel glutammato e nella glutammina è efficacemente distribuito al metabolismo della pianta in quanto questi amminoacidi forniscono l'azoto per la biosintesi di altri amminoacidi, acidi nucleici e composti azotati in genere.

L'amminoacido ammidico glutammina rappresenta uno dei composti più importanti per il trasporto dell'azoto nella maggior parte delle specie vegetali. La glutammina è particolarmente adatta a questo compito poiché può passare rapidamente dallo xilema al floema, presentando un alto rapporto azoto/carbonio e trasportando ammoniaca NH_3 in una forma non tossica.

La via metabolica di conversione dell'ammonio in azoto organico è il risultato dell'attività di due enzimi: la glutammina sintetasi (GS) e la glutammato sintasi (GOGAT). In questo processo lo ione NH_4^+ viene assimilato come gruppo ammidico per la sintesi di glutammina in una reazione catalizzata dalla GS e successivamente per intervento della GOGAT la glutammina trasferisce il gruppo ammidico all' α -chetoglutarato formando così due molecole di glutammato (Figura 1.16)

In particolare, la GS è un enzima ATP-dipendente e può essere localizzata nel citosol o nel plastidio (maggiormente nel cloroplasto) e la reazione catalizzata dalla GS è la via preferita per l'assimilazione dello ione NH_4^+ nella pianta.

L'enzima presenta un alto grado di affinità per lo ione, motivo per cui può operare anche a basse concentrazioni, evento che si verifica spesso nell'ambiente cellulare.

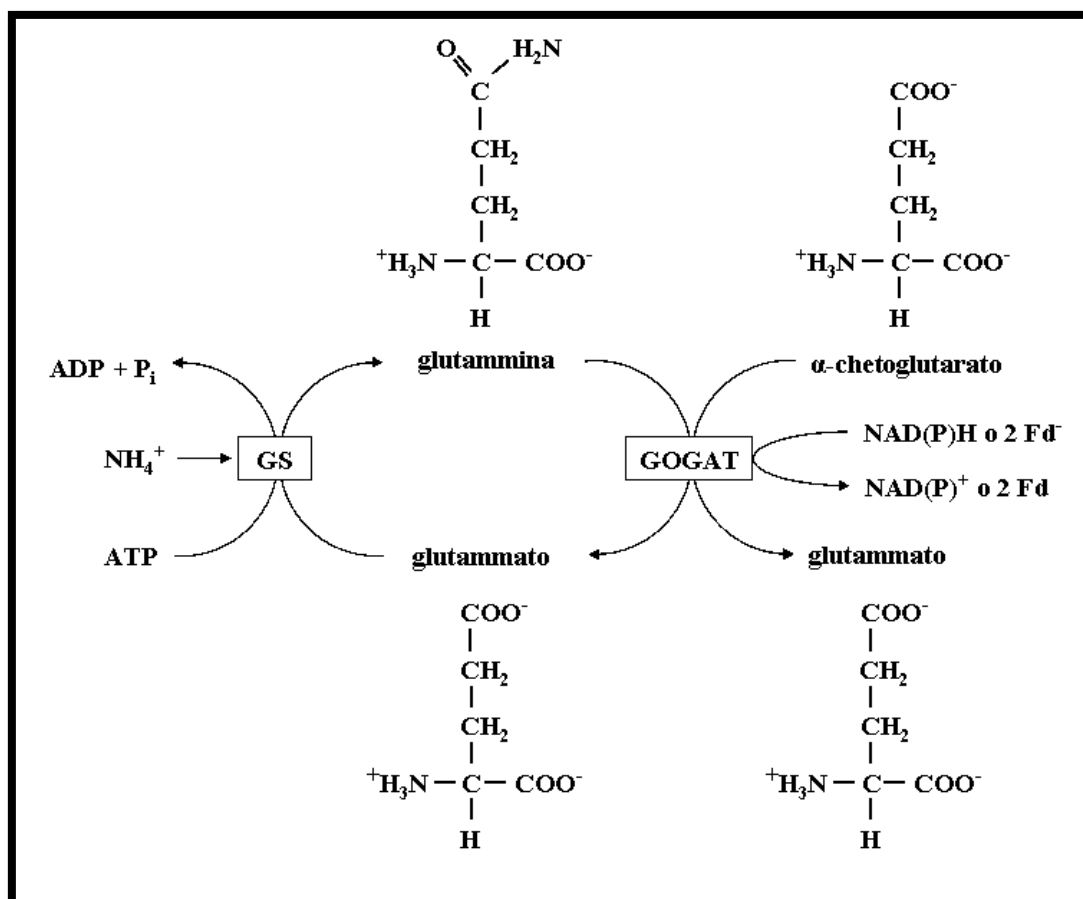


Figura 1.16 - Schema di assimilazione dello ione ammonio tramite la GS e la GOGAT (Izzo e Quartacci, 2010).

Inoltre, il consumo di ATP rende il ciclo praticamente irreversibile. Questo enzima viene attivato da alte concentrazioni di ATP e ioni Mg^{2+} , oltre che da alti valori di pH, condizioni che si verificano nello stroma dei cloroplasti quando si ha illuminazione. Pertanto, la luce stimola l'assimilazione dell'ammonio nei cloroplasti e ne impedisce l'accumulo. Forse a causa dell'alto rapporto N/C rispetto alla maggior parte degli altri composti, la glutammina si è evoluta come principale forma di riserva di azoto.

La reazione di assimilazione richiede come substrato il glutammato che viene fornito tramite la reazione catalizzata dalla GOGAT, cioè dal secondo stadio del processo in cui avviene il trasferimento del gruppo ammidico della glutammina al carbonio carbonilico dell'α-chetoglutarato (proveniente dal ciclo di Krebs), con formazione di due molecole di glutammato. Una delle due molecole di glutammato viene richiesta dalla GS per il mantenimento del ciclo di assimilazione dell'ammonio,

mentre l'altra può essere utilizzata per la biosintesi di altri amminoacidi (Izzo e Quartacci, 2010).

Nei terreni forestali, la quantità di azoto disponibile per essere assimilato dalle radici della piante e il $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio sono strettamente correlati ai processi di amminificazione, nitrificazione e denitrificazione (Heynes e Goh, 1978).

1.9 La perossidazione lipidica

Tutti gli esseri viventi sono esposti quotidianamente a fattori ambientali dotati di capacità lesive nei confronti degli organismi.

In particolare, negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata sullo studio dei radicali liberi e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di come possono modificare metabolismo, struttura e funzionamento cellulare nelle cellule, nei tessuti e in generale nell'organismo (Allen, 1995; Schützendübel e Polle, 2002).

Queste alterazioni provocano un danno enorme in senso tossico, come la morte cellulare, l'arresto o il rallentamento della crescita o della replicazione cellulare.

Tuttavia, gli esseri viventi sono dotati di complessi e funzionali sistemi antiossidanti in grado di difendere l'organismo rappresentando quindi un meccanismo di difesa endogeno.

Un danno da stress ossidativo si verifica quando gli agenti ossidanti superano le barriere antiossidanti e può essere causato sia da fattori che potenziano la produzione di specie reattive dell'ossigeno sia da fattori che inibiscono o riducono i sistemi di difesa antiossidanti.

I radicali liberi sono atomi o molecole che presentano un elettrone spaiato il quale rende il radicale altamente reattivo con molecole sensibili poste in vicinanze della sede in cui vengono prodotti. I radicali, acquistando o cedendo elettroni, causano un danno irreversibile ai tessuti, determinando necrosi e apoptosi, e sono in grado di modificare il metabolismo causando un invecchiamento o una morte precoce alle cellule.

Durante lo stress ossidativo, catalizzato dalla presenza di luce e calore, la perossidazione dei lipidi (reazione fra ossigeno molecolare e lipidi) è una delle più importanti cause del danneggiamento cellulare nelle piante. Infatti, la perossidazione

Introduzione

causa variazioni nella composizione degli acidi grassi, che regolano la struttura e varie funzioni delle membrane cellulari, come l'inattivazione delle proteine legate alle membrane o l'aumento delle permeabilità delle stesse.

Inoltre, il danno causato dalla perossidazione può avere conseguenze sulla respirazione mitocondriale, può danneggiare i pigmenti e causare perdite della capacità fotosintetica nei cloroplasti.

Le lipossigenasi (LOX) sono enzimi coinvolti nella fase di sviluppo della pianta, nella biosintesi di diverse molecole regolatrici e inoltre sono coinvolti nella risposta a stress esogeni (Siedow, 1991).

Nelle piante questi enzimi catalizzano la reazione di ossidazione di acidi grassi polinsaturi (come per esempio l'acido linoleico e linolenico) caratterizzati da una struttura chimica *cis*-1,4-pendiene, producendo i corrispettivi idroperossidi coniugati (Whitaker, 1994).

Gli idroperossidi sono composti altamente reattivi che portano alla formazione di metaboliti tossici, fra cui l'aldeide volatile Malondialdeide (MDA). La MDA può essere considerata un marker dello stato perossidato dei tessuti biologici (Bailly *et al.*, 1996), essendo quest'ultima un prodotto di decomposizione degli idroperossidi di acidi grassi polinsaturi.

La MDA è in grado di danneggiare l'acido nucleico DNA, con la formazione di addotti alla deossiguanosina e alla deossiadenosina (Marnett, 1999), e inoltre può inattivare enzimi presenti nei tessuti vegetali come la ribonucleasi (Du e Bramlage, 1992).

2. Scopo della Tesi

Le foreste sono una risorsa vitale da cui dipende la sopravvivenza degli esseri viventi e di cui la popolazione mondiale non può fare a meno per la produzione di legno, per la qualità dell'aria che si respira e per il ruolo fondamentale che svolgono nella regolazione climatica.

Attualmente, gli ecosistemi forestali si trovano ad affrontare gravi problemi di sostenibilità a causa dei repentini cambiamenti climatici.

Purtroppo, le foreste hanno una limitata capacità di adattamento ai cambiamenti che si traduce in una perdita di biodiversità forestale con conseguenze sull'ecosistema generale.

Emerge quindi la necessità di ottenere materiale di propagazione forestale che, grazie alle caratteristiche genetiche, morfologiche e fisiologiche, sia in grado di poter offrire maggiori garanzie d'attecchimento, d'adattabilità e di rapido accrescimento per assicurare il successo dell'arboricoltura da legno e degli imboschimenti.

Un metodo per ottenere materiale forestale su larga scala, più rapidamente e con minor uso di risorse è quello di utilizzare camere di crescita durante le primissime fasi di vita della pianta (pre-coltivazione), dove è possibile controllare temperatura, umidità e intensità luminosa in modo da soddisfare le esigenze di crescita delle piante.

Il progetto europeo Regen-Forest ha come obiettivo quello di sperimentare l'efficacia di lampade a LED di nuova generazione durante la fase di pre-coltivazione e di sviluppare e costruire un prototipo di camera di crescita per una produzione economicamente e ambientalmente sostenibile di materiale forestale utilizzando i LED come fonte luminosa.

In quest'ottica è stata sviluppata la tesi di dottorato, che è stata focalizzata sullo studio delle risposte metaboliche delle piantine 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 ma con esigenze ecologiche diverse, quali il faggio (*Fagus sylvatica* L.), il leccio (*Quercus ilex*

Scopo della Tesi

L.) e la sughera (*Quercus suber* L.), coltivate su due substrati di crescita (Jiffy e DAFNE).

Le piantine sono state allevate con il nuovo metodo di coltivazione (pre-coltivazione) in camere di crescita, in contenitori molto piccoli e per un brevissimo periodo di coltura (Mattson *et al.*, 2010).

In particolare, considerando che i primi 30-40 giorni di vita della pianta sono i più critici per le caratteristiche funzionali e per le loro successive prestazioni in campo, è stata testata l'efficacia dell'illuminazione a LED in rapporto alle lampade fluorescenti in termini di crescita delle piante (contenuto di clorofilla, pigmenti accessori e proteine).

Inoltre, sono state analizzate le variazioni dell'attività di enzimi coinvolti nel meccanismo di assimilazione dell'azoto (NR e GS).

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. D'altra parte, 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.

Infine, è stato analizzato l'effetto delle diverse condizioni di crescita sul livello di perossidazione dei lipidi, utilizzando come indice la concentrazione di malondialdeide (MDA), un indicatore dello stress ossidativo.

La seconda fase di questo lavoro è stata quella di valutare la risposta delle piante, pre-coltivate con illuminazione a LED o fluorescente, dopo che sono state trasferite in serra o in piena terra, utilizzando la stessa metodologia di indagine.

Come previsto dal progetto europeo, è stata costruita una camera di crescita sperimentale chiamata Prototipo Regen-Forest. Di conseguenza, sono stati studiati gli effetti di questo nuovo metodo colturale sulle piantine forestali esposte ad uno dei

Scopo della Tesi

quattro spettri LED precedentemente utilizzati nelle tradizionali camere di crescita e che era risultato il più adatto a sostenere lo sviluppo della gran parte delle specie forestali sperimentate nell'ambito del progetto.

3. Materiali e Metodi

3.1 I semi

3.1.1 Faggio

I semi di faggio sono stati raccolti nell'autunno 2011 e nell'autunno 2013 (rispettivamente seminati nel terreno Jiffy e nel terreno DAFNE) nella faggeta vetusta situata sui Monti Cimini (Figura 3.1).



Figura 3.1- Semi di faggio.

Una volta raccolti, è stato effettuato il test di vitalità del seme utilizzando una soluzione di Sali di tetrazolio all'1% come colorante (Vankus, 1997). I semi sono stati immersi in una soluzione acquosa all'1% di sale di tetrazolio (bromuro o

cloruro di 2,3,5-trifeniltetrazolo), per 24 ore al buio e a temperatura ambiente (ISTA, 2004). 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.

Una volta valutata la vitalità, i semi, da utilizzare nelle prove sperimentali, sono stati immersi in acqua per 24 ore sia per consentirne la totale imbibizione che per separare quelli vani.



Figura 3.2 - Contenitore utilizzato per la vernalizzazione delle faggiole.

I semi di faggio sono dormienti ed hanno bisogno di essere vernalizzati a 4°C per 3-5 mesi per poter germinare.

Pertanto, circa 2000 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.

I semi sono stati sistemati su agriperlite disposta su tessuto-non tessuto, poggiato a sua volta su un ponte di rete metallica. L'umidità ai semi è stata assicurata da dei cordoncini di cotone che pescavano nell'acqua sterile sottostante (Fig. xxx).

Quindi i semi sono stati vernalizzati 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.

3.1.2 Leccio

I semi di leccio sono stati raccolti in due periodi: autunno 2011 e autunno 2013 nella Riserva Naturale Villa Lante situata a Bagnaia in provincia di Viterbo (rispettivamente seminati nel terreno Jiffy e nel terreno DAFNE) e il materiale è stato subito selezionato scartando i semi eccessivamente disidratati e infetti.



Figura 3.3 - Contenitore utilizzato per la conservazione delle ghiande.

Come descritto precedentemente, i semi di leccio sono recalcitranti e per la loro conservazione è stato utilizzato il metodo Suszka (2000) che prevede l'utilizzo di un contenitore chiuso non ermeticamente e dotato al suo interno di un tubo perforato per lo scambio d'aria (Figura 3.3). Inoltre, della perlite o torba asciutta è stata mescolata ai semi per evitare il loro surriscaldamento.

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 8-10 giorni o



Figura 3.4 - Contenitore con agriperlite utilizzato per la germinazione delle ghiande.

comunque fino a quando le radici non avessero raggiunto una lunghezza di 2-3 mm (Figura 3.4).

3.1.3 Sughera

Le ghiande di sughera sono state raccolte in un bosco naturale situato nel comune di Tuscania, in provincia di Viterbo, nell'autunno 2012 e autunno 2013 (rispettivamente seminati nel terreno Jiffy e nel terreno DAFNE) e il materiale è stato subito selezionato

scartando i semi disidratati o infetti.

Come descritto precedentemente, i semi di sughera sono recalcitranti e per la loro conservazione è stato utilizzato il metodo Suszka (2000) testé esposto (Figura 3.3).

Le ghiande, conservate in camera fredda a +4° C per circa 6 mesi, sono state reidratate per 48 ore in acqua corrente. Successivamente, i semi sono stati trattati con una soluzione al 10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (ipoclorito di calcio, 6% di Cl attivo), sciacquati per tre volte e privati di un terzo dei cotiledoni.

Le ghiande sono state successivamente poste in un contenitore, contenente perlite sterile, al buio a 20° C, per circa 8-10 giorni o comunque fino a quando le radici non avessero raggiunto una lunghezza di 2-3 mm (Figura 3.4).

3.2 Contenitori e substrato di crescita

I contenitori utilizzati per la crescita in ambiente controllato sono contenitori alveolari QPD144 QuickPot (HerkuPlast-Kubern, Germania) aventi dimensioni 310x530 mm, con una densità di produzione di 870 piante per m^2 , con un'altezza di 60 mm e un volume di substrato di 28 cc (Figura 1.2). La grandezza dei contenitori è stata scelta in base alle dimensioni che raggiungono le piantine delle tre specie dopo un mese

Materiali e Metodi

di allevamento. Un esempio di vasoio a fine ciclo colturale in camera di crescita è riportato in Figura 3.5.



Figura 3.5 - Vassoi visti dall'alto di leccio e sughera, rispettivamente, al termine del ciclo colturale nelle camere di crescita.

I contenitori sono stati posti su dei vassoi di plastica (Herkuplast-Kubern, Germany), per l'aggiunta di acqua, e successivamente collocate all'interno delle camere di crescita. Nella Figura 3.6 è possibile notare le dimensioni delle piante, con il relativo panetto di terra, al termine della fase di pre-coltivazione nelle camere di crescita. Successivamente, le piantine delle tre specie forestali sono state rimosse dai contenitori e trapiantate in contenitori più grandi idonei per la crescita in serra.

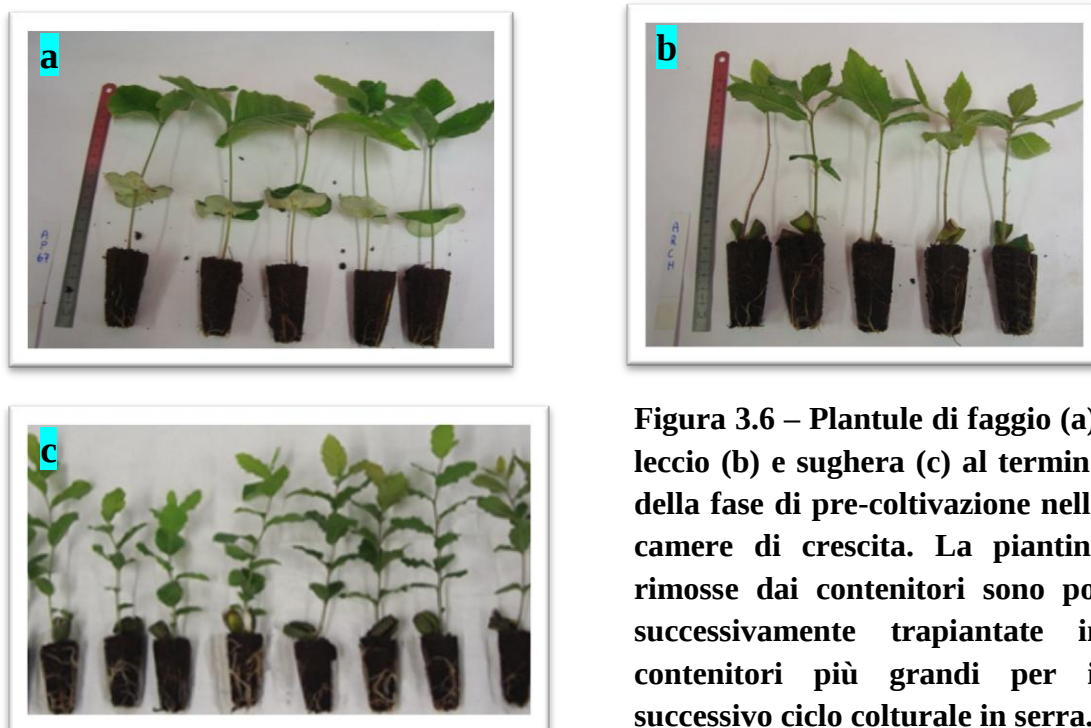


Figura 3.6 – Plantule di faggio (a), leccio (b) e sughera (c) al termine della fase di pre-coltivazione nelle camere di crescita. La piantine rimosse dai contenitori sono poi successivamente trapiantate in contenitori più grandi per il successivo ciclo colturale in serra.

Materiali e Metodi

I contenitori utilizzati per la fase di sperimentazione in serra sono contenitori alveolati QPD 40T/18 QuickPot (HerkuPlast-Kubern, Germania) aventi dimensioni 396x296 mm con un'altezza di 185 mm (Figura 3.7).

I substrati di crescita utilizzati sono stati i seguenti:

1. Jiffy: Preforma PP01, Jiffy® Products, prodotto in Norvegia
2. DAFNE: prodotto dall'Università degli Studi della Tuscia contenente 65% terriccio commerciale (reperibile in qualsiasi vivaio), 30% agriperlite e 5% sabbia.



Figura 3.7- Contenitori alveolati utilizzati nella fase sperimentale in serra.

Il terreno è stato trattato con una soluzione fungicida 1.5% (w/v) Teldor (Bayer) per evitare la comparsa di muffe.

3.3 Lampade utilizzate e condizioni di crescita

Come previsto dal progetto di ricerca, sono state testate nelle camere di crescita quattro diverse lampade LED di nuova generazione, fornite dalla ditta *Valoya* partner del progetto, in rapporto alle lampade fluorescenti OSRAM (L 36W/77 Fluora), caratterizzate da un'alta percentuale nel rosso (Figura 3.8a), tradizionalmente utilizzate per la crescita di piante in ambiente controllato.

Queste lampade a LED sono basate sulla nuova tecnologia *Valoya* che produce uno spettro ampio e continuo grazie a una miscela di LED blu (B) (photosynthetic photon flux PPF 400-500 nm), verde (G) (PPF 500-600 nm), rosso (R) (PPF 600-700 nm) e rosso lontano (FR) (PPF 700-800 nm) mentre i LED commerciali attualmente hanno una combinazione di diodi R e B, tralasciando le altre lunghezze d'onda della luce.

Le lampade a LED utilizzate hanno le seguenti caratteristiche (Tabella 3.1):

Tabella 3.1 - Percentuale di colore presente nello spettro fluorescente e LED utilizzati in questo studio.

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

LED AP67-Arch: luce composta per la maggior parte dallo spettro R, con percentuali di G e di B. 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 (Figura 3.8b);

LED NS2: spettro costituito principalmente dalla luce G, R e B. Questa lampada a alta intensità luminosa è lo spettro che più si avvicina alla luce solare. Questo LED è stato scelto per impedire alla pianta di subire uno stress quando trapiantata in campo aperto o esposta ai raggi solari (Figura 3.8c);

LED AP67: luce composta per la maggior parte dallo spettro R, con percentuali di G, di B e FR. Questo spettro è stato utilizzato con successo per la crescita di specie orticole e di fiori. Questa lampada è la più nota fra gli spettri prodotti da Valoya e è stata utilizzata con successo per la crescita di piante di limone (Figura 3.8d);

LED G2: si differenzia dagli altri spettri per la massiccia presenza di R e FR e le basse percentuali di luce B e G. 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 3.8e).

Le lampade LED sono dotate di un regolatore di luminosità per ottenere $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di luce sulla superficie di crescita delle piante. L'intensità luminosa è stata misurata manualmente sulla parte superiore della pianta tramite un fotoradiometro HD 2302.0 LightMeter Delta Ohm.

Nelle camere di crescita sono stati impostati i seguenti parametri: fotoperiodo di 14 h di luce, umidità relativa (RH) del 70% e una temperatura giorno/notte $22^{\circ} \text{C} / 20^{\circ} \text{C}$ per un periodo di coltura di 30 giorni per il faggio, il leccio e la sughera, sia per le piante cresciute su terreno Jiffy che DAFNE.

L'annaffiatura è stata effettuata ogni due giorni, seguita da una rotazione completa dei vassoi per assicurare condizioni di crescita uniformi. Durante il periodo di pre-coltivazione non sono stati utilizzati pesticidi, fungicidi e fertilizzanti.

Al termine del periodo di pre-coltivazione, le piante di faggio e leccio, con substrato Jiffy, sono state trapiantate in contenitori più grandi e allevate in serra (Figura 3.9a), nel vivaio forestale del DAFNE, per un periodo colturale di 90 giorni, per l'ambientamento alle condizioni naturali.

L'annaffiatura è stata effettuata ogni giorno.

Terminato il ciclo colturale in serra, le piante di faggio e leccio sono state trapiantate in piena terra nel vivaio forestale del DAFNE (Figura 3.9b) per valutare la risposta delle piante al trapianto in ambiente naturale per un periodo colturale di 120 giorni per il faggio e 12 mesi per il leccio al fine di valutare il loro comportamento in

Materiali e Metodi

campo. L'impianto (riportato in Figura 3.10) prevede per ogni spettro una disposizione casuale di tre ripetizioni di 16 piante ciascuna.

L'annaffiatura è stata effettuata ogni giorno con un impianto a goccia automatizzato.

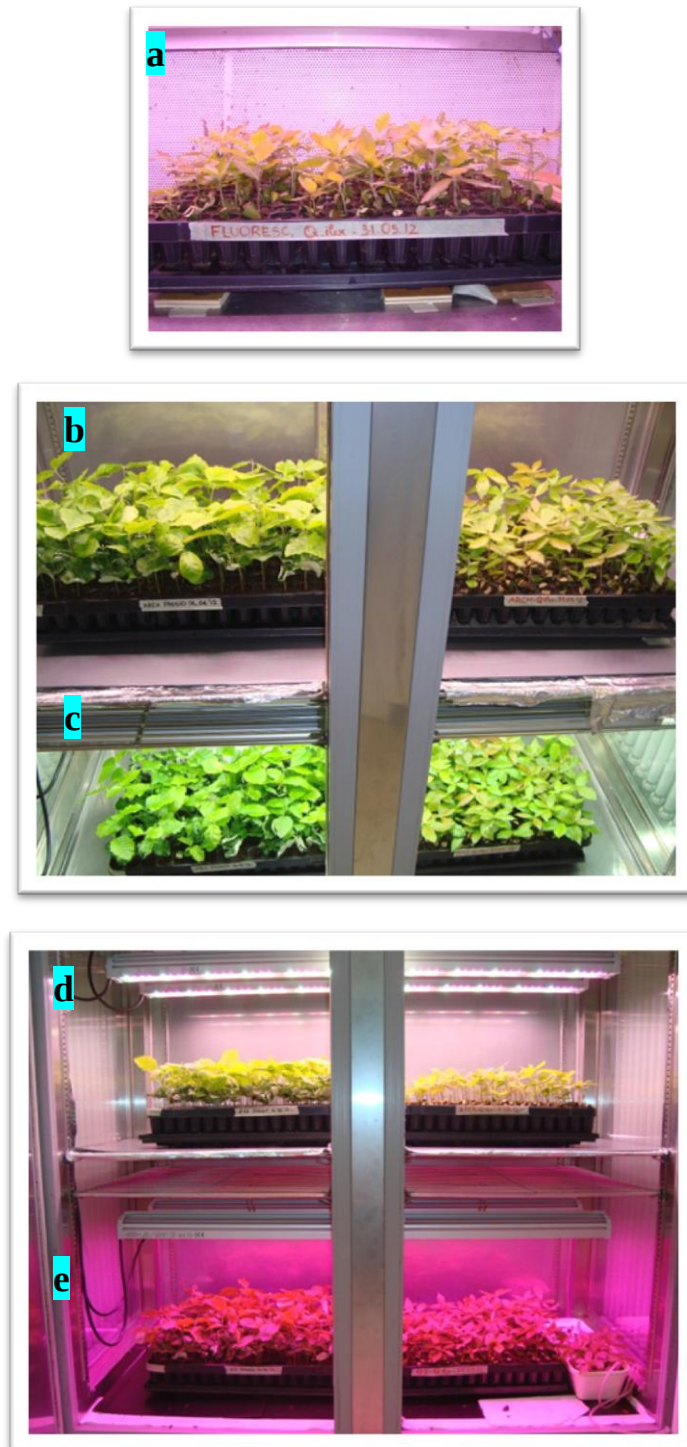


Figura 3.8 - Spettro fluorescente (a), lampada LED AP67-Arch (b), lampada LED NS2 (c), lampada LED AP67 (d) e lampada LED G2 (e).



Tabella 3.9 - Serra (a) e impianto (b) utilizzati per le relative fasi sperimentali del faggio e del leccio.

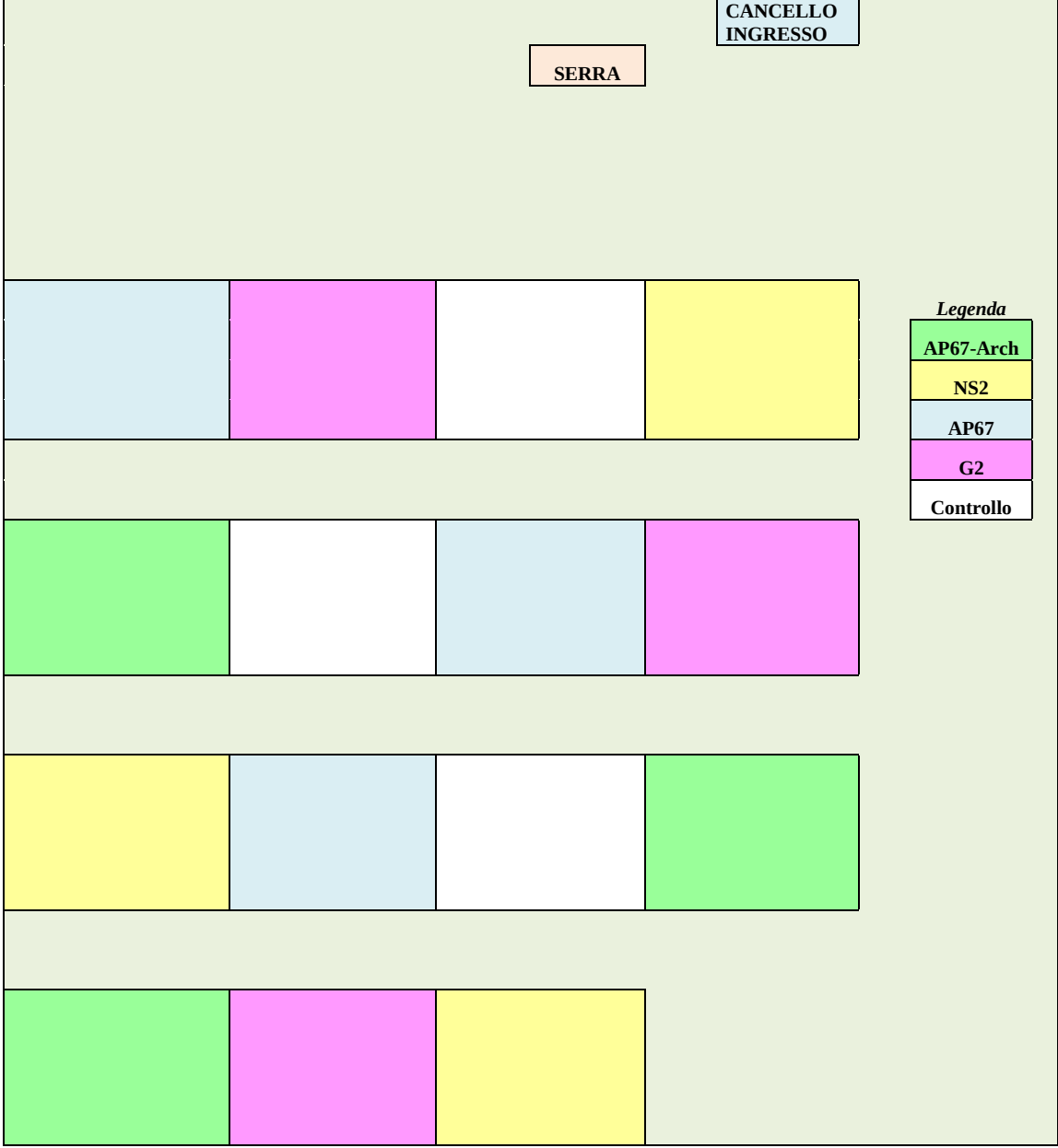


Figura 3.10 - Schema dell'impianto con la posizione delle tre ripetizioni per ogni spettro. Questa disposizione è stata utilizzata per entrambe le specie di faggio e leccio.

3.4 Il Prototipo

Come previsto dal progetto Regent-Forest, è stata prodotta una camera di crescita innovativa chiama Prototipo (Figura 1.1) ed è stato valutato l'effetto di questa camera di crescita sullo sviluppo di piante forestali in rapporto alle camere di crescita tradizionali.

Il Prototipo è composto da 10 ripiani in movimento rotatorio continuo e illuminati da solo tre lampade fisse AP67; ogni ripiano può contenere 3 vassoi. I ripiani compiono un giro completo nell'arco di 136 secondi.

Per impostare le condizioni sperimentali è stato utilizzato un computer esterno programmato in modo da ottenere gli stessi parametri utilizzati nelle tradizionali camere di crescita. Inoltre, il computer permette di gestire l'accensione e lo spegnimento delle lampade e l'impianto di irrigazione di cui il Prototipo è dotato.

Nelle Prototipo sono stati impostati i seguenti parametri di crescita: fotoperiodo di 14 h di luce, umidità relativa (RH) del 70% e una temperatura giorno/notte 22° C / 20° C per un periodo di coltura di 30 giorni per il faggio, il leccio e la sughera. L'annaffiatura è stata effettuata ogni due giorni.

Dopo la sua installazione, il Prototipo è stato acceso e monitorato per verificare il suo corretto funzionamento.

Per gli esperimenti con il terreno Jiffy sono state coltivate, per un periodo di 30 giorni, piante di leccio e sughera.

Per gli esperimenti con il terreno DAFNE sono state coltivate, per un periodo di 30 giorni, piante di faggio, leccio e sughera.

Le lampade LED sono state dotate di un regolatore di luminosità per ottenere 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di luce sulla superficie di crescita delle piante. L'intensità luminosa è stata misurata manualmente sulla parte superiore della pianta tramite un fotoradiometro HD 2302.0 LightMeter Delta Ohm.

3.5 Estrazione degli enzimi

Il tessuto fogliare congelato (circa 1,0 gr di peso fresco) di faggio, leccio e sughera è stato polverizzato in un mortaio con N₂ liquido e omogenizzato con un

Materiali e Metodi

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). Il tampone è stato aggiunto in un rapporto 1:7 (gr peso fresco : ml di tampone).

L'omogenato è stato filtrato attraverso 4 strati di garza. Campioni dell'omogenato (0,1 ml) sono stati prelevati per valutare successivamente il contenuto di clorofilla e β -carotene, mentre la restante parte è stata centrifugata a 1000 g per 5 min. a 4°C.

Il surnatante è stato recuperato e l'eluato quindi centrifugato a 30000 g per 7 min. a 4°C. Il risultante surnatante è stato suddiviso in aliquote da 0,3 ml, 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.

3.6 Determinazione del contenuto di clorofilla totale e carotenoidi nelle foglie

Per la determinazione del contenuto di clorofilla e di carotenoidi nelle foglie delle piante di faggio, leccio e sughera 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:

Contenuto di clorofilla <i>a</i> (Chla)	$(13.7 \times A_{665}) - (5.76 \times A_{649})$
Contenuto di clorofilla <i>b</i> (Chlb)	$(25.8 \times A_{649}) - (7.6 \times A_{665})$
Contenuto di clorofilla totale	$(6.1 \times A_{665}) + (20.04 \times A_{649})$
Contenuto di carotenoidi	$\frac{(1000 \times A_{470}) - (2.13 \times \text{Chla}) - (97.64 \times \text{Chlb})}{209}$

209

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

3.7 Determinazione quantitativa delle proteine

La determinazione del contenuto di proteine negli estratti è stata eseguita con il metodo descritto da Bradford (1976). Questo metodo si basa sul legame del cromoforo Coomassie Brilliant Blue G-250 alle proteine con conseguente viraggio del suo colore dal rosso al blu. A pH mediamente acido il colorante libero ha un picco di assorbimento nel visibile a 465 nm, mentre quando si lega a una proteina vira il suo colore con un picco massimo di assorbimento a 595 nm.

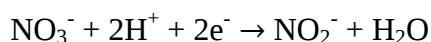
Aliquote variabili di estratto sono state diluite in H₂O deionizzata in un volume finale 1,0 ml. Ai campioni è stato aggiunto 1,0 ml di Comassie Protein Assay Reagent e dopo 15 min. sono state effettuate le letture dell'assorbanza a 595 nm.

Per valutare il contenuto proteico dei vari campioni è stata calcolata una retta di taratura ricavata utilizzando una serie di concentrazioni note di BSA (albumina di siero bovino) (da 0 a 20 µg di BSA).

Il contenuto di proteine è espresso come mg g⁻¹ di peso fresco.

3.8 Determinazione dell'attività dell'enzima NR

Il nitrato, una volta assorbito, subisce una serie di riduzioni che conducono alla formazione di ammoniaca. La prima reazione di riduzione è catalizzata dall'enzima NR (E.C. 1.6.6.1.) che riduce lo ione nitrato in ione nitrito (NO₂⁻) secondo la seguente reazione:



L'attività dell'enzima è stata determinata in “vivo” secondo il saggio colorimetrico descritto da Faleiros e Cazetta (1996).

In particolare, le foglie (0,3 g di peso fresco) di faggio, leccio e sughera sono state tagliate in dischi del diametro di circa 1,0 cm e incubate in 10,0 ml di tampone fosfato contenete KH₂PO₄-NaOH 200 mM (pH 7.4), KNO₃ 60 mM, Isopropanolo 1% (v/v) e Triton X-100 0,1% (v/v) e sottoposte ad infiltrazioni sotto vuoto.

Materiali e Metodi

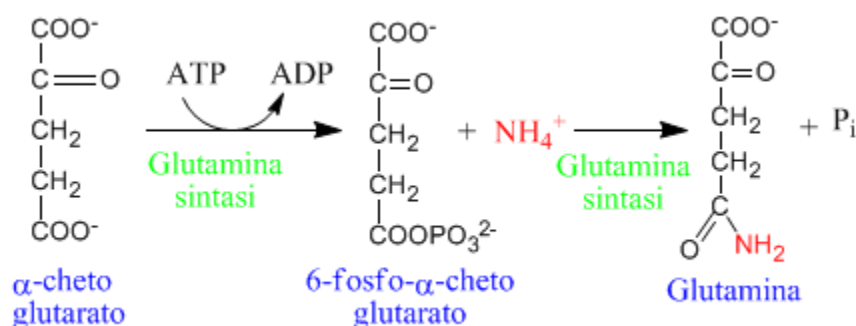
L'incubazione è stata eseguita al buio a 30° C per 60 minuti. Il NO_2^- prodotto dall'azione dell'enzima NR è stato determinato prelevando un'aliquota di 0,5 ml del mezzo di incubazione, a cui sono stati aggiunti 0,5 ml di sulfanilamide 1% in HCl 3 M e 0,5 ml NED 0,02% (N- (1-naftil)-etilendiammina dicloridrato).

Dopo 20 minuti, la soluzione è stata diluita con 3,0 ml di acqua deionizzata e l'assorbanza è stata misurata mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540 nm. Per calcolare la quantità di NO_2^- contenuta nel campione, è stata calcolata una retta di taratura ricavata utilizzando una serie di concentrazioni note di una soluzione standard NaNO_2 0.1 mM.

L'attività di NR è espressa come $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ di peso fresco.

3.9 Determinazione dell'attività dell'enzima GS

L'ammonio che deriva dalle reazioni di riduzioni si lega all' α -chetoglutarato, tramite l'azione dell'enzima GS, con la formazione di glutammina, secondo la reazione:



L'attività della glutammina sintetasi (GS, CE 6.3.1.2) è stata determinata come descritto da Astolfi *et al.* (2004).

A 0,1 ml dell'estratto enzimatico sono stati aggiunti 0,2 ml di tampone di reazione (contenente Tris 250 mM, MgSO_4 50 mM, Na_2EDTA 2.5 mM, NaGlutammico 125 mM, DTT- HCl 5 mM pH 7.8), 50 μl di HONH_3Cl 750 mM (idrossilammina cloridrata) e KOH 750 mM in rapporto 1:1, 0,11 ml H_2O distillata e 40 μl di ATP 200 mM (starter). I campioni sono incubati a 30° C per 30 min.

Materiali e Metodi

La reazione è stata bloccata tramite l'aggiunta di 0,7 ml di una soluzione, contenente FeCl_3 0.67 mM, HCl 0.37 mM, TCA 20% (w/v), e i campioni sono stati posti in ghiaccio.

I campioni sono stati centrifugati a 30000 g per 5 min. e l'assorbanza è stata misurata a 540 nm.

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 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteina min^{-1} .

3.10 Determinazione del contenuto di 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 MDA reagisce con molti composti derivati che assorbono fortemente nel visibile e nell'U.V., e per la sua determinazione 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.

Il tessuto fogliare congelato (circa 0.5 g di peso fresco) delle piante di faggio, leccio e sughera è stato polverizzato in un mortaio con N_2 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 posto nelle provette e poste in un termo blocco preriscaldato a 95° C. Dopo 30 minuti, i campioni sono stati rimossi e 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} .

4. Risultati e Discussione

Tra i diversi fattori ambientali, la luce è sicuramente una delle variabili più importanti che influenzano lo sviluppo e la crescita delle piante (Kopsell e Kopsell, 2008; Perez-Balibrea *et al.*, 2008). È stato ampiamente descritto che le modificazioni ambientali influenzano direttamente la crescita delle piante e le loro prestazioni in campo (Niinemets, 2010; Yamori *et al.*, 2010). Diversi studi hanno dimostrato che la qualità e la quantità di luce e il fotoperiodo possono influire sulla crescita e sullo sviluppo delle piante (Chen *et al.*, 2004; Moshe e Dalia, 2007; Zuchi e Astolfi, 2012).

Le piante sono in grado di reagire a variazioni nei livelli di intensità luminosa attraverso particolari adattamenti morfologici, biochimici e fisiologici che dipendono principalmente dalle caratteristiche genetiche della pianta. Tali risposte consentono l'adeguamento della velocità di crescita della pianta alle mutate disponibilità energetiche (Ariz *et al.*, 2010).

Le luci R e B, essendo le principali fonti di energia per l'assimilazione di CO₂ da parte delle piante, svolgono un ruolo fondamentale per la crescita di specie vegetali (Cosgrove, 1981; Briggs *et al.*, 2001; Kasajima *et al.*, 2008). Infatti, è noto che la luce R svolge un ruolo chiave per lo sviluppo dell'apparato fotosintetico (Saebo *et al.*, 1995) mentre la luce B è importante per lo sviluppo dei cloroplasti, per la biosintesi di clorofilla e carotenoidi e per l'apertura stomatica (Senger, 1982).

Inoltre, una combinazione di luce RB è risultata essere una fonte luminosa ottimale per la crescita di piante in ambiente controllato (Dougher e Bugbee, 2004; Lee *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2008).

Le camere di crescita sono tradizionalmente dotate di lampade fluorescenti nonostante abbiano diverse limitazioni quali: elevato consumo elettrico, eccessive emissioni di calore, breve vita e uno spettro di illuminazione fisso.

Recentemente, diodi ad emissione luminosa (LED) sono stati utilizzati per la crescita di piante in ambiente controllato come tecnologia alternativa a basso costo (Yeh e Chung, 2009). Per questo motivo le lampade LED potrebbero essere una fonte di illuminazione alternativa per la crescita di specie vegetali grazie alle loro caratteristiche,

Risultati e Discussione

quali il basso consumo energetico, le specifiche e regolabili lunghezze d'onda e la lunga durata di funzionamento, influenzando positivamente la morfologia e il metabolismo delle piante (Bourget, 2008; Morrow, 2008).

In questo studio sono stati presi in considerazione gli aspetti metabolici di alcune specie forestali esposte all'illuminazione a LED durante la fase di pre-coltivazione utilizzando due substrati di crescita (Jiffy e DAFNE). In particolare, sono stati indagati parametri di crescita fisiologici quali il contenuto di clorofilla totale, carotenoidi e proteine.

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. Pertanto, nelle piante esposte all'illuminazione LED o fluorescente sono state indagate l'attività di due enzimi (NR e GS) coinvolti nel metabolismo dell'azoto

In particolare, la pianta assorbe lo ione nitrato dal terreno e tramite la reazione catalizzata dalla NR lo riduce a ione nitrito che varrà poi ulteriormente ridotto in ione ammonio. $\text{L}'\text{NH}_4^+$, essendo tossico, sarà rapidamente organicato per formare amminoacidi, come per esempio la glutammina da parte dell'enzima GS (Chaillou *et al.*, 1994).

La NR svolge un ruolo cruciale nel regolare il meccanismo di assimilazione dell'azoto (Campbell, 1999) e la sua attività è regolata dalla luce in alcune specie vegetali (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. Infatti, la qualità della luce regola 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) e la sua attività è assicurata da un sufficiente apporto di energia (ferrodossina e ATP) proveniente dal processo fotosintetico (Lea *et al.*, 1990). Pertanto, la luce stimola l'assimilazione dell'ammonio nei cloroplasti impedendone l'accumulo (Izzo e Quartacci, 2010).

Infine, è stato indagato il livello di perossidazione dei lipidi utilizzando come indicatore di stress il contenuto di malondialdeide (MDA). 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.*,

Risultati e Discussione

2006; Sochor *et al.*, 2012), essendo uno dei prodotti finali della perossidazione degli acidi grassi insaturi in fosfolipidi.

Le stesse analisi sono state effettuate sulle piante allevate nella camera sperimentale Prototipo.

Il Prototipo è una camera di crescita sviluppata nell'ambito del progetto di ricerca Regen-Forest ed è composta da 10 ripiani in continuo movimento (Figura 1.1) esposti all'illuminazione prodotta da tre lampade LED AP67. Questo movimento espone le plantule a una quantità variabile di luce per l'intero ciclo colturale, fattore che potrebbe influenzare lo sviluppo delle piante.

Questo esperimento è giustificato dal fatto che in natura la quantità di luce disponibile per una pianta può variare sia spazialmente, a causa dell'ombreggiamento e quindi della competizione con le altre piante, sia temporalmente, durante il giorno.

Quindi, il Prototipo permette di creare una situazione più simile possibile a quella naturale, alternando momenti di luce diretta a quelli di penombra, permette di ottenere una vasta produzione di materiale vegetale (si possono allevare oltre 3.000 piante contemporaneamente). Inoltre, utilizzando lampade LED, piuttosto che lampade fluorescenti, si può ottenere un risparmio energetico soddisfacendo lo stesso le esigenze di crescita delle piante.

Infine, come fase ultima di questo lavoro, è stato valutato l'effetto della qualità della luce utilizzata nelle camere di crescita nella fase di pre-coltivazione sulle piante trasferite in serra e successivamente trapiantate nell'ambiente naturale, analizzato sempre gli stessi parametri fisiologici e metabolici.

4.1 Faggio

4.1.1 Esperimenti con terreno Jiffy

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di faggio coltivate con substrato Jiffy, sia in ambiente controllato (camere di crescita) che in ambiente aperto (serra e impianto).

4.1.1.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita

Dopo un periodo di allevamento di 30 giorni nelle camere di crescita, le plantule di faggio sono state sottoposte a diverse analisi biochimiche per valutare gli effetti degli spettri LED in rapporto alle lampade fluorescenti.

Il faggio allevato con le lampade LED ha mostrato una diminuzione, con valori compresi fra il 26% e il 33%, del contenuto di clorofilla totale rispetto al controllo fluorescente (Figura **4.1a**). Questo dato è indipendente dal tipo di LED utilizzato. Allo stesso modo, anche il contenuto di carotenoidi totali è diminuito nelle piante cresciute con gli spettri LED (28-55%) in relazione al faggio cresciuto con lo spettro fluorescente (Figura **4.1b**).

La crescita con le lampade a LED ha influenzato anche il contenuto proteico nelle foglie rispetto al controllo (Figura **4.2**). In particolare, si è riscontrata una forte diminuzione del contenuto di proteine totali con valori compresi fra il 44% e 64%.

Successivamente, sono stati studiati i cambiamenti dell'attività di enzimi chiave coinvolti nel metabolismo dell'azoto.

L'attività dell'enzima NR è stata stimolata nelle piante allevate con i LED rispetto alla luce fluorescente (Figura **4.3a**). In particolare, l'attività è stata estremamente elevata nelle piante allevate con i LED NS2 (+152%) e AP67-Arch (+105%).

L'attività della GS è stata stimolata nelle foglie di faggio cresciuto con AP67-Arch (+76%) mentre è risultata inferiore (-57%) nelle piante allevate con NS2, rispetto al controllo fluorescente (Figura **4.3b**). Nelle piante allevate con gli altri spettri LED non sono state notate differenze significative con le piante controllo.

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 faggio, solamente lo spettro NS2 ha

Risultati e Discussione

causato un aumento della concentrazione di MDA (+84%) rispetto alle piante allevate con le luci fluorescenti (Figura 4.4).

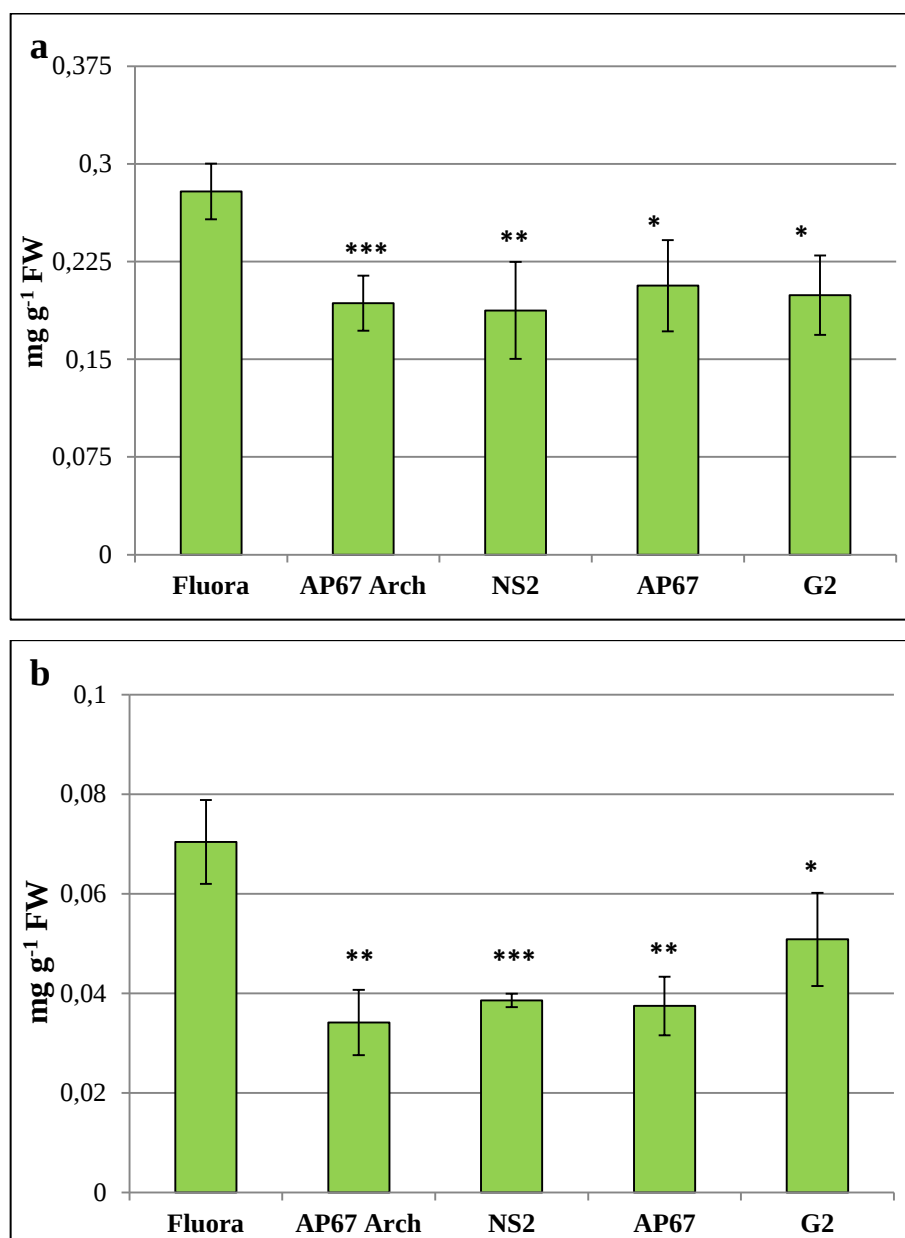


Figura 4.1 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

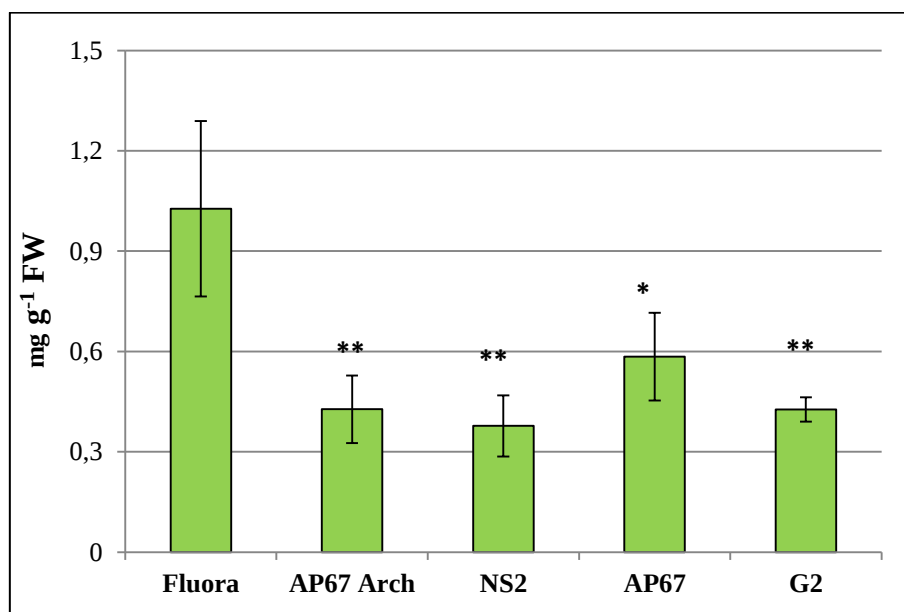


Figura 4.2 – Contenuto di proteine nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

Risultati e Discussione

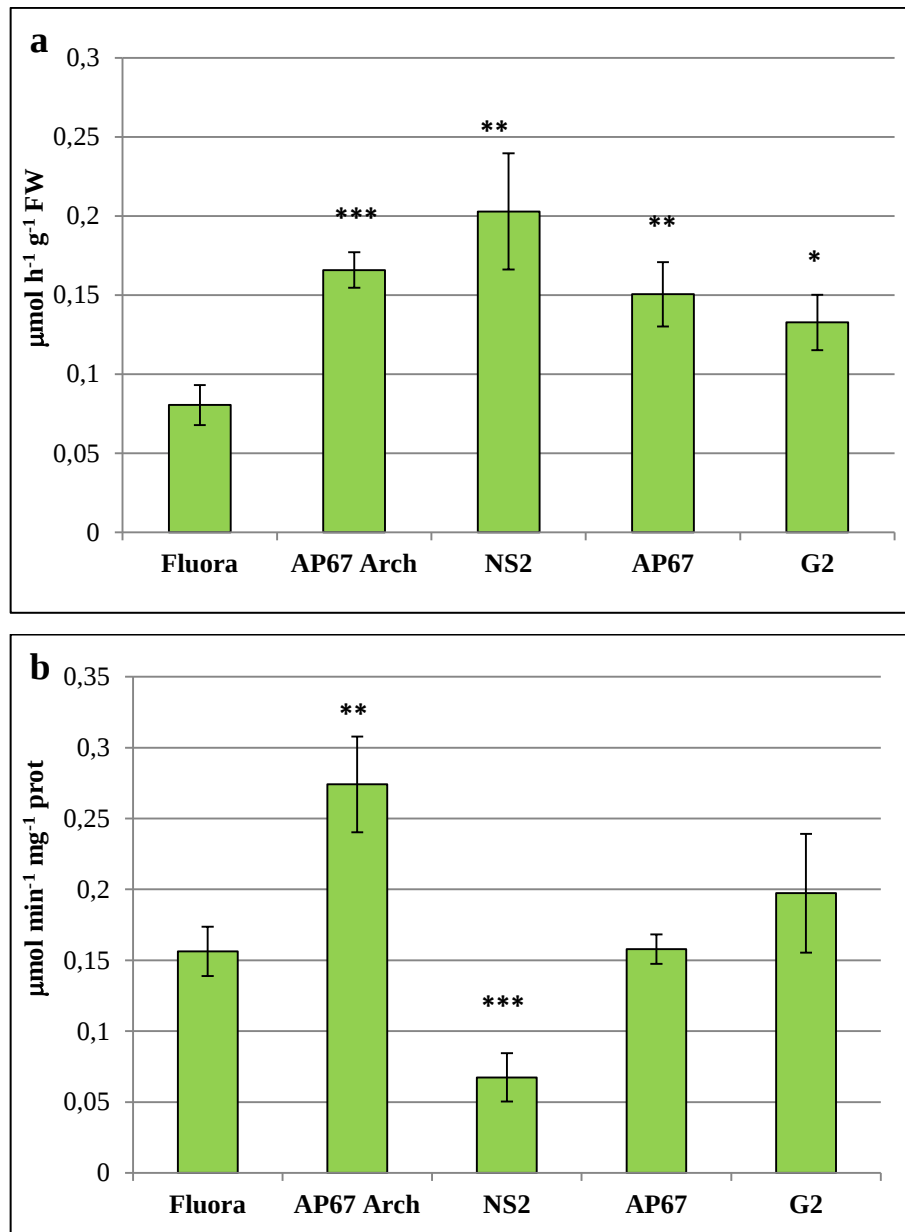


Figura 4.3 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

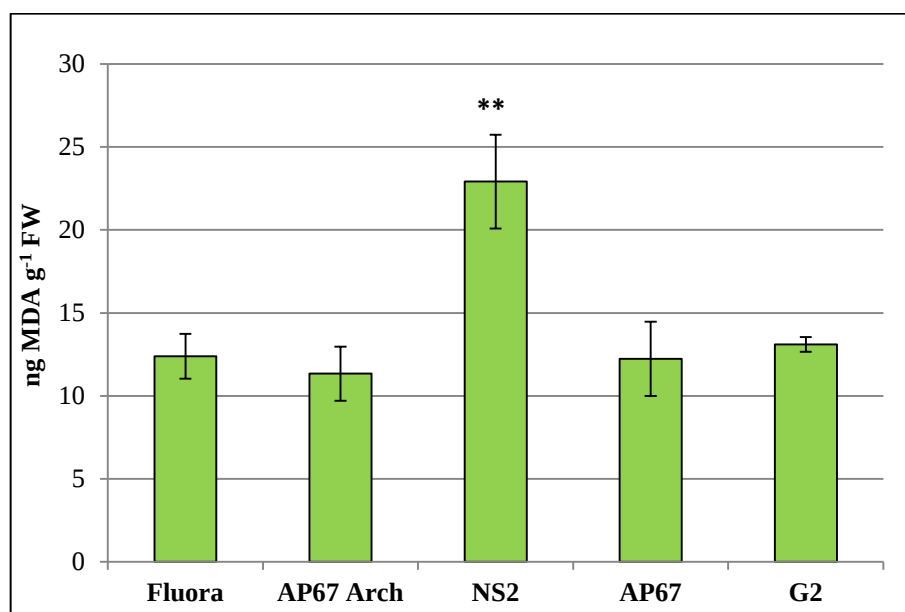


Figura 4.4 – Contenuto di MDA nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy . I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

4.1.1.2 Prototipo

Per la difficile reperibilità e il costo elevato del terreno Jiffy, è stato deciso di non valutare la crescita del faggio con questo substrato nel Prototipo.

4.1.1.3 Serra

Terminata la fase di sperimentazione nelle camere di crescita sotto le quattro lampade LED e fluorescente, le piante di faggio pre-coltivate sotto i diversi spettri luminosi sono state trapiantate in contenitori più grandi e trasferite in serra.

Nell'estate del 2012, a causa del clima torrido, nel vivaio forestale del DAFNE si è sviluppato un incendio che ha danneggiato molte plantine presenti in serra. In particolare, le piante di faggio hanno riportato diversi danni all'apparato fogliare che hanno reso impossibile lo studio relativo al periodo di crescita in serra.

Le piante sopravvissute sono state quindi utilizzate per la sperimentazione successiva in pieno campo.

4.1.1.4 Trapianto in campo

Le piante di faggio sopravvissute ai danni da incendio sono state trapiantate in piena terra nella primavera del 2013.

Lo schema sperimentale (Figura **3.10**) prevedeva tre parcelle per singolo spettro, con 16 piante ciascuna, posizionate a caso nell'area di impianto per un totale di 15 parcelle.

Le indagini previste avrebbero riguardato le seguenti fasi sperimentali:

1. analisi dei metaboliti delle piante appartenenti alle tre ripetizioni di un singolo spettro al fine di valutare eventuali influenze del terreno sullo sviluppo delle piante;
2. confronto fra gli spettri.

Il cattivo stato vegetativo delle piante di faggio non ha consentito di recuperare materiale vegetale sufficiente per effettuare, nell'ambito dello stesso spettro, il confronto fra le tre parcelle. Di conseguenza, è stato possibile eseguire soltanto la seconda indagine.

Risultati e Discussione

Le piante di faggio sono state analizzate dopo 120 giorni dalla loro messa a dimora.

Alla fine della fase sperimentale in campo, le piante di faggio pre-coltivate sotto AP67 hanno mostrato un incremento nel contenuto della clorofilla totale e di β -carotene (+192% e 358% rispettivamente), mentre le piante pre-allevate con gli altri spettri LED hanno mostrato una diminuzione di entrambi i parametri rispetto al controllo (Figura 4.5). In particolare è stata riscontrata una diminuzione del contenuto di clorofilla, con valori compresi fra 54% e 69%, nelle piante pre-allevate con gli spettri NS2 e G2, e una diminuzione nel contenuto di carotenoidi pari al 13% per lo spettro AP67-Arch, 49% per NS2 e 27% per la lampada G2.

In generale si può assumere che il contenuto di proteine nelle foglie di faggio non è stato influenzato dalla condizione di pre-coltivazione, tranne per le piante pre-coltivate sotto G2 che hanno mostrato una diminuzione del contenuto proteico (-39%) rispetto al controllo (Figura 4.6).

Il pre-allevamento con la lampada G2 ha determinato un incremento dell'attività dell'enzima NR (+51%); gli altri spettri LED non hanno determinato differenze significative nell'attività di questo enzima quando confrontate con la luce fluorescente (Figura 4.7a).

L'attività della GS risponde in maniera differente alle diverse fonti di illuminazione utilizzate nella fase di pre-coltivazione (Figura 4.7b). L'attività enzimatica non è stata influenzata dagli spettri AP67-Arch e G2, mentre è stata inibita nelle piante pre-allevate con NS2 (-52%) e AP67 (-36%), in relazione alle piante controllo.

Infine, il contenuto di MDA è rimasto pressoché invariato nelle foglie di faggio indipendentemente dal tipo di illuminazione utilizzata durante la fase di pre-coltivazione.

Risultati e Discussione

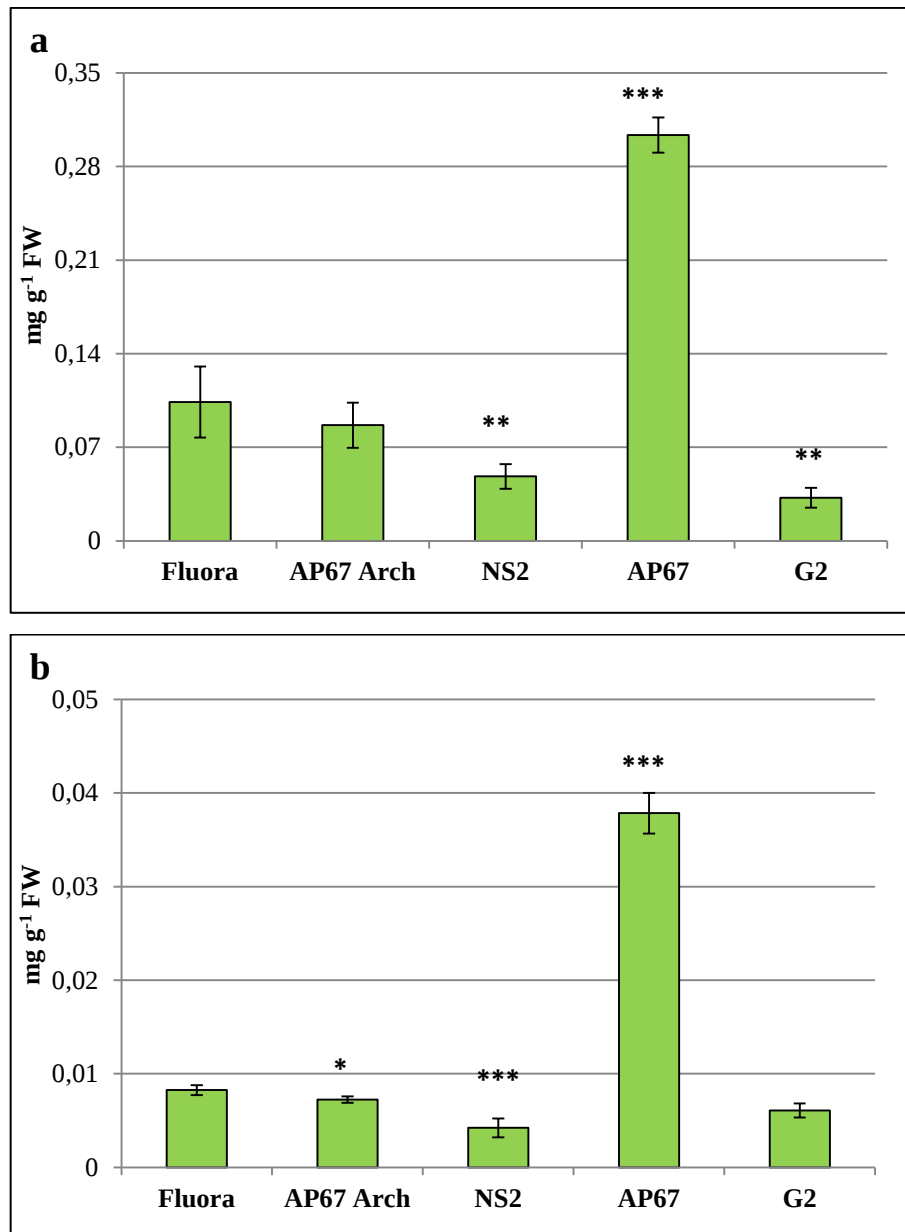


Figura 4.5 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e successivamente trapiantate per 120 giorni in campo. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

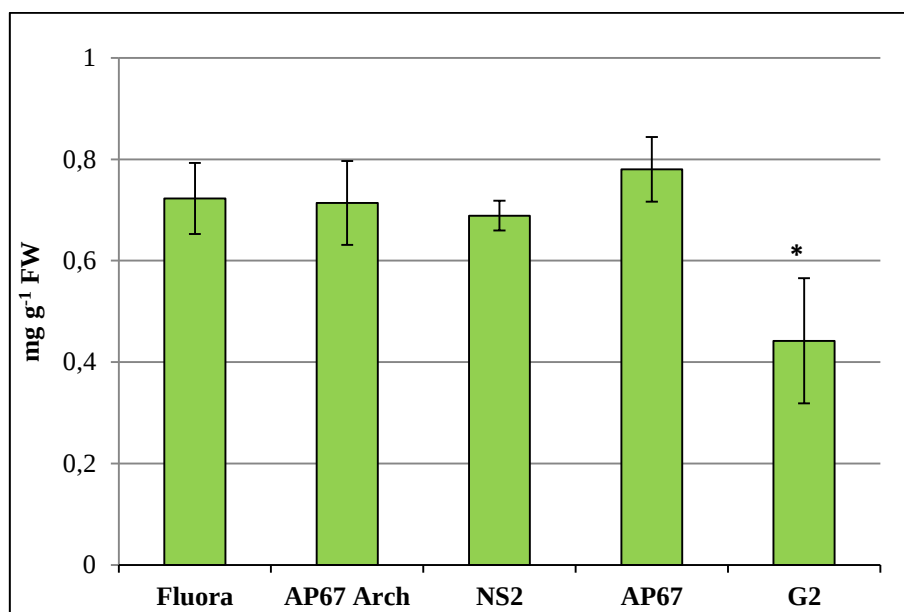


Figura 4.6 – Contenuto di proteine nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e successivamente trapiantate per 120 giorni in campo. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

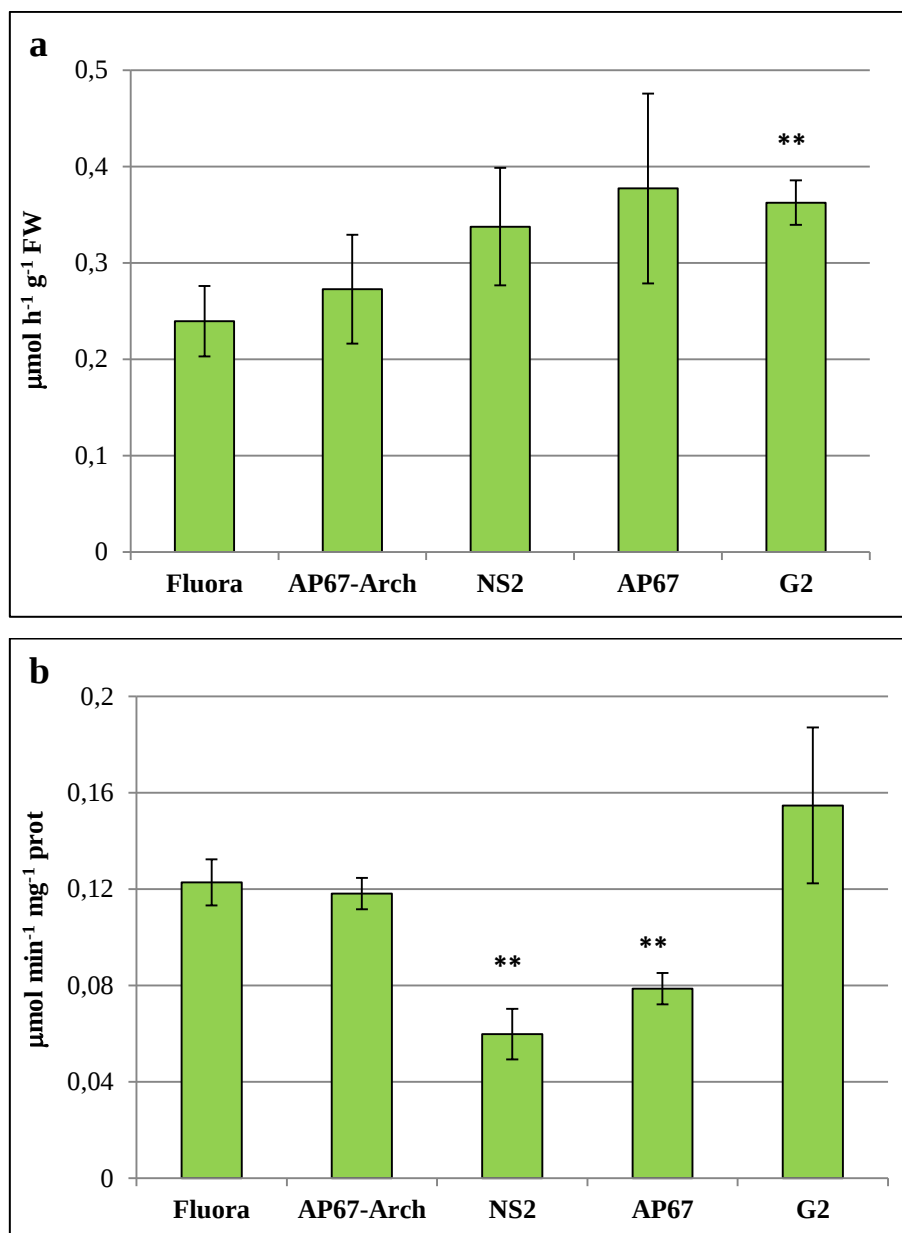


Figura 4.7 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e successivamente trapiantate per 120 giorni in campo. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

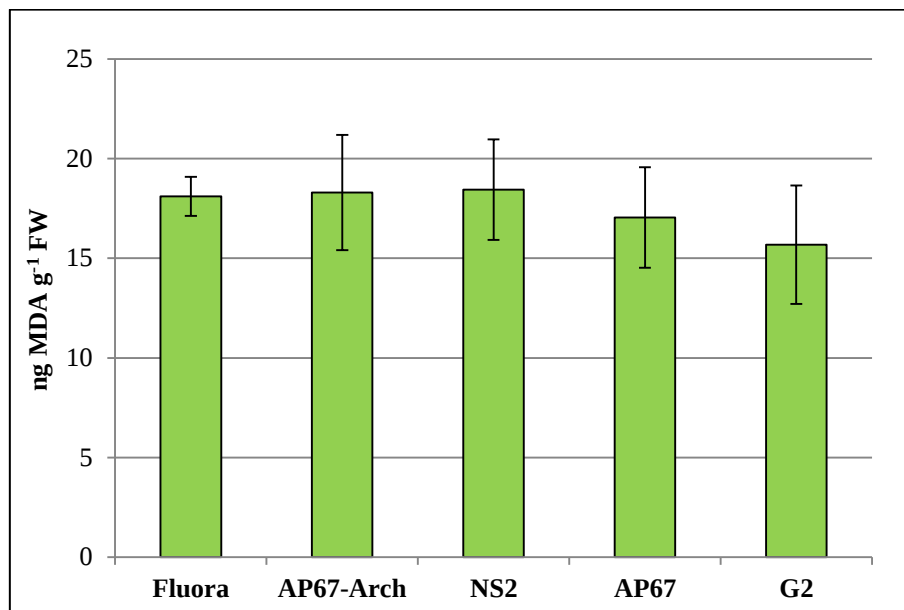


Figura 4.8 – Contenuto di MDA nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e successivamente trapiantate per 120 giorni in campo. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

4.1.1.5 Discussione

Le piante di faggio allevate nei mini-contenitori hanno mostrato una velocità di crescita normale indicando che le condizioni colturali adottate sono state appropriate. In particolare, la nuova metodologia di pre-coltivazione nei contenitori alveolati ha confermato la sua efficacia rispetto alle pratiche standard utilizzate in vivaio (Kostopoulou *et al.*, 2010; Mattsson *et al.*, 2010).

Nelle piante di faggio cresciute con gli spettri LED si è osservata una riduzione generale del contenuto di clorofilla (Figura 4.1a), indipendentemente dal tipo di LED studiato. Questo effetto potrebbe essere causato dalla luce R presente negli spettri LED utilizzati, in accordo con quanto riportato in letteratura. Per esempio, Tanaka *et al.* (1998) hanno riportato che il contenuto di clorofilla si riduce quando le piante di *Cymbidium* sono coltivate sotto luce R.

Anche il contenuto dei carotenoidi è influenzato negativamente dall'illuminazione LED rispetto alla luce fluorescente (Figura 4.1b). Il pigmento β -carotene assorbe fortemente nella regione del blu (400-500 nm) (Hopkins e Huner, 2004). Inoltre, la luce B stimola la biosintesi di clorofilla e carotenoidi (Senger, 1982). Le lampade LED utilizzate nelle camere di crescita hanno una percentuale relativamente bassa di luce B (Tabella 3.1), rispetto alle altre lunghezze d'onda presenti negli spettri, e questo potrebbe quindi influenzare il contenuto di carotenoidi nelle piante di faggio.

Successivamente, sono state indagate l'attività degli enzimi NR e GS nelle piante di faggio esposte all'illuminazione LED o fluorescente.

L'attività enzimatica delle NR è stata stimolata nel tessuto fogliare del faggio esposto alle lampade LED rispetto al controllo (Figura 4.3a). Come descritto precedentemente, la luce è un fattore importante per la regolazione dell'attività dell'enzima NR, in quanto nei tessuti verdi stimola il trasferimento dello ione nitrato dal vacuolo al citosol per la sua successiva riduzione a nitrito (Izzo e Quartacci, 2010). In quest'ottica, l'aumento dell'attività enzimatica nelle piante allevate con le luci LED potrebbe suggerire un aumento del rilascio di NO_3^- per la sua successiva riduzione a nitrito. Inoltre, è stato precedentemente dimostrato che l'attività della NR è stimolata nelle foglie di piante di riso quando alla luce R era aggiunta una piccola percentuale di luce B (Ohashi-Kaneko *et al.*, 2006). In questo senso, la combinazione di luce RB presente nei LED potrebbe essere ottimale per stimolare l'attività enzimatica.

Risultati e Discussione

I nostri dati hanno mostrato che l'attività della GS nelle foglie delle piante di faggio risponde in maniera diversa a seconda della luce LED analizzata (Figura 4.3b).

In particolare, gli spettri AP67 e G2 non hanno determinato differenze significative dell'attività enzimatica quando paragonate al controllo, mentre la lampada AP67-Arch ha stimolato l'attività dell'enzima, suggerendo che questa luce potrebbe fornire un adeguato apporto energetico sufficiente a garantirne l'attività, nonostante il basso contenuto di clorofilla (Figura 4.1a) e di proteine (Figura 4.2) riscontrato nelle medesime piante. Tuttavia, è interessante notare che le prestazioni dell'apparato fotosintetico potrebbero essere indipendenti dal contenuto relativamente basso di clorofilla come dimostrato da Saebo *et al.* (1995). È interessante notare inoltre come la lampada LED AP67-Arch determini un aumento dell'attività sia dell'enzima NR sia della GS, indicando quindi che la composizione spettrale della luce potrebbe essere ottimale per il metabolismo dell'azoto nelle piante di faggio nel terreno Jiffy.

D'altra parte, la ridotta attività enzimatica della GS riscontrata nelle piante di faggio cresciute con lo spettro NS2 (Figura 4.3b) è correlata con una diminuzione del contenuto dei pigmenti fotosintetici (Figura 4.1) e del contenuto proteico (Figura 4.2). In questo senso, l'attività fotosintetica della pianta potrebbe essere ridotta dal basso contenuto di clorofilla e carotenoidi, influenzando di conseguenza la disponibilità di scheletri carboniosi per la sintesi di amminoacidi. Quindi, le piante potrebbero rallentare l'attività enzimatica della GS in funzione della scarsa concentrazione di carboidrati.

I dati ottenuti mostrano un aumento del contenuto di MDA solamente nelle foglie di faggio pre-allevate con lo spettro NS2 rispetto a quelle cresciute con la luce fluorescente (Figura 4.4). Questo potrebbe indicare che lo spettro NS2 incrementi il danno ossidativo alle membrane a causa della perossidazione lipidica e questo, di conseguenza, potrebbe essere la causa della ridotta attività enzimatica della GS riscontrata nel faggio allevato con la lampada NS2. La qualità della luce ha diversi effetti sul contenuto di MDA nelle foglie di diverse specie vegetali e alcuni studi hanno riportato che un alto contenuto di MDA è presente nelle piante sia quando esposte a bassa intensità luminosa sia a alte intensità luminose (Zhang *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2011).

Risultati e Discussione

Successivamente, le piantine di faggio, dopo la crescita di 30 giorni in ambiente controllato, sono state trapiantate in contenitori più grandi per permettere lo sviluppo della pianta e trasferite in serra per l'ambientamento alle condizioni naturali, dove, a causa dell'elevate temperature estive, si è verificato un incendio che ha danneggiato gran parte delle piante di faggio. Si è deciso quindi di utilizzare le piante sopravvissute per il trapianto definitivo nel terreno.

Trascorsi 120 giorni, le piante manifestavano forti alterazioni quali perdita di foglie e attacchi parassitari. Sono state comunque selezionate piante sufficienti per poter stimare gli effetti della pre-coltivazione con lampade LED dopo il trapianto in campo.

In questa fase sperimentale si è riscontrato che le piante pre-coltivate in precedenza con gli spettri LED hanno mantenuto un minor contenuto di clorofilla e β -carotene rispetto alle piante controllo, tranne per le piante pre-allevate con lo spettro AP67 che hanno mostrato un aumento di questi pigmenti una volta avvenuto il loro trapianto in campo (Figura 4.5). Pertanto, nonostante il precedente basso contenuto di pigmenti riscontrato nel faggio pre-coltivato nelle camere di crescita con AP67, le piante pre-allevate con questo spettro hanno dimostrato di rispondere positivamente quando esposte alla luce solare con un maggior contenuto di clorofilla e carotenoidi, che potrebbe avere come conseguenza una maggior attività fotosintetica.

L'attività dell'enzima NR (Figura 4.7a) non ha mostrato differenze significative fra le piante pre-coltivate con luce fluorescente o con LED, suggerendo che l'attività enzimatica si stabilizza entro certi valori, dopo il trapianto nel terreno, indipendentemente dal tipo di illuminazione utilizzata durante la crescita in ambiente controllato. Solamente il faggio precedentemente allevato con lo spettro G2 ha mantenuto un'elevata attività della NR in relazione al controllo. È ragionevole ipotizzare che l'esposizione a questa lampada, caratterizzata dalla luce rossa e rosso-ontano, stimoli l'attività enzimatica della pianta, sia nella camera di crescita sia quando esposta alle condizioni naturali, grazie proprio alla peculiarità dello spettro.

Per quanto riguarda l'enzima GS si nota che la diminuzione dell'attività enzimatica persiste nelle piante pre-allevate con lo spettro NS2, in relazione al controllo (Figura 4.7b). Inoltre, la ridotta attività, come riscontrato nella fase sperimentale iniziale, è correlata con un minor contenuto di pigmenti fotosintetici (Figura 4.5), probabilmente causata da una ridotta attività fotosintetica che comporta una ridotta

disponibilità di scheletri carboniosi utilizzabili per la sintesi di glutammina. Le piante di faggio quindi risentirebbero degli effetti causati da questo spettro durante le prime fasi di vita così tanto da mantenerli anche dopo aver trascorso una stagione vegetativa nell'ambiente naturale.

Inoltre, l'attività della GS è influenzata negativamente anche dalla pre-coltivazione con la luce AP67, rispetto al controllo (Figura 4.7b). È interessante notare che la diminuzione di attività GS è correlata con un incremento del contenuto di clorofilla e carotenoidi (Figura 4.5) nelle stesse piante. Il faggio potrebbe aumentare il contenuto di clorofilla e β -carotene per mantenere una maggiore attività fotosintetica al fine di fornire una quantità sufficiente di energia per garantire l'attività GS.

Analizzando i dati relativi alla perossidazione lipidica, si notano differenze non significative nel contenuto di MDA nel faggio pre-coltivato con LED o luce fluorescente, suggerendo quindi che le piante, una volta trasferite in campo, subiscono un danno ossidativo simile che potrebbe dipendere più dall'esposizione alla luce solare che dal tipo di illuminazione utilizzata durante lo sviluppo in ambiente controllato.

4.1.2 Esperimenti con terreno DAFNE

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di faggio coltivate con substrato DAFNE in ambiente controllato (camere di crescita e Prototipo).

4.1.2.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita

Dopo un periodo di allevamento di 30 giorni nelle camere di crescita, le plantule di faggio sono state sottoposte a indagine per valutare gli effetti degli spettri LED in rapporto alle lampade fluorescenti.

La crescita con gli spettri LED, indipendentemente dal tipo di lampada utilizzata, ha determinato una diminuzione del contenuto di clorofilla e β -carotene nelle plantule di faggio rispetto al controllo fluorescente (Figura 4.9). In particolare, il contenuto di clorofilla è diminuito del 40% con lo spettro AP67-Arch, del 59% con le lampade NS2, del 68% con la luce AP67 e del 56% con la G2 (Figura 4.9a). Invece, con le lampade

Risultati e Discussione

AP67-Arch è diminuito il contenuto di carotenoidi del 44%, con i LED NS2 e AP67 del 59% e con G2 del 51% (Figura **4.9b**).

Anche il contenuto di proteine è influenzato dal tipo di illuminazione utilizzata. Infatti si è notata una diminuzione del contenuto proteico, rispetto alle lampade fluorescenti, in tutte le piante di faggio allevate sotto gli spettri LED, con valori compresi tra il 33% e l'83% (Figura **4.10**).

Successivamente, è stata analizzata l'attività degli enzimi coinvolti nel meccanismo di assimilazione dell'azoto.

L'attività dell'enzima NR è inibita nelle piante cresciute con gli spettri AP67-Arch (-27%), AP67 (-31%) e G2 (-34%) rispetto al faggio esposto alle lampade fluorescenti (Figura **4.11a**).

D'altra parte, la crescita con gli spettri LED ha determinato un aumento dell'attività della GS rispetto al controllo. In particolare, l'attività enzimatica è estremamente stimolata nelle piante esposte agli spettri NS2 (+228%), AP67 (+69%) e G2 (+183%) (Figura **4.11b**).

Infine, la crescita con le lampade LED ha determinato un minor contenuto di MDA nelle piante analizzate, rispetto alla lampada fluorescente, indipendentemente dal tipo di spettro studiato, con valori compresi dal 15% al 32% (Figura **4.12**).

Risultati e Discussione

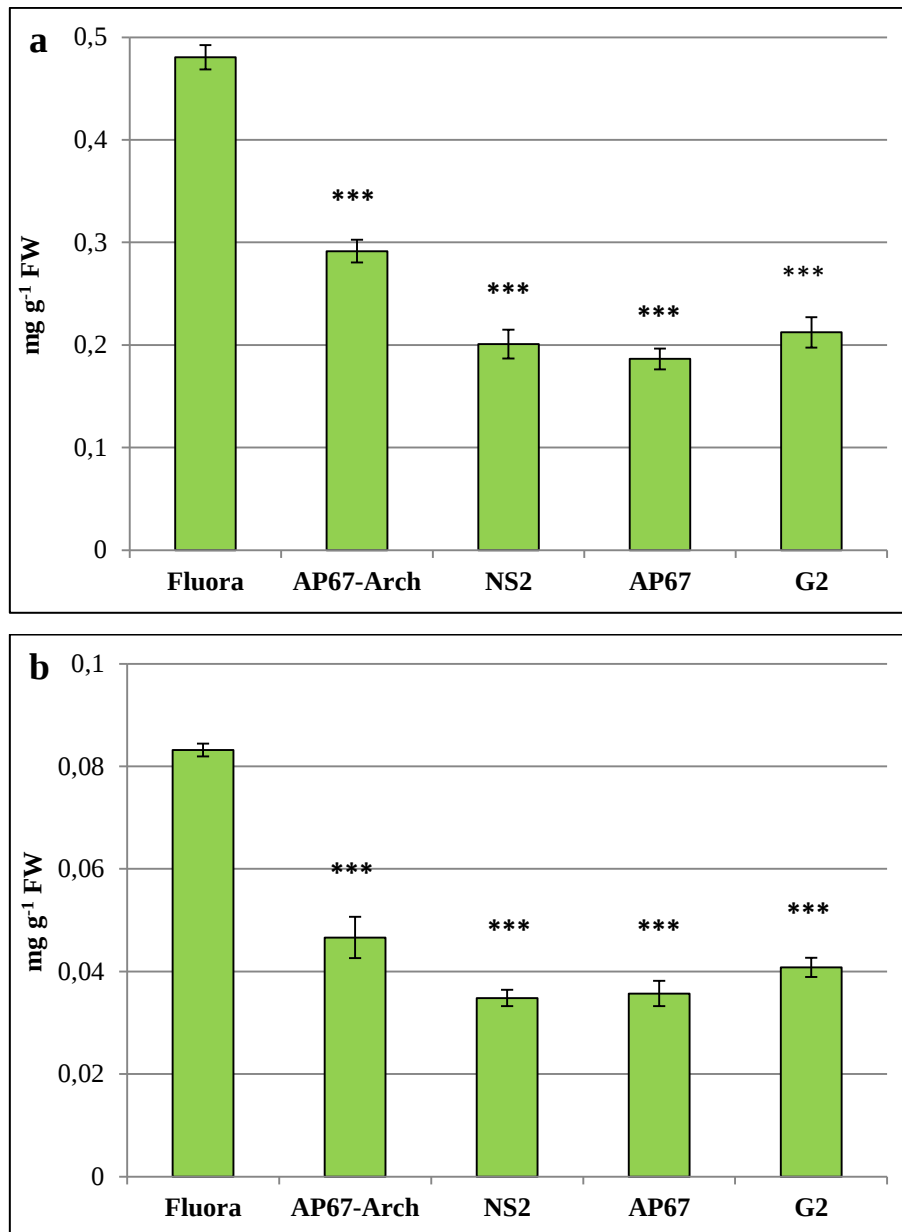


Figura 4.9 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

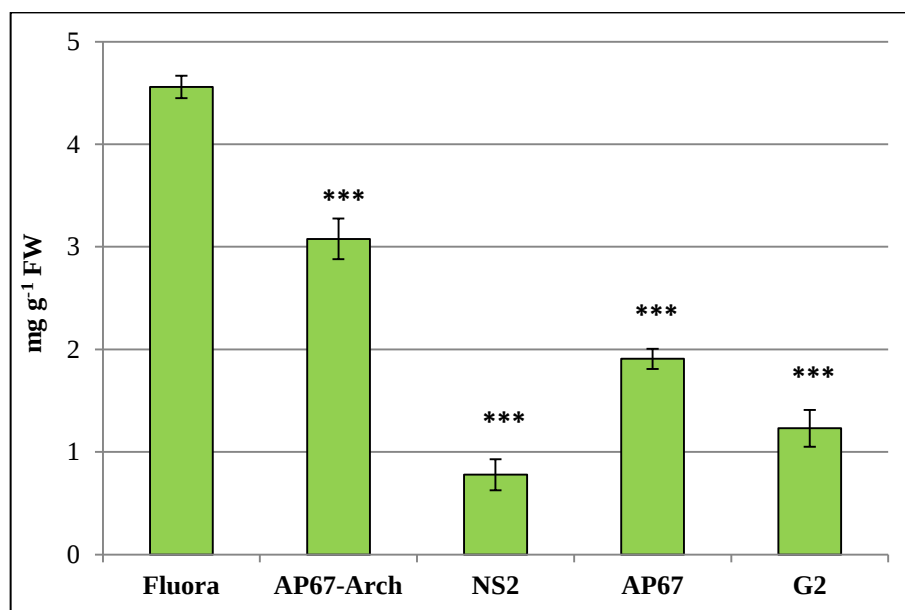


Figura 4.10 – Contenuto di proteine nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

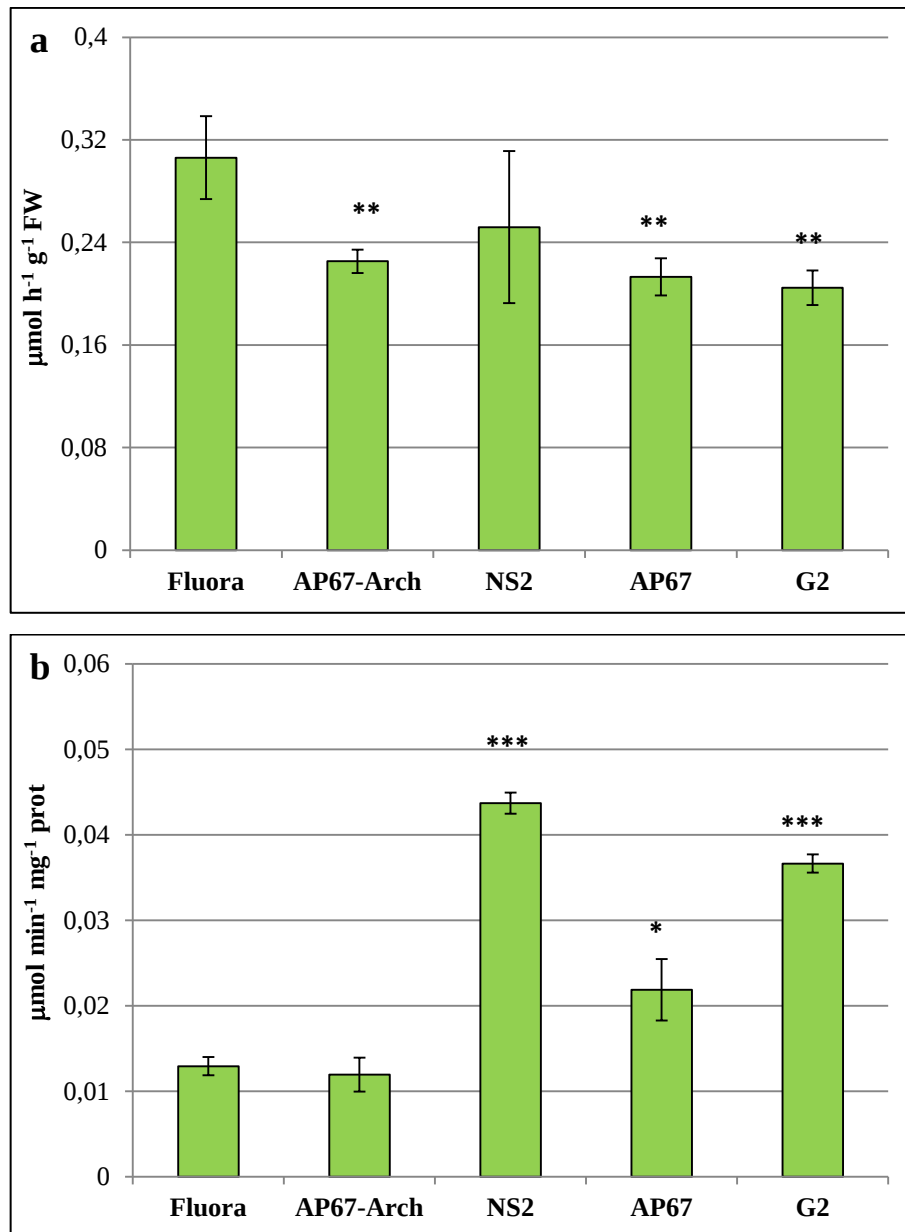


Figura 4.11 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

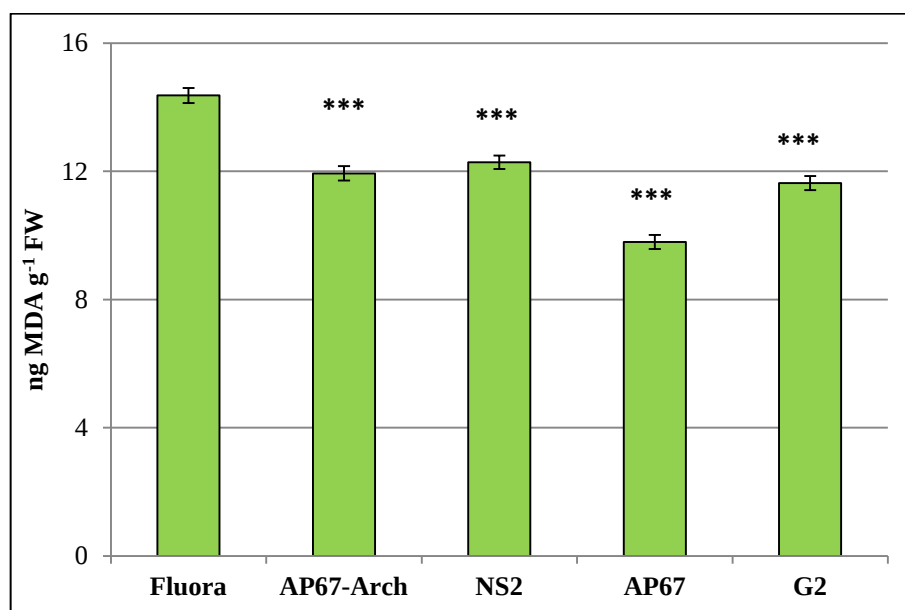


Figura 4.12 – Contenuto di MDA nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS

4.1.2.2 Prototipo

Come si può notare dalla Figura **4.13**, la crescita nel Prototipo delle piante di faggio ha determinato un aumento significativo del contenuto di clorofilla (+401%), di carotenoidi (+375%) e di proteine (+433%), rispetto all'allevamento nella tradizionale camera di crescita e sotto lo stesso spettro AP67.

Le attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'azoto sono state influenzate diversamente dal tipo di camera di crescita utilizzata.

Infatti, l'allevamento nella camera sperimentale ha stimolato significativamente l'attività dell'enzima NR (+205%) rispetto alle piante allevate nella camera di crescita tradizionale (Figura **4.14a**), mentre l'attività della GS non era influenzata dal tipo di camera climatica utilizzata (Figura **4.14b**).

Infine, è stata valutata la concentrazione di MDA come indice di stress ossidativo, e dai dati ottenuti si è notato che la crescita nel Prototipo non ha determinato differenze significative nel contenuto di MDA rispetto alla crescita nella camera standard (Figura **4.14**).

Risultati e Discussione

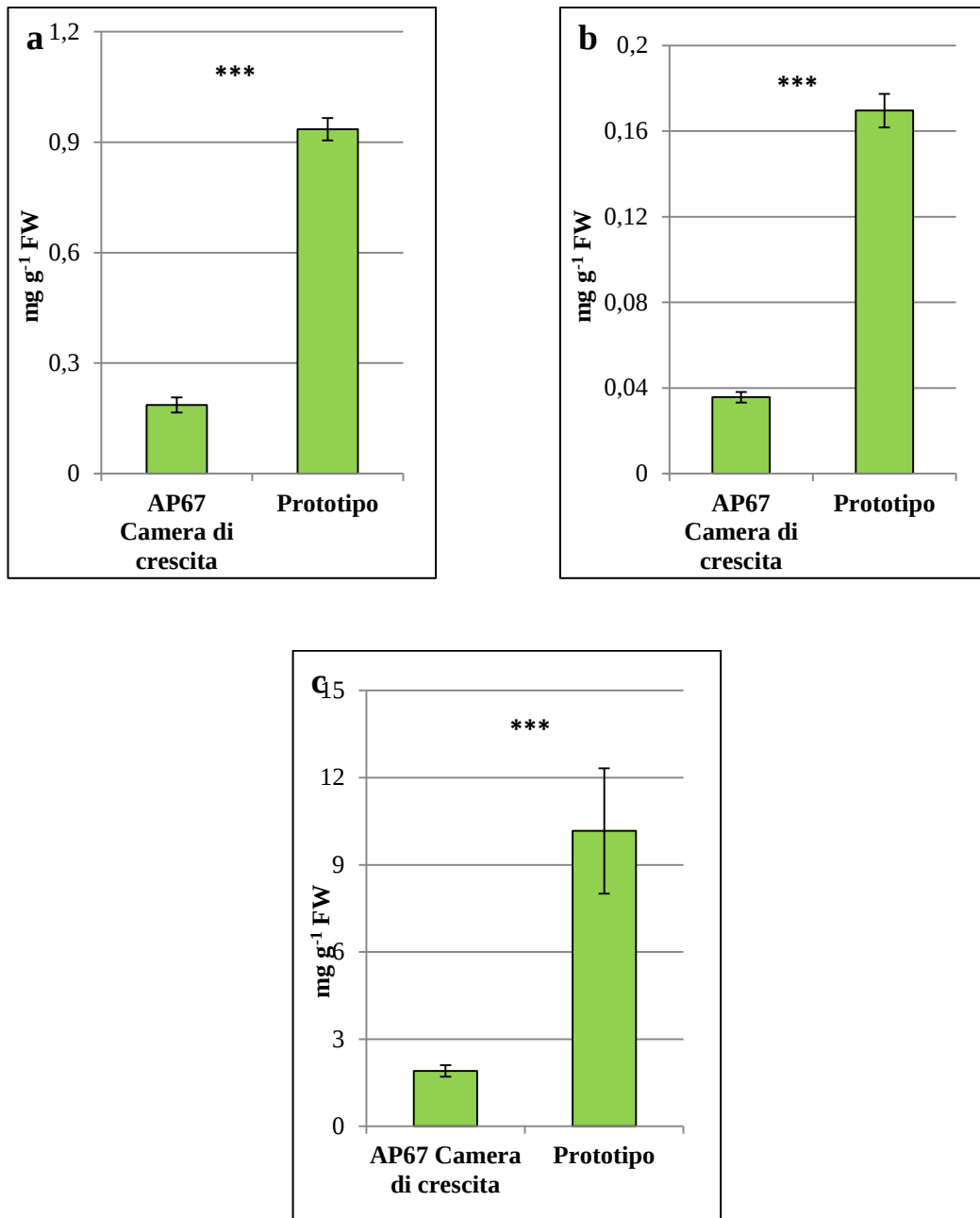


Figura 4.13 – Contenuto di clorofilla (a), di β -carotene (b) e di proteine (c) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni con terreno DAFNE nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

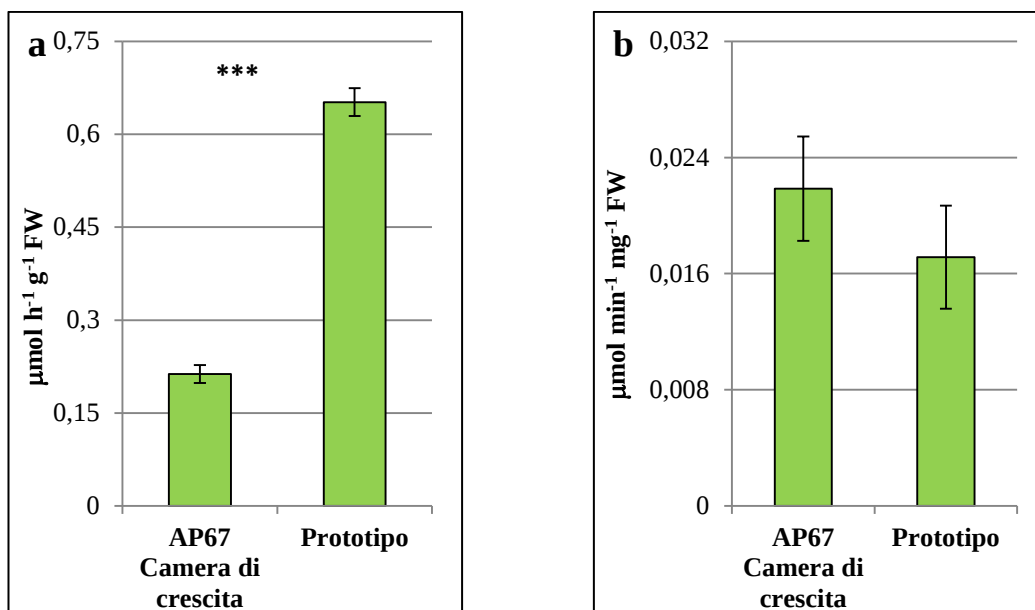


Figura 4.14 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni con terreno DAFNE nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$.

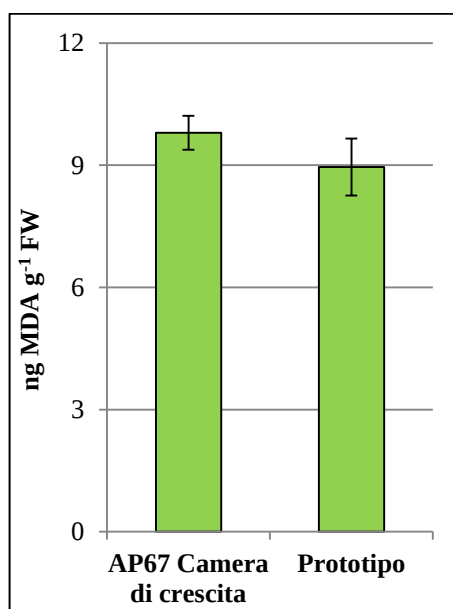


Figura 4.15 – Contenuto di MDA nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni con terreno DAFNE nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$.

4.1.2.3 Discussione

Le piante di faggio allevate nei mini-contenitori sono cresciute normalmente indicando che le condizioni colturali adottate sono state appropriate, confermando la sua efficacia (Kostopoulou *et al.*, 2010; Mattsson *et al.*, 2010).

Il pre-allevamento con i LED nelle camere di crescita ha determinato una diminuzione del contenuto di clorofilla e carotenoidi nelle piantine di faggio, rispetto al controllo (Figura 4.9). Un minor contenuto di clorofilla potrebbe essere la conseguenza della luce R presente negli spettri LED utilizzati nello studio. Infatti, è ben noto che lo spettro R determina una riduzione del contenuto totale di clorofilla in diverse specie vegetali (Tanaka *et al.*, 1998; Yorio *et al.*, 2001). I carotenoidi sono pigmenti che assorbono specifiche lunghezze d'onda che si trovano nella regione del blu (Hopkins e Huner, 2004). Infatti, il contenuto di questi pigmenti aumenta nelle piante quando allevate con lampade che contengono lo spettro B, rispetto a una crescita con solamente luce R o bianca (Johkan *et al.*, 2010). Nonostante le lampade LED utilizzate in questo lavoro abbiano una percentuale di luce B, probabilmente tale percentuale non è sufficiente a stimolare la produzione di carotenoidi nelle plantule di faggio.

È interessante notare come la diminuzione del contenuto di clorofilla e carotenoidi e del contenuto proteico nelle plantule allevate con luce LED rispetto al controllo si è manifestato sia con il substrato Jiffy (Figura 4.1; Figura 4.2) sia con il terreno sperimentale DAFNE (Figura 4.9; Figura 4.10). I dati ottenuti confermano che l'esposizione delle plantule di faggio all'illuminazione LED, in relazione alla lampada fluorescente, comporti una forte riduzione dei pigmenti fotosintetici e una ridotta sintesi proteica. Si potrebbe ipotizzare quindi che questa specie forestale sia molto sensibile all'effetto causato dall'esposizione alla luce rossa prodotta dalle lampade LED, orse in virtù del temperamento sciafilo che presenta in natura soprattutto nelle prime fasi di crescita.

Come previsto, sono state indagate le attività enzimatiche della NR e della GS.

Dalla Figura 4.11a si nota che l'allevamento con le lampade LED AP67-Arch, AP67 e G2 ha inibito l'attività della NR nelle foglie di faggio rispetto alla crescita con luce fluorescente. L'attività dell'enzima NR è fortemente indotta dalla presenza di NO_3^- nel terreno e dalla luce (Lillo, 2008). Non è chiaro il motivo per cui questi tre spettri hanno inibito l'attività enzimatica, ma anche in questa circostanza probabilmente la luce

Risultati e Discussione

R e FR presente negli spettri potrebbe determinare una diminuzione dell'attività enzimatica (Rajasekar *et al.*, 1988). Tuttavia, sarebbe opportuno effettuare ulteriori indagini per comprendere i meccanismi coinvolti nella risposta della NR nelle piante di faggio cresciute con substrato DAFNE.

La coltivazione con gli spettri NS2, AP67 e G2 stimolerebbe l'attività enzimatica della GS per la sintesi di glutammina (Figura 4.11b), indicando quindi un apporto energetico (ATP) sufficiente e sufficienti concentrazioni di carboidrati da parte della fotosintesi, nonostante il basso contenuto di pigmenti fotosintetici (Figura 4.9), che farebbe ipotizzare una ridotta attività fotosintetica, e di proteine (Figura 4.10). Tuttavia, si potrebbe supporre che le prestazioni dell'apparato fotosintetico e la produzione di metaboliti potrebbero essere indipendenti dal contenuto relativamente basso di clorofilla (Saebo *et al.*, 1995). È interessante notare inoltre che nelle piante di faggio allevate con gli spettri LED AP67 e G2 si riscontrava un'inibizione dell'attività della NR e una stimolazione dell'enzima GS. Si potrebbe ipotizzare che la glutammina, che è il prodotto finale della reazione catalizzata dalla GS, provochi un'inibizione della NR, dato fra l'altro coerente con quanto descritto in letteratura (Forde, 2002; Ali *et al.*, 2007).

L'elevato contenuto proteico nelle piante di faggio allevate con la lampada fluorescente (Figura 4.10) potrebbe essere il risultato di un'induzione della sintesi proteica in modo da far fronte a un maggior stress ossidativo. Infatti, come si può notare dalla Figura 4.12, la crescita con lampade fluorescenti ha aumentato i contenuti di MDA nei germogli delle piantine di faggio. La MDA può essere considerata un marker dello stato perossidato dei tessuti biologici (Bailly *et al.*, 1996), essendo un prodotto di decomposizione degli idroperossidi di acidi grassi polinsaturi. Recenti studi hanno dimostrato inoltre che un aumento di MDA è riscontrato nelle piante quando esposte a elevate intensità luminose (Ilieva *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda la fase sperimentale relativa al Prototipo, le plantule di faggio, alla fine del ciclo colturale nella camera sperimentale, hanno mostrato parametri di crescita paragonabili a quelle cresciute nella camera tradizionale, indicando che le condizioni sperimentali impostate erano idonee per lo sviluppo della specie.

Risultati e Discussione

Trascorso il periodo di allevamento di 30 giorni, la crescita nel Prototipo con terreno DAFNE ha determinato un aumento significativo del contenuto di clorofilla e carotenoidi rispetto alla crescita nella camera di allevamento tradizionale (Figura 4.13a, 4.13b). Tale risposta potrebbe essere il risultato dell'attivazione di meccanismi di adattamento causati dall'alternanza di momenti di alta e bassa irradianza nella camera sperimentale (Lichtenthaler *et al.*, 1982; Leong e Anderson, 1984)

Inoltre, nelle medesime piante si è riscontrato un maggior contenuto proteico rispetto al controllo (Figura 4.13c), indicando di conseguenza un aumento della sintesi proteica. In questo senso, sarebbe ragionevole supporre che il Prototipo stimoli l'attività metabolica nelle piantine di faggio nei primi giorni della loro vita.

A conferma di questa ipotesi, dalla Figura 4.14a, la camera di crescita sperimentale ha determinato un notevole aumento dell'attività dell'enzima NR. L'attività della NR è regolata da diversi fattori, quali la concentrazione di NO_3^- e la luce (Lillo, 2008). Inoltre, è stato dimostrato che l'enzima NR è stimolato quando vi è un aumento dall'attività fotosintetica nelle piante. In particolare, è stato verificato che la somministrazione di carboidrati alle piante può, in parte, sostituire la luce nel favorire l'attività enzimatica della NR (Cheng *et al.*, 1992; Vincentz *et al.*, 1993). In quest'ottica, l'aumento del contenuto di pigmenti (clorofilla e carotenoidi) riscontrato nelle piante di faggio allevate nel Prototipo (Figura 4.13a, 4.13b), potrebbe essere un'indicazione di una maggior attività fotosintetica che risulta in un successivo aumento nella produzione di scheletri carboniosi che potrebbero contribuire a indurre l'attività enzimatica.

Infine, il Prototipo non ha aumentato il contenuto di MDA nelle foglie di faggio rispetto alla crescita in una camera tradizionale (Figura 4.15), suggerendo quindi che la camera sperimentale non aumenta il rischio di danno alle membrane cellulari a causa di uno stress ossidativo eccessivo.

4.1.3 Differenze di crescita fra il terreno Jiffy e il terreno DAFNE

Analizzando le differenze fra i due terreni, si nota che il terreno DAFNE ha aumentato il contenuto di pigmenti fotosintetici nelle piante allevate con luce

Risultati e Discussione

fluorescente, AP67-Arch e NS2, rispetto al terreno Jiffy (Figura 4.16), suggerendo probabilmente un'attività fotosintetica efficiente in queste piante di faggio. Inoltre, tutte le piantine di faggio allevate con terreno DAFNE hanno avuto un maggior contenuto di proteine rispetto a quelle cresciute con il substrato Jiffy, che potrebbe essere una conseguenza di una maggior sintesi proteica (Figura 4.17).

Gli enzimi del metabolismo dell'azoto hanno variato la loro attività secondo il tipo di terreno utilizzato. Il terreno DAFNE ha stimolato l'enzima NR mentre ha inibito l'attività della GS, rispetto al terreno Jiffy (Figura 4.18). Il substrato DAFNE favorirebbe quindi l'assorbimento del nitrato per la sua riduzione a nitrito, mentre ridurrebbe la biosintesi di glutammina. La maggior attività della NR potrebbe essere determinata dal glutammato e dall' α -chetoglutarato, substrati della GS e precursori della glutammina, conseguenza di un'attività della GS ridotta. Queste variazioni potrebbero comunque essere una conseguenza del tipo di miscela utilizzata nella composizione del terreno DAFNE.

Infine, nelle plantule di faggio allevate con terreno Jiffy sotto gli spettri NS2 e G2 è stato osservato un contenuto di MDA maggiore rispetto alle piante sviluppate nel substrato DAFNE, indicando un maggior danno causato da stress ossidativo (Figura 4.19).

Entrambi i terreni sono risultati idonei per la pre-coltivazione in ambiente controllato in quanto il faggio non ha dimostrato segni di disturbo sia con il terreno Jiffy che con quello DAFNE. Il substrato sperimentale si è dimostrato comunque utile per ottenere piantine di faggio di buona qualità in contenitore, sia sotto un profilo produttivo che economico.

Essendo questo il primo lavoro in cui è stato sperimentato il terreno DAFNE, sarebbero necessarie ulteriori studi per valutare la risposte delle piante di faggio coltivate su questo substrato.

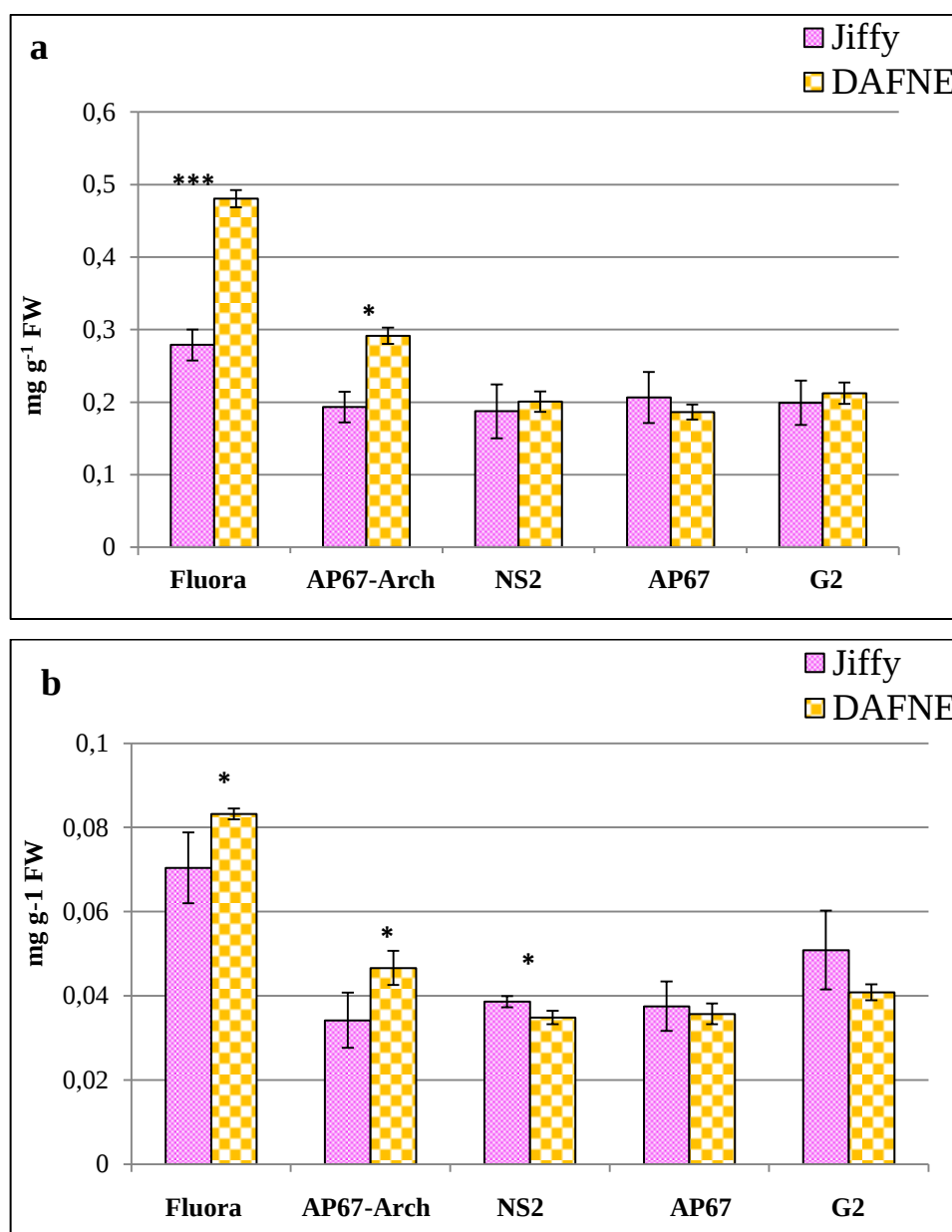


Figura 4.16 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

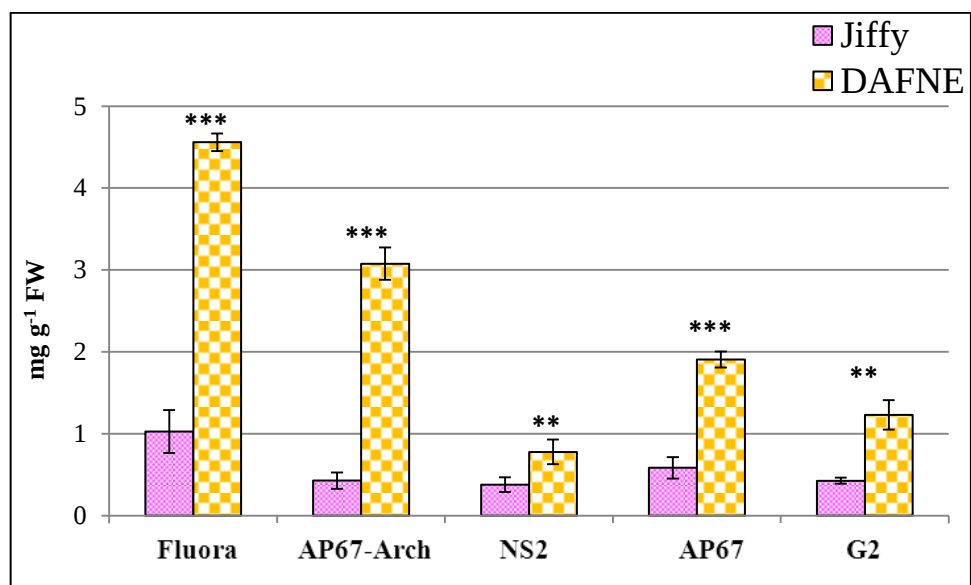


Figura 4.17 – Contenuto di proteine nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

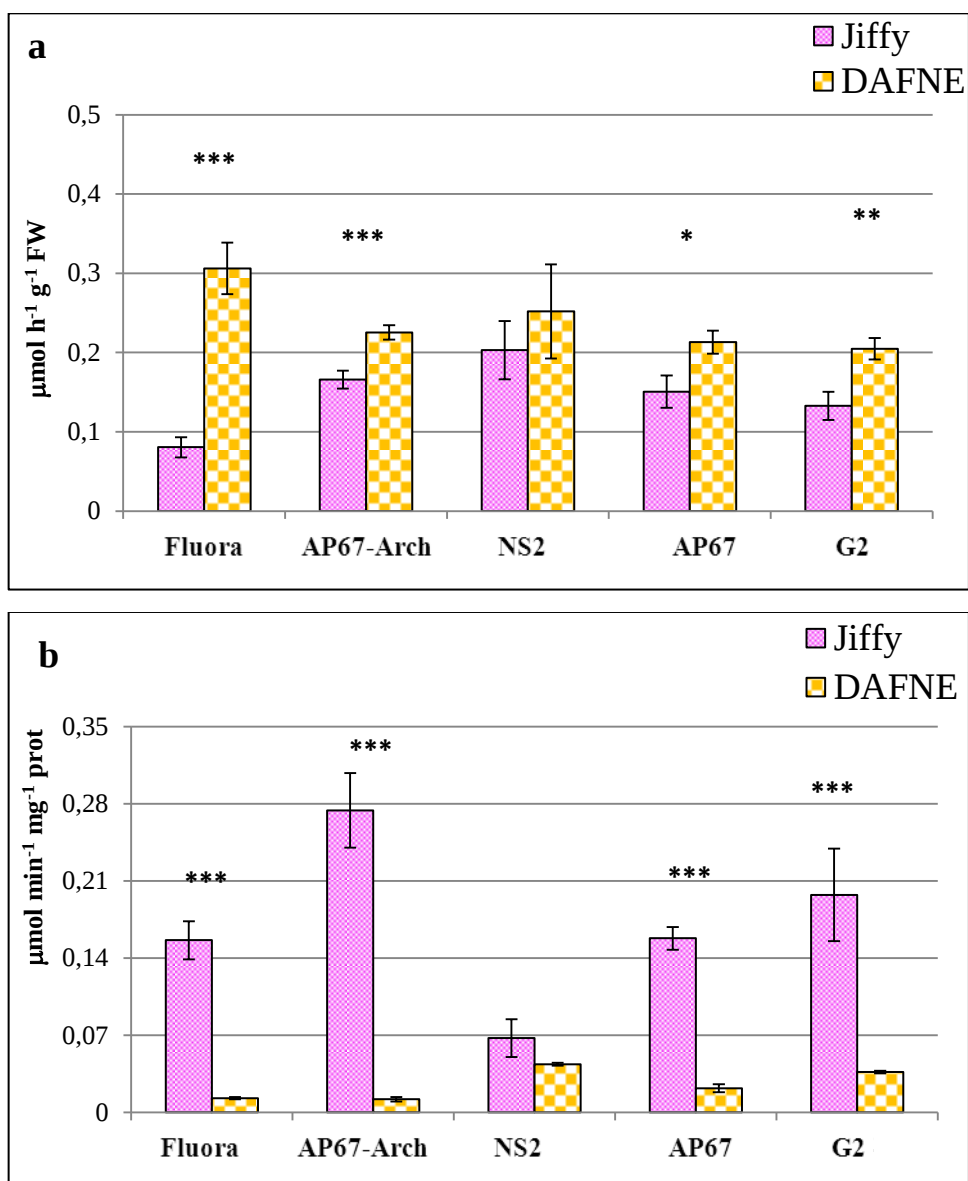


Figura 4.18 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

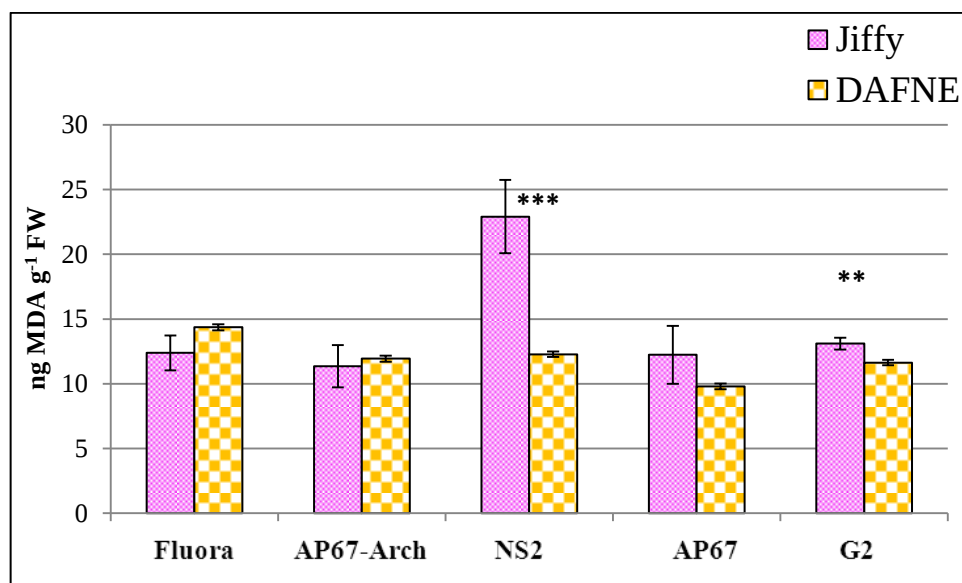


Figura 4.19 – Contenuto di MDA nelle foglie di faggio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS

4.1.4 Conclusioni

Dai risultati ottenuti si nota che la crescita della specie forestale *Fagus sylvatica* L. è condizionata dalla luce.

La pre-coltivazione nelle camere di crescita con i quattro spettri LED nel terreno Jiffy e nel terreno DAFNE è risultata idonea per la crescita del faggio, nonostante il basso contenuto di pigmenti fotosintetici e di proteine riscontrati in entrambe le semine nelle piante esposte alle lampade LED. Questo risultato indicherebbe una ridotta attività fotosintetica e una ridotta sintesi proteica nelle plantule di faggio allevate sotto i LED rispetto alla luce fluorescente, confermando una sensibilità delle piante di faggio a questo tipo di illuminazione.

Nonostante ciò, l'illuminazione a LED ha determinato un aumento dell'attività della NR e della GS, rispettivamente nel terreno Jiffy e nel terreno DAFNE, stimolando quindi l'assimilazione dell'azoto.

Inoltre, in generale, in tutte le condizioni sperimentali analizzate con i due terreni, gli spettri LED non hanno causato stress fotossidativo riducendo il rischio di un danno cellulare a carico delle membrane plasmatiche.

Dai risultati ottenuti, si può tranquillamente affermare che le lampade LED utilizzate nella fase di pre-coltivazione potrebbero essere una valida alternativa alle lampade fluorescenti per la coltivazione delle piante di faggio in ambiente controllato. La loro applicazione in questa fase di produzione permettere di ottenere materiale forestale di buona qualità con un sensibile risparmio energetico.

Inoltre, l'utilizzo del terreno sperimentale DAFNE ha soddisfatto le esigenze di crescita delle piantine di faggio, raggiungendo lo scopo di produrre un terreno in loco risparmiando tempo e denaro derivati dall'acquisto di un terreno esoso e di difficile reperibilità.

Per gli studi relativi al Prototipo, i risultati ottenuti indicano che la camera di crescita sperimentale può essere utilizzata per la produzione su larga scala della specie forestale *Fagus Sylvatica* L., in substrato DAFNE, in quanto ha migliorato lo sviluppo, in termini di contenuto di pigmenti fotosintetici e di proteine, e l'attività metabolica delle piante, rispetto al controllo. Inoltre, non ha causato danno ossidativo sulle membrane cellulari poiché non ha aumentato il contenuto di MDA, un indicatore della

Risultati e Discussione

perossidazione dei lipidi, rispetto a un allevamento in una camera di crescita comunemente utilizzata per la produzione di materiale vegetale.

Una camera climatica avente le caratteristiche del Prototipo non è stata mai costruita e quindi questo lavoro rappresenta il primo studio che riguarda l'utilizzo di questa camera sperimentale su specie vegetali. Sarebbero necessarie ulteriori indagini per valutare le risposte delle piante con questo tipo di allevamento, nonostante ciò, il Prototipo ha soddisfatto le aspettative di crescita del faggio.

Con il successivo passaggio in campo, le piante di faggio precedentemente coltivate sotto i LED con substrato Jiffy hanno mantenuto un basso contenuto di clorofilla e carotenoidi, indicando una sensibilità di questi pigmenti nei confronti del tipo di illuminazione utilizzata durante la fase di pre-coltivazione.

Comunque, la pre-coltivazione con l'illuminazione a LED non ha determinato differenze nella concentrazione di MDA rispetto alla lampada fluorescente una volta avvenuto il trapianto in campo, indicando quindi che il loro utilizzo non indurrebbe uno stress fotossidativo successivo.

Questo lavoro rappresenta il primo studio dell'effetto dell'illuminazione LED, utilizzata durante la fase di pre-coltivazione, su una specie forestale dopo la messa a dimora nell'ambiente naturale e sono quindi necessarie ulteriori indagini per poter valutare in maniera più approfondita le risposte ottenute.

Nonostante ciò, le piante pre-allevate con gli spettri LED hanno dimostrato una buona ripresa vegetativa, considerando le condizioni post-serra critiche, confermando che le condizioni di crescita e l'illuminazione a LED utilizzate durante la fase di pre-coltivazione sono state idonee.

4.2 Leccio

4.2.1 Esperimenti con terreno Jiffy

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di leccio coltivate con substrato Jiffy, sia in ambiente controllato (camere di crescita e Prototipo) che in ambiente aperto (serra e impianto).

4.2.1.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita

Le piante di leccio allevate con i LED NS2 hanno mostrato un aumento nel contenuto di clorofilla (+82%) rispetto alle piante controllo, mentre, non si sono osservate differenze statisticamente significative di questo parametro nelle piante cresciute con gli altri spettri LED o con lampade controllo (Figura **4.20a**).

Inoltre, si è osservato un aumento nel contenuto di β -carotene nelle piantine di leccio esposte agli spettri NS2 e G2 (+109% e +55% rispettivamente), rispetto alle piantine controllo (Figura **4.20b**).

Solamente le lampade NS2 (+68%) e AP67 (+103%) hanno determinato un aumento del contenuto proteico nelle piantine di leccio (Figura **4.21**).

L'attività dell'enzima NR è stata maggiore nelle foglie delle piante allevate con NS2 (+145%) e AP67-Arch (+109%), mentre la stessa attività enzimatica è rimasta invariata nelle piante cresciute con G2 e AP67 rispetto al controllo (Figura **4.22a**).

Allo stesso modo, lo spettro NS2 ha determinato un aumento dell'attività della GS del 152% rispetto alle piante allevate con lampade fluorescenti, mentre gli altri spettri LED non hanno effetti statisticamente significativi sull'attività enzimatica (Figura **4.22b**).

Infine, è stato valutato il contenuto di malondialdeide per stabilire il livello di perossidazione dei lipidi. L'impiego delle lampade LED per l'allevamento delle piante non ha avuto effetti sulla concentrazione della MDA rispetto all'allevamento tradizionale con le lampade fluorescenti (figura **4.23**).

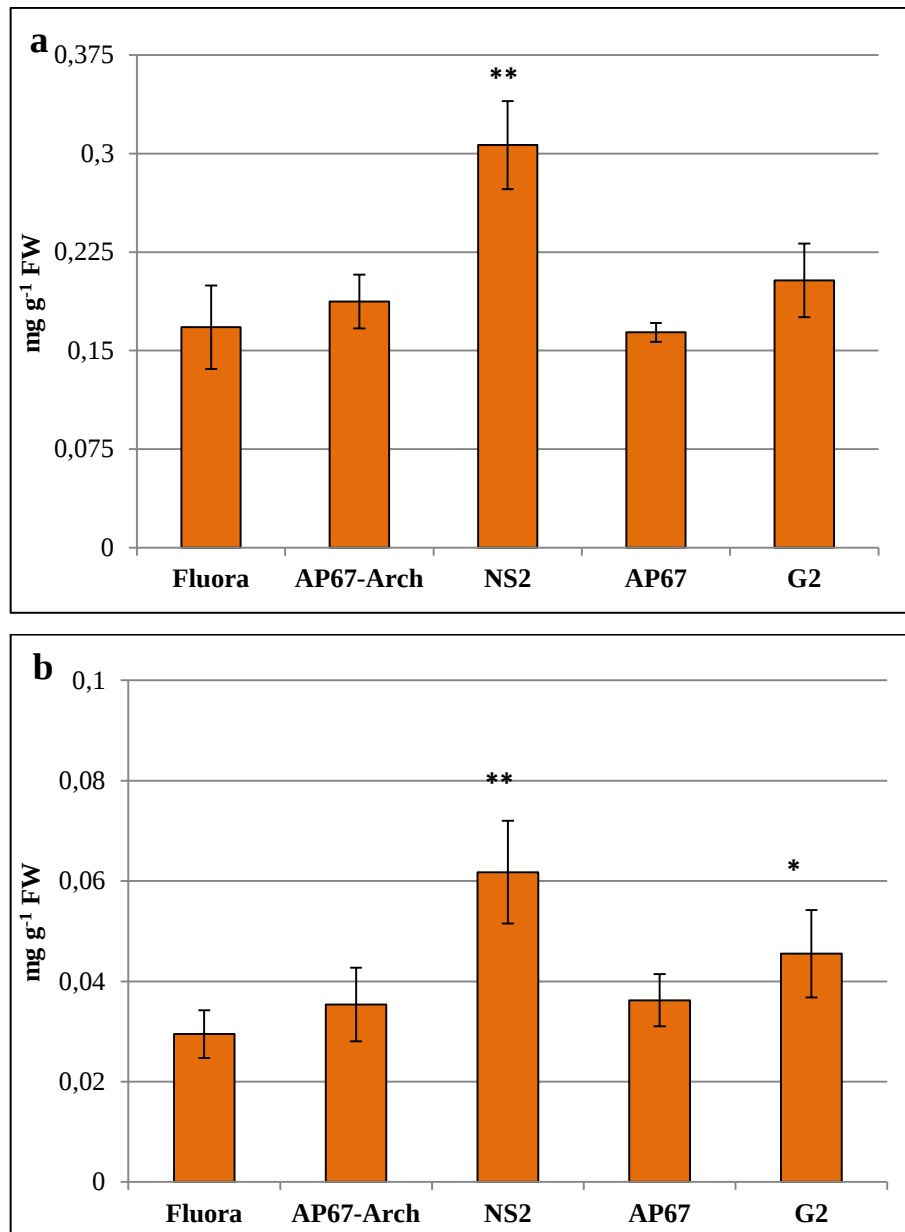


Figura 4.20 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

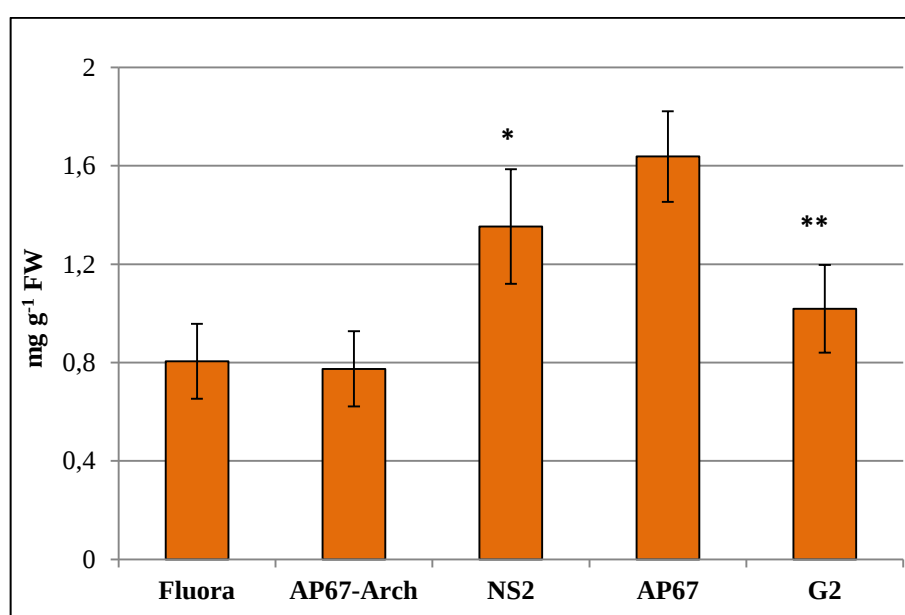


Figura 4.21 – Contenuto di proteine nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

Risultati e Discussione

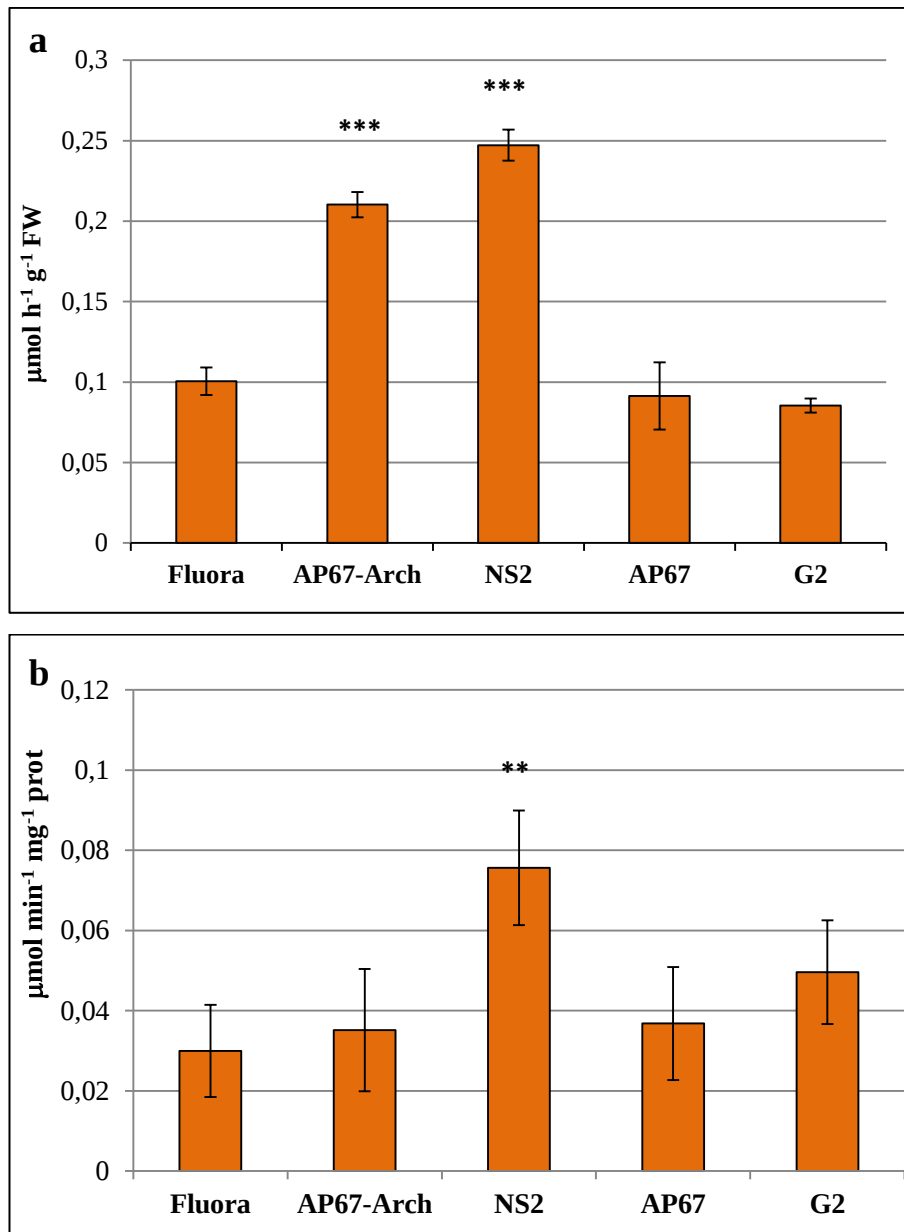


Figura 4.22 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$.

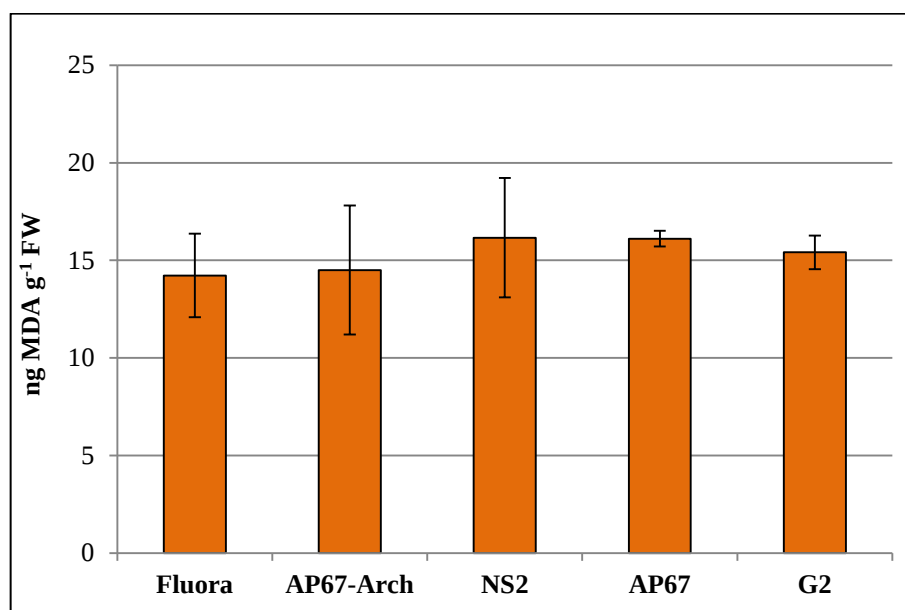


Figura 4.23 – Contenuto di MDA nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

4.2.1.2 Prototipo

La fase di pre-coltivazione nel Prototipo ha determinato un aumento significativo del contenuto di clorofilla (+238%) e di carotenoidi (+350%) nel leccio rispetto al controllo allevato nella camera tradizionale (Figura **4.24a**, **4.24b**).

Inoltre, la crescita nel Prototipo ha determinato un aumento pari al 70% del contenuto di proteine nelle piantine di leccio rispetto alle plantule allevate nella camera di crescita tradizionale (Figura **4.24c**).

Anche in questa fase sperimentale, sono state valutate le attività degli enzimi chiave coinvolti nel meccanismo di assimilazione dell'azoto.

Dai dati ottenuti si nota che l'attività di entrambi gli enzimi analizzati, NR e GS, non è influenzata dalle diverse condizioni di crescita (Prototipo o camera tradizionale) (Figura **4.25**).

Come appena osservato per l'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'azoto, anche la concentrazione di MDA non ha subito variazioni significative nelle piante allevate nel prototipo o nella camera di crescita (Figura **4.26**).

Risultati e Discussione

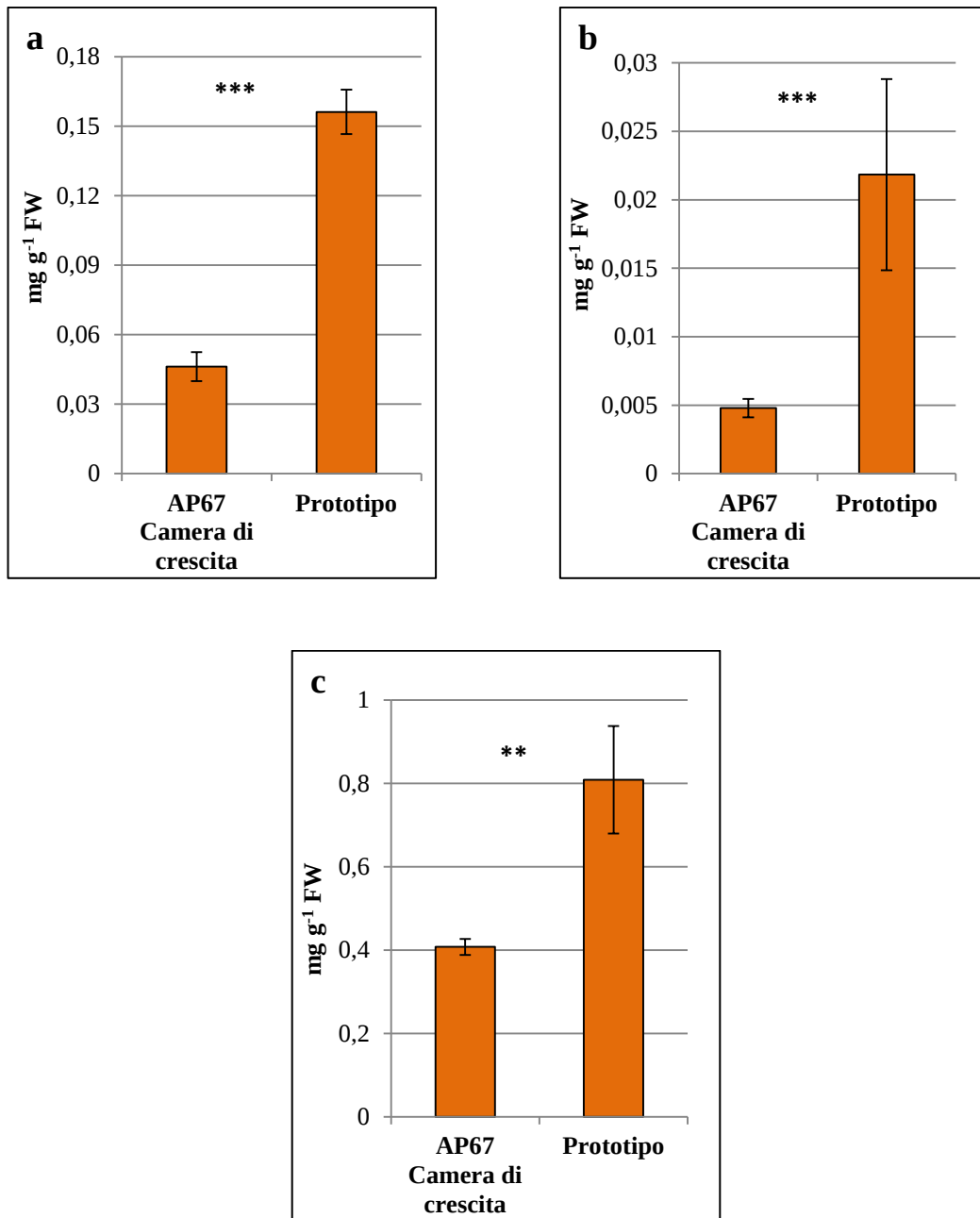


Figura 4.24 – Contenuto di clorofilla (a), di β -carotene (b) e di proteine (c) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni con terreno Jiffy nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

Risultati e Discussione

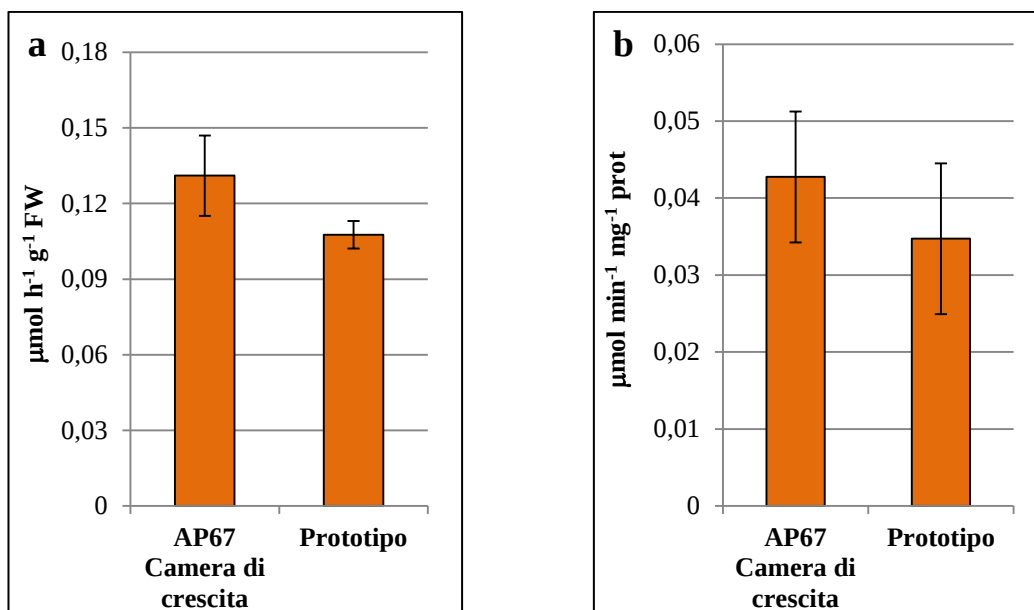


Figura 4.25 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni con terreno Jiffy nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$.

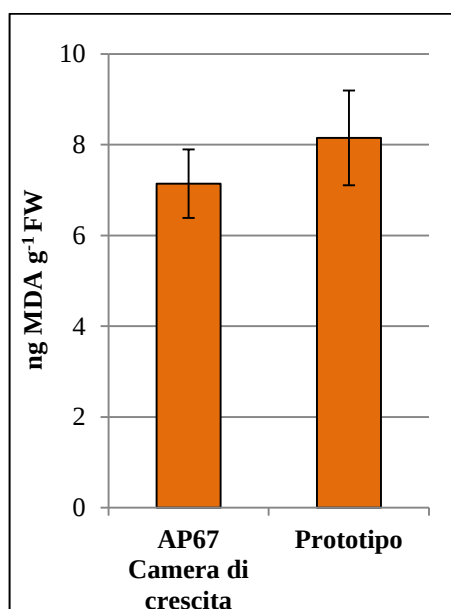


Figura 4.26 – Contenuto di MDA nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni con terreno Jiffy nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$.

4.2.1.3 Serra

Al termine del periodo di pre-coltivazione nelle camere di crescita, le piantine di leccio, cresciute con le differenti condizioni di illuminazione nel terreno Jiffy, sono state trapiantate in contenitori più grandi e trasferite in serra.

Le analisi sono state effettuate 90 giorni dopo il trasferimento.

Le piante pre-coltivate sotto le lampade LED AP67-Arch hanno mostrato una diminuzione del contenuto di clorofilla totale pari al 66%, mentre le altre piante non hanno avuto differenze significative di questo dato paragonate al controllo (Figura 4.27a).

Allo stesso modo, si è osservato una diminuzione nel contenuto di carotenoidi nelle piantine pre-allevate con lo spettro AP67-Arch (-63%) rispetto alle piante controllo (Figura 4.27b).

Le piante di leccio pre-coltivate con le lampade LED hanno mostrato un incremento nel contenuto di proteine rispetto alle piante allevate con lampade fluorescenti (Figura 4.28). Questo effetto è stato particolarmente evidente nelle piante cresciute sotto le lampada NS2 (+225%) e AP67 (+84%).

La pre-coltivazione del leccio sotto le lampade AP67-Arch e G2 ha determinato un aumento dell'attività dell'enzima NR (+35% e +48% rispettivamente) in relazione alla crescita con lampade tradizionali, mentre le piante precedentemente pre-allevate con gli altri spettri LED non hanno mostrato valori dell'attività enzimatica statisticamente diversi quando paragonate alle piante pre-coltivate con lampade fluorescenti (Figura 4.29a).

D'altra parte, il pre-allevamento con gli spettri LED ha causato, una volta trasferite le piante in serra, una diminuzione nell'attività dell'enzima GS. In particolare, questa riduzione dell'attività è stata evidente nel leccio pre-allevato sotto le lampade AP67 (-84%) e NS2 (-82) rispetto al controllo (Figura 4.29b).

Infine, è stato valutato l'effetto delle diverse condizioni di crescita sul livello di perossidazione dei lipidi, utilizzando come indice la concentrazione di malondialdeide (MDA), dopo il trasferimento in serra. Alla fine della fase sperimentale, si è osservato che la pre-coltivazione con gli spettri LED non ha causato cambiamenti significativi nella concentrazione di MDA rispetto al leccio cresciuto con le lampade fluorescenti (Figura 4.30).

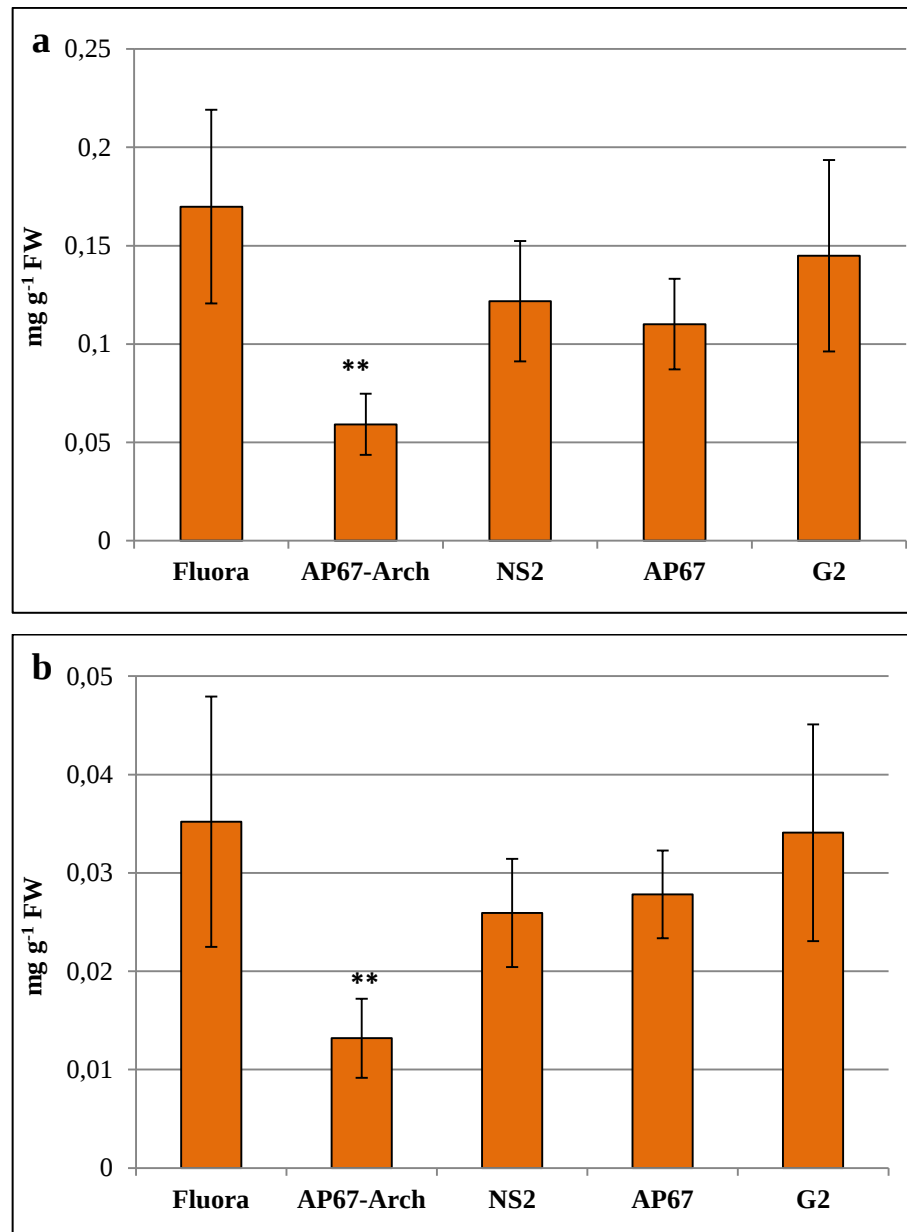


Figura 4.27 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e successivamente trasferite in serra per 90 giorni. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

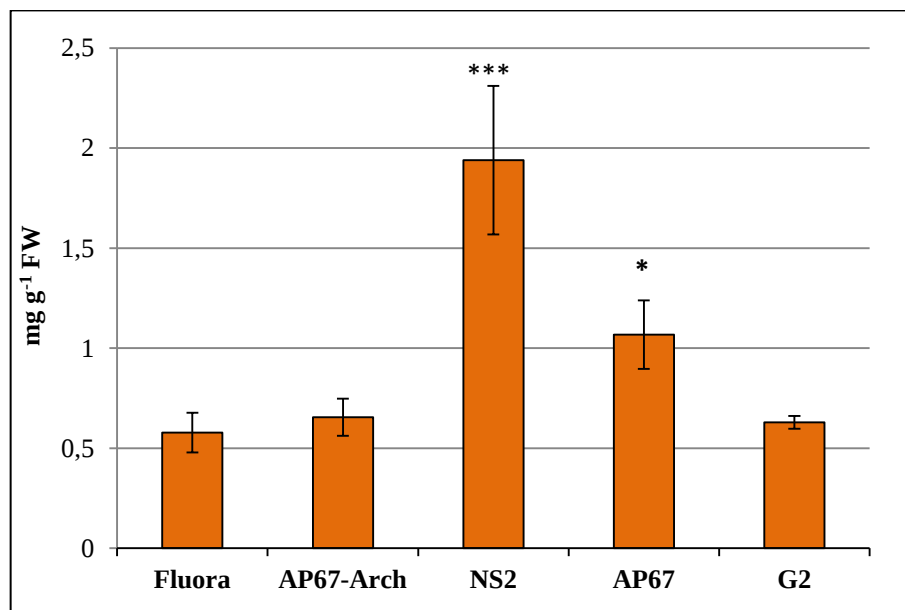


Figura 4.28 – Contenuto di proteine nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e successivamente trasferite in serra. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

Risultati e Discussione

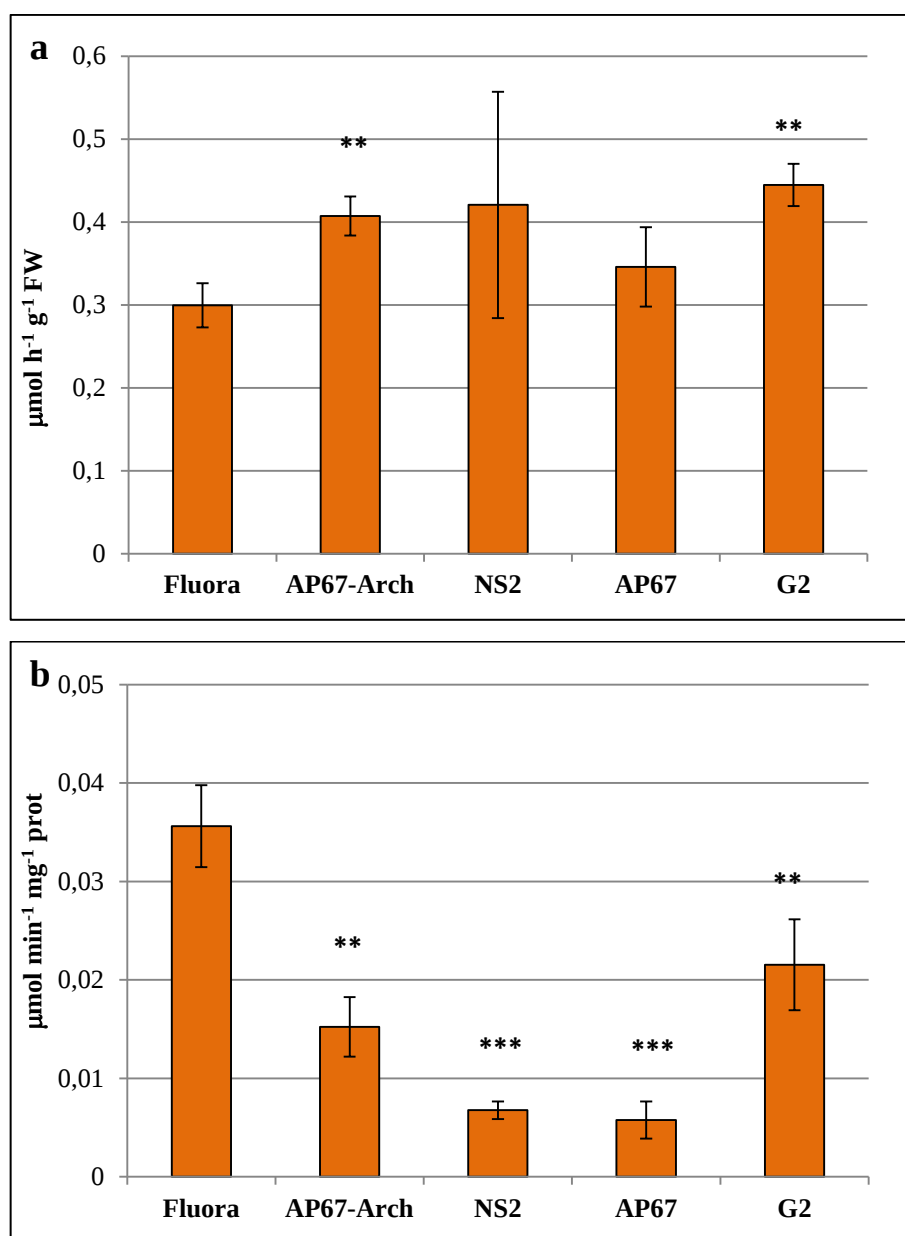


Figura 4.29 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e successivamente trasferite in serra. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$.

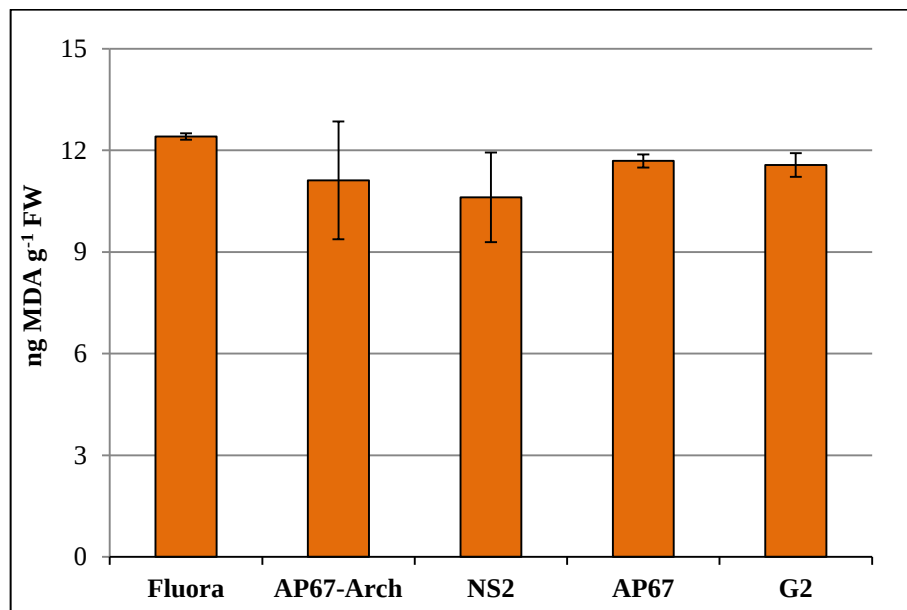


Figura 4.30 – Contenuto di MDA nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e successivamente trasferiti in serra. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

4.2.1.4 Trapianto in campo

Terminato il ciclo colturale in serra, le piante di leccio pre-coltivate in camere climatiche sono state trapiantate in campo aperto.

Lo schema sperimentale (Figura 3.10) prevedeva tre parcelle per singolo spettro, con 16 piante ciascuna, posizionate a caso nell'area di impianto per un totale di 15 parcelle.

Sono stati effettuate le seguenti indagini:

3. analisi dei metaboliti delle piante appartenenti alle tre ripetizioni di un singolo spettro al fine di valutare eventuali influenze del terreno sullo sviluppo delle piante;
4. confronto fra gli spettri.

Entrambe le valutazioni sono state effettuate dopo 12 mesi dalla messa a dimore delle piante di leccio.

L'analisi statistica degli esperimenti delle piante appartenenti allo stesso spettro non ha messo in evidenza alcuna differenza significativa dovuta alla posizione delle tre ripetizioni sul campo. I risultati non sono riportati.

La pre-coltivazione con gli spettri LED AP67 e G2 ha causato una diminuzione nel contenuto di clorofilla, del 35% e del 41% rispettivamente, rispetto alle piante controllo (Figura 4.31a), mentre non sono state notate differenze significative tra il leccio pre-coltivato con gli spettri LED o fluorescente nel contenuto di β -carotene (Figura 4.31b).

La pre-coltivazione con gli spettri LED, indipendentemente dal tipo di lampada analizzata, ha determinato una diminuzione del contenuto di proteine, con valori compresi tra il 43% e il 47%, rispetto alla lampada fluorescente, nelle piante di leccio una volta trapiantate in campo (Figura 4.32).

Successivamente, sono state analizzate le modificazioni indotte a livello del metabolismo dell'azoto. Per quanto riguarda l'attività dell'enzima NR, è stata notata una minor attività enzimatica nelle piante di leccio pre-coltivate con gli spettri AP67-Arch e AP67 rispetto al controllo (-39% e -37% rispettivamente), mentre in quelle pre-

Risultati e Discussione

coltivate con lo spettro NS2 l'attività enzimatica è stata più alta (circa 40%) (Figura **4.33a**).

Il pre-allevamento con gli spettri LED non ha determinato differenze significative dell'attività della GS quando paragonati al controllo, tranne che per lo spettro AP67 che ha determinato un aumento dell'attività enzimatica pari al 44% rispetto al leccio controllo (Figura **4.33b**).

Lo stress ossidativo determinato dalle diverse fonti luminose utilizzate durante la fase di pre-coltivazione è stato analizzato in base alle variazioni nei livelli di MDA nei tessuti fogliari delle piante. La pre-coltivazione con gli spettri NS2 e G2 ha determinato una notevole diminuzione del contenuto di MDA (-25% e -30%, rispettivamente) rispetto al controllo, mentre i rimanenti spettri AP67-Arch e AP67 non hanno mostrato differenze significative con il controllo (Figura **4.34**).

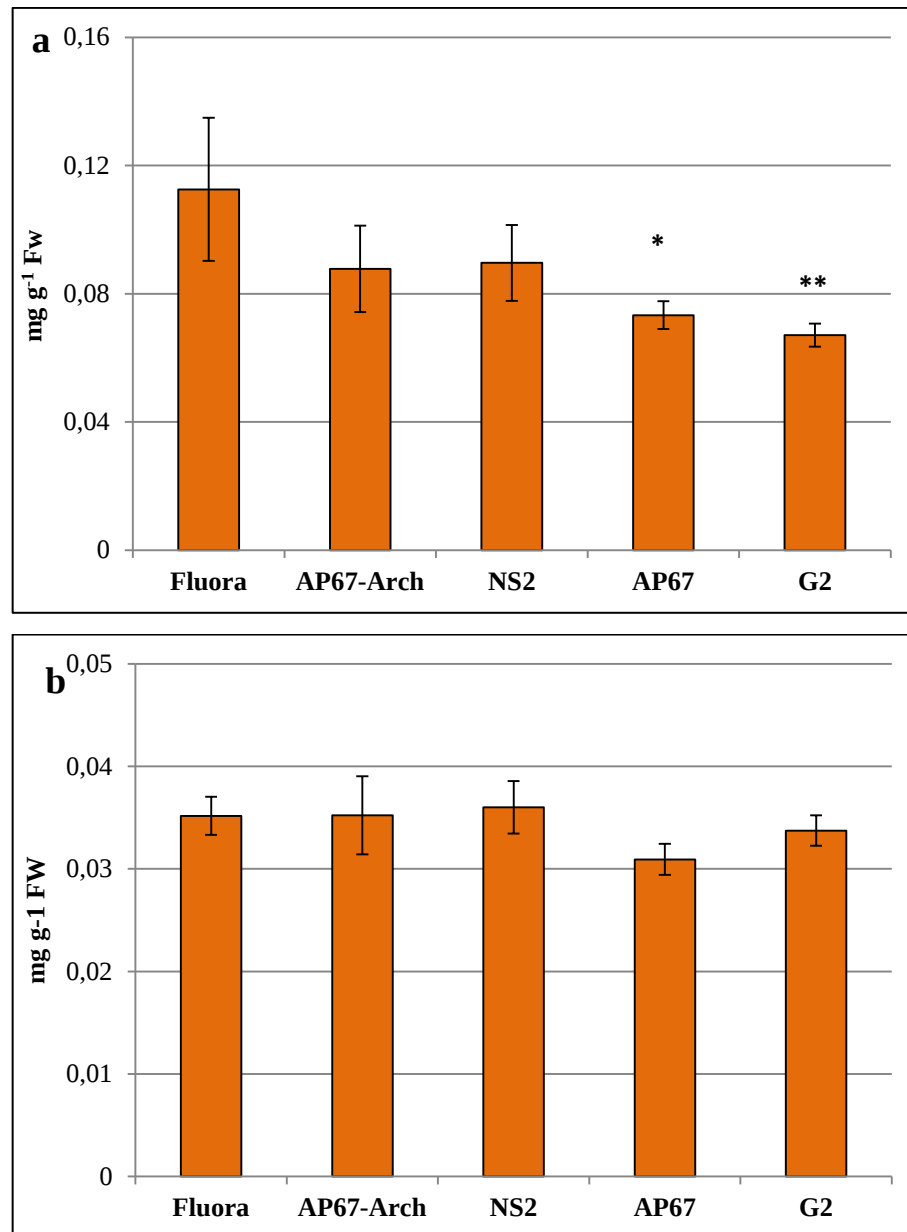


Figura 4.31 – Contenuto di clorofilla (a) e di β-carotene (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy, successivamente trasferite in serra e infine trapiantate in pieno campo per 12 mesi. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

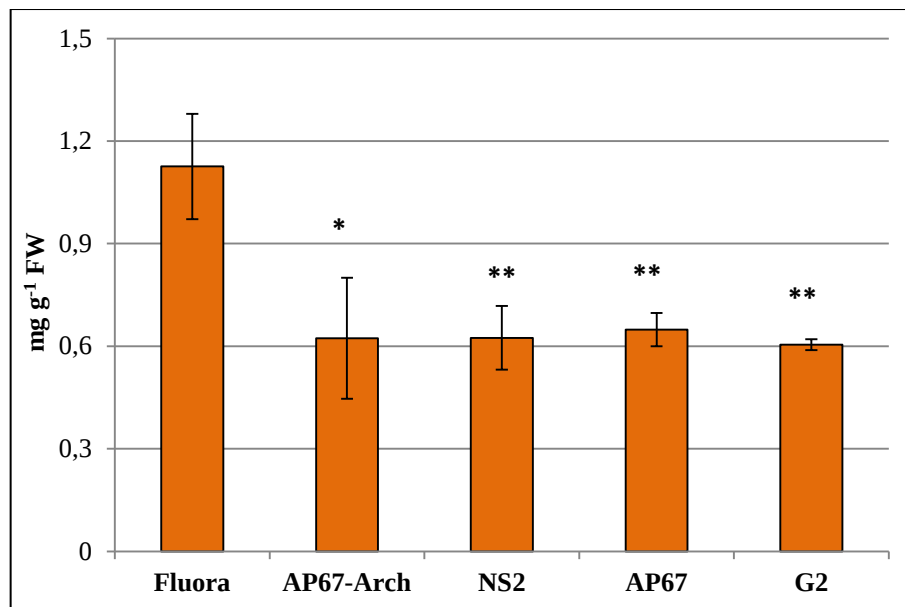


Figura 4.32 – Contenuto di proteine nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy, successivamente trasferite in serra e infine trapiantate in pieno campo. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

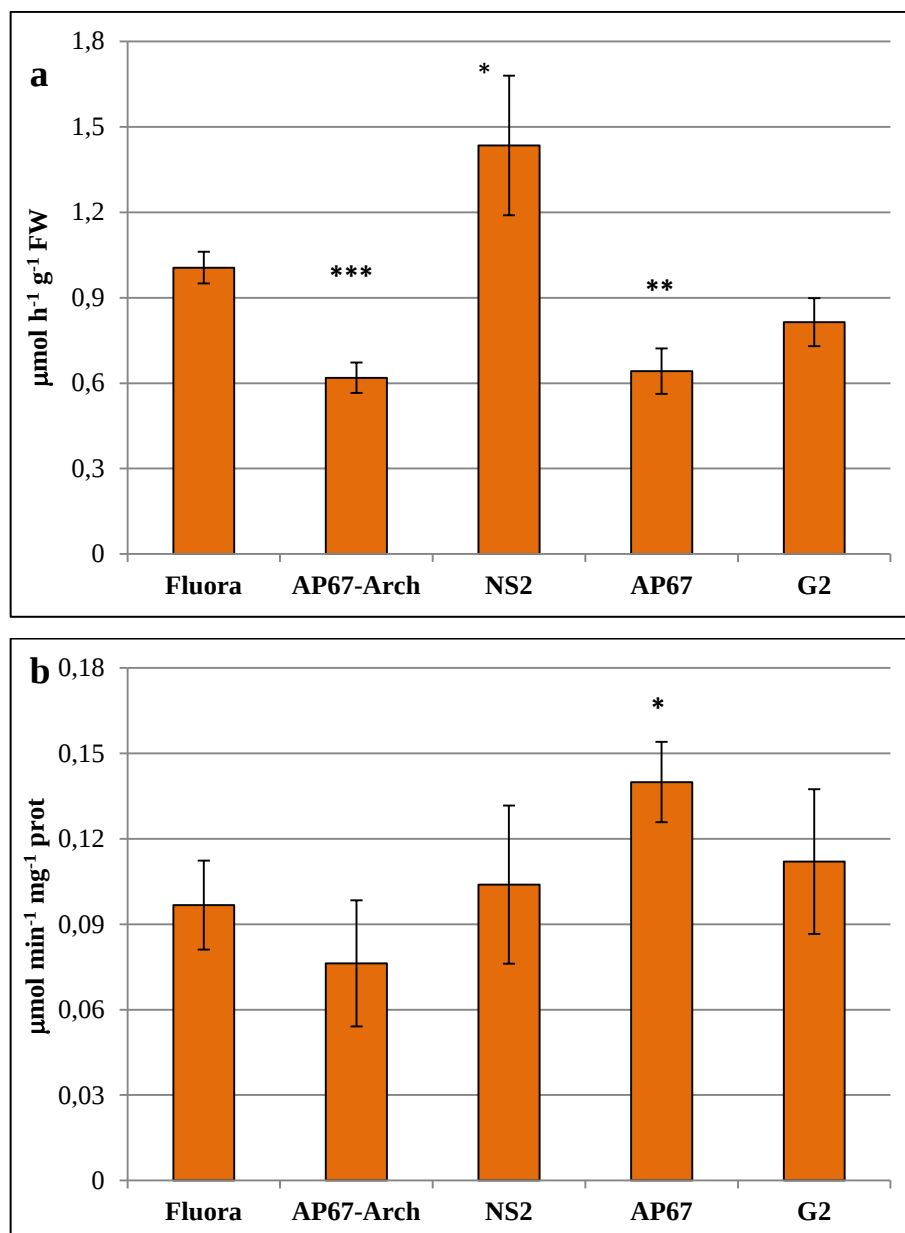


Figura 4.33 – Variazioni dell’attività dell’enzima NR (a) e variazioni dell’attività dell’enzima GS (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy, successivamente trasferite in serra e infine trapiantate in pieno campo. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l’errore $\pm$ DS.

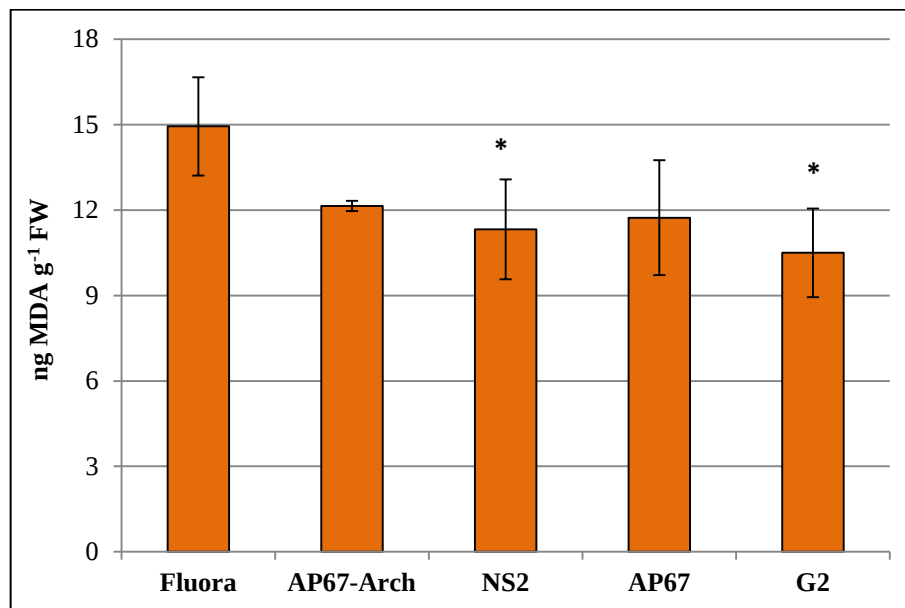


Figura 4.34 – Contenuto di MDA nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. successivamente trasferiti in serra e infine trapiantate in pieno campo. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

4.2.1.5 Discussione

Le piante di leccio cresciute nei mini-contenitori si sono sviluppate normalmente indicando che le condizioni colturali adottate sono state appropriate. In particolare, la nuova metodologia di pre-coltivazione nei contenitori alveolati ha confermato la sua efficacia rispetto alle pratiche standard utilizzate in vivaio (Kostopoulou *et al.*, 2010; Mattsson *et al.*, 2010).

Il contenuto totale di clorofilla si è mantenuto pressoché invariato sia quando le piante erano esposte ai LED o alla luce fluorescente. L'unica lampada LED che ha avuto effetti sul contenuto di clorofilla era la NS2, che ha determinato un aumento di tale parametro rispetto al controllo fluorescente (Figura 4.20a). Questa lampada a alta intensità luminosa è caratterizzata dalla presenza di luce B, G e R ed è lo spettro che più si avvicina alla luce solare. Il contenuto di clorofilla è influenzato dal rapporto RB. Infatti, una forte presenza di luce R causa una diminuzione del contenuto di clorofilla (Tanaka *et al.*, 1998) ma, con l'aggiunta di luce B anche in piccole percentuali, si ha un aumento di questo parametro (Miyashita *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012).

È interessante notare come nelle piante di leccio esposte alla lampada NS2 non solo si osserva un maggior contenuto di clorofilla, ma anche un più elevato contenuto di β -carotene (Figura 4.20b). Come descritto precedentemente, i carotenoidi assorbono fortemente nella regione blu dello spettro e la loro concentrazione nelle foglie è strettamente legata alla qualità spettrale della luce, come ampiamente descritto in letteratura (Ramalho *et al.*, 2002). Tale osservazione permette di suggerire che la percentuale di luce B presente nello spettro NS2 è sufficiente a favorire la biosintesi di clorofilla e di carotenoidi nelle piante di leccio nel terreno Jiffy.

Del tutto inatteso appare invece il dato relativo al contenuto di β -carotene riscontrato nelle piante di leccio cresciute con la lampada G2 (Figura 4.20b). Questa lampada è caratterizzata dalla quasi totale presenza di luce R e FR (Tabella 3.1) e sarebbe logico ipotizzare che proprio la presenza della luce FR abbia un effetto negativo sul contenuto di questo pigmento (Stutte *et al.*, 2009). Tuttavia, il maggior contenuto di carotenoidi rispetto al controllo potrebbe essere una conseguenza dalla peculiarità dello spettro LED G2 e dalla predominante presenza della luce R, come riportato da Wu *et al.* (2007) nel loro studio su piante di pisello.

Risultati e Discussione

Anche in questa fase sperimentale sono state indagate l'attività degli enzimi NR e GS nelle piante di leccio esposte all'illuminazione LED o fluorescente.

Da quanto mostrato in Figura **4.22a**, emerge che la crescita con gli spettri LED AP67-Arch e NS2 ha determinato un aumento dell'attività della NR rispetto al controllo. Questo dato potrebbe indicare che la luce prodotta da queste due lampade LED possa stimolare il rilascio dal vacuolo al citosol dello ione nitrato per la sua successiva riduzione a ione nitrito. Inoltre, dato che la combinazione di colori presente nei LED AP67-Arch e NS2 è appropriata per mantenere un'efficiente attività dell'enzima NR, pare ragionevole supporre che una miscela di luce RB stimoli la riduzione dello ione nitrato da parte della NR come dimostrato da Figueroa (1993) e Ohashi-Kaneko *et al.* (2006). Inoltre, la maggior attività della NR riscontrata nelle piante cresciute con le lampade AP67-Arch e NS2 potrebbe essere una conseguenza anche della luce verde presente in questi spettri, come descritto in Tabella **3.1**. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per confermare questa ipotesi.

È interessante notare che la luce LED NS2 ha determinato anche un aumento dell'attività dell'enzima GS rispetto al controllo, attività che non è stata influenzata invece dalle altre lampade LED (Figura **4.22b**). La qualità della luce regola l'attività dell'enzima GS, dato che si trova per l'80% nei cloroplasti (Oliveira *et al.*, 2002) e la cui attività è assicurata da un sufficiente apporto di energia (ferrodossina e ATP) proveniente dal processo fotosintetico. In questo senso, la maggior attività della GS riscontrata nelle foglie di leccio esposte alla lampada LED NS2, correlata al maggior contenuto di clorofilla e carotenoidi rispetto al controllo (Figura **4.20**), potrebbe indicare una maggior capacità fotosintetica, volta a garantire energia e carboidrati sufficienti per la sintesi di glutammina da parte della GS. Anche l'aumento del contenuto di proteine osservato nelle stesse piante (Figura **4.21**) potrebbe confermare questa ipotesi, indicando un aumento della sintesi proteica proprio per far fronte alle aumentate richieste energetiche.

Infine, è stato determinato il livello di perossidazione lipidica utilizzando come indice di stress ossidativo la concentrazione di MDA, essendo uno dei prodotti finali della perossidazione (Masia, 2003; Bacelar *et al.*, 2006).

Le lampade LED utilizzate in questo studio non hanno determinato variazioni del contenuto dell'aldeide rispetto alla lampada fluorescente (Figura **4.23**). Questo dato

Risultati e Discussione

indica che l'utilizzo delle lampade LED nella fase di pre-coltivazione per le plantule di leccio non comporta un maggior rischio di danno ossidativo a carico delle membrane plasmatiche.

Durante la fase di sperimentazione relativa al Prototipo, la crescita delle piantine di leccio nella camera sperimentale è stata paragonabile a quella delle piantine nella camera di crescita tradizionale, indicando che le condizioni di allevamento impostate, sia nella camera sperimentale sia in quella tradizionale, erano idonee.

Le plantule di leccio, alla fine della fase sperimentale, hanno mostrato un maggior contenuto di pigmenti fotosintetici rispetto al controllo (Figura 4.24a, 4.24b). I risultati ottenuti potrebbero indicare lo sviluppo di un meccanismo di adattamento della pianta in risposta ai cambiamenti continui dell'intensità dell'irradianza (Lichtenthaler *et al.*, 1981; Lichtenthaler *et al.*, 1982).

Inoltre, le piantine di leccio pre-coltivate nel Prototipo hanno mostrato un aumento del contenuto di proteine rispetto alle piante controllo (Figura 4.24c). Questo risultato potrebbe suggerire che la camera sperimentale stimoli la sintesi proteica.

Tuttavia, l'analisi delle attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'azoto ha dimostrato che il maggior contenuto di proteine è correlato con una maggiore attività di assimilazione dell'azoto (Figura 4.25).

Infine, si è valutato il livello di perossidazione dei lipidi, utilizzando come indicatore di stress il contenuto di MDA (Bacelar *et al.*, 2006). Anche in questo caso, il contenuto di MDA non è stato influenzato dalle condizioni di crescita (Figura 4.26). Il Prototipo quindi non sottoporrebbe a un maggior stress ossidativo le piante di leccio, rispetto al controllo.

Nella successiva fase, le piantine pre-coltivate nelle camere di crescita sotto i diversi spettri di illuminazione sono state trapiantate in contenitori più grandi (per permettere il successivo sviluppo della pianta), utilizzando il substrato Jiffy, e trasferite in serra per l'ambientamento alle condizioni naturali di luce, umidità e temperatura.

Terminato il ciclo colturale di 90 giorni, le piante di leccio sono state raccolte e analizzate per valutare gli effetti delle lampade LED utilizzate durante la fase di pre-coltivazione.

Risultati e Discussione

Dopo l'allevamento in serra, le piante non hanno mostrato differenze significative del contenuto di clorofilla e carotenoidi (Figura 4.27) determinato dalle diverse condizioni di pre-coltivazione. Questo risultato potrebbe indicare che l'attività fotosintetica si stabilizza nelle piante di leccio entro certi valori una volta avvenuto l'ambientamento, indipendentemente dal tipo di illuminazione utilizzata durante la fase di sperimentazione iniziale. L'unico spettro LED che ha influenzato negativamente sul contenuto di clorofilla e β -carotene è stato AP67-Arch (Figura 4.27). Non è chiaro il motivo di questo effetto e sarebbero necessari ulteriori studi a riguardo.

È interessante notare come il maggior contenuto proteico riscontrato nelle piante allevate con gli spettri NS2 e AP67 rispetto al controllo alla fine della fase di sperimentazione iniziale nelle camere di crescita è stato mantenuto durante il periodo culturale in serra dalle stesse piante (Figura 4.21; Figura 4.28). Questo risultato permette di ipotizzare che questi due spettri LED possono stimolare la sintesi proteica, probabilmente per mantenere elevate le attività metaboliche.

Per quanto riguarda le variazioni delle attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'azoto, l'elevata attività della NR riscontrata nel leccio pre-coltivato con lo spettro LED AP67-Arch nelle camere di crescita (Figura 4.29a) si è mantenuto nelle stesse piante terminata la fase sperimentale in serra. La combinazione di luce RB presente nello spettro LED stimolerebbe l'assorbimento dello ione nitrato (Figuerola, 1993; Ohashi-Kaneko *et al.*, 2006) in ambiente controllato e potrebbe essere una miscela di colore idonea per mantenere un'elevata attività enzimatica una volta che le piante sono esposte a condizioni naturali.

D'altra parte, i dati relativi all'attività della GS (Figura 4.29b) suggeriscono che questo enzima sembra essere influenzato negativamente dall'impiego di LED nella fase di pre-coltivazione, in quanto tutti gli spettri LED hanno inibito la GS, rispetto al controllo, una volta trasferite le piante in serra. In particolare, nelle piante esposte allo spettro LED AP67-Arch la riduzione dell'attività GS è accompagnata dalla riduzione del contenuto di pigmenti fotosintetici (Figura 4.27) indicando una bassa attività fotosintetica che influisce sull'attività della GS, che si troverebbe in una situazione di deficit energetico (basse concentrazioni di ATP e di zuccheri).

Terminata la fase sperimentale in serra, dalla valutazione del livello di perossidazione lipidica non sono emersi cambiamenti significativi nella concentrazione

Risultati e Discussione

di MDA tra le piante che erano precedentemente allevate con LED o luce tradizionale (Figura 4.30).

Le piante di leccio, terminato il ciclo vegetativo nella serra, sono state rimosse dai contenitori e trapiantate nel terreno, secondo la disposizione riportata in Figura 3.10.

Trascorsi 12 mesi dalla loro messa a dimora, le piante hanno dimostrato una buona ripresa vegetativa, facendo ipotizzare che le condizioni colturali adottate precedentemente sono state idonee, e alcune sono state selezionate a random per eseguire gli studi relativi a questa fase di sperimentazione. Sono stati quindi valutati gli effetti dell'esposizione delle piante, durante la fase di pre-coltivazione, a diversi tipi di irradianza dopo la crescita in campo aperto.

La pre-coltivazione con i LED AP67 e G2 ha determinato la diminuzione del contenuto di clorofilla nelle piante di leccio mentre il contenuto di carotenoidi non è stato influenzato dal tipo di illuminazione utilizzata durante la fase di pre-coltivazione una volta avvenuto il trapianto in campo, rispetto al controllo (Figura 4.31). Gli spettri AP67 e G2, come si può notare dalle Figura 4.20a e Figura 4.27a, non hanno influenzato il contenuto di clorofilla nelle piante durante l'allevamento nella camera climatica e durante il ciclo colturale in serra, mentre hanno avuto un effetto negativo terminato il periodo sperimentale in campo. Non è chiaro il motivo di questa risposta, ma i risultati ottenuti durante l'ultima fase sperimentale sembrano suggerire che la biosintesi di clorofilla sarebbe ridotta nelle piante precedentemente allevate con questi due spettri LED nella fase di pre-coltivazione dopo il trapianto nell'ambiente naturale.

È interessante notare come l'esposizione alle lampade LED durante la fase di pre-coltivazione, indipendentemente dal tipo di spettro utilizzato, ha determinato nelle piante di leccio una diminuzione del contenuto di proteine (Figura 4.32) una volta concluso il ciclo colturale di 12 mesi in campo. L'utilizzo delle lampade LED nella fase iniziale della produzione delle piante di leccio, renderebbe le piante più sensibili allo stress causato dalle condizioni ambientali naturali, e questo si riflette probabilmente sulle funzioni e le strutture delle proteine (Smirnoff, 1998; Zhu, 2002; Wang *et al.*, 2003).

Dall'analisi delle attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'azoto, è emerso che il pre-allevamento con gli spettri AP67-Arch e AP67 ha determinato

Risultati e Discussione

un'inibizione dell'enzima NR, mentre la pre-coltivazione nelle camere di crescita con lo spettro NS2 ha stimolato l'attività enzimatica (Figura 4.33a), rispetto al controllo, indicando che l'illuminazione con gli spettri LED durante il periodo di pre-coltivazione ha un'influenza diversa sul meccanismo di riduzione dello ione nitrato nelle piante di leccio trapiantate in campo. In particolare, si può osservare che le piante di leccio esposte alla lampada AP67-Arch presentano un'attività nitrato reductasica maggiore rispetto al controllo sia durante la fase sperimentale nella camera di crescita (Figura 4.22a) sia durante il ciclo colturale in serra (Figura 4.29a), ma più bassa dopo il trapianto nel terreno. L'enzima NR è stimolato da diversi fattori e la disponibilità dello ione nitrato e la luce sono senza dubbio quelli più importanti e limitanti (Izzo e Quartacci, 2010). Si potrebbe ipotizzare che la ridotta attività riscontrata nelle piante di leccio dopo il trapianto potrebbe essere una conseguenza di una ridotta disponibilità di nutrienti, in particolare di nitrato, presente nel terreno. È noto infatti che la concentrazione di questo ione nel suolo è soggetta a rapide e notevoli fluttuazioni che ovviamente richiedono un adattamento metabolico della pianta alle mutate disponibilità nutrizionali (Norby *et al.*, 2010; Clough *et al.*, 2013).

D'altra parte, la maggior attività della NR nelle piante di leccio allevate con lo spettro NS2, rispetto al controllo, si osservava sia durante il pre-allevamento in camera di crescita (Figura 4.22a) che dopo il trapianto (Figura 4.33a). La lampada NS2 è caratterizzata da uno spettro luminoso molto simile alla luce solare. In questo senso, le piantine di leccio potrebbero aumentare l'attività metabolica della NR durante la fase di pre-coltivazione in quanto si troverebbero in un ambiente favorevole e simile a quello naturale, così poi da mantenerlo efficiente dopo il passaggio in campo.

Invece, l'attività della GS sembrerebbe non essere influenzata dal tipo di illuminazione utilizzata durante la pre-coltivazione dopo il successivo trapianto in campo aperto, fatta eccezione per il leccio pre-allevato con lo spettro AP67 in cui si nota una maggior attività enzimatica rispetto al controllo (Figura 4.33b), nonostante il basso contenuto di clorofilla (Figura 4.31a) riscontrato nelle medesime piante. L'attività fotosintetica, e la relativa sintesi di carboidrati, potrebbe essere quindi indipendente dal contenuto dei pigmenti fotosintetici (Saebo *et al.*, 1995).

Inoltre, l'elevata attività dell'enzima GS nelle piantine pre-coltivate con lo spettro AP67 è correlata a una ridotta attività dell'enzima NR (Figura 4.33). In questo senso

sarebbe logico supporre che la produzione di glutammina da parte della GS causi un'inibizione della NR, come descritto da Forde (2002) e da Ali *et al.* (2007).

Infine, anche in questa fase sperimentale, è stato determinato il livello di perossidazione lipidica nel tessuto fogliare. Mentre la pre-coltivazione con gli spettri AP67-Arch e AP67 non ha prodotto differenze significative nel contenuto di MDA nelle foglie di leccio rispetto al controllo, gli spettri G2 e NS2 hanno determinato un minor accumulo della MDA dopo il trapianto rispetto alle piante pre-coltivate con luce fluorescente (Figura 4.34), indicando una minor produzione di ROS con un conseguente minor rischio di danno ossidativo a carico delle membrane cellulari.

4.2.2 Esperimenti con terreno DAFNE

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di leccio coltivate con substrato DAFNE in ambiente controllato (camere di crescita e Prototipo).

4.2.2.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita

Le foglie di leccio cresciute con gli spettri LED hanno mostrato un contenuto di clorofilla minore rispetto alle plantule esposte alla luce fluorescente (Figura 4.35a), e la diminuzione ha assunto valori compresi tra il 44% e il 58%.

Allo stesso modo, si è notata una diminuzione nel contenuto di β -carotene nelle plantule allevate con le lampade LED in relazione al controllo (Figura 4.35b). Più precisamente, il minor contenuto di carotenoidi è stato del 56% per i LED Ap67-Arch, del 44% per la luce NS2, del 49% per lo spettro AP67 e infine del 43% per la lampada G2.

Il contenuto di proteine nelle foglie di leccio è rimasto pressoché invariato nelle diverse condizioni di crescita, tranne per le plantule allevate con lo spettro AP67-Arch che hanno mostrato una diminuzione di tale paramentro del 26% rispetto al controllo (Figura 4.36).

La capacità di una pianta di assimilare azoto potrebbe essere influenzata dalla qualità della luce, per questo motivo sono state indagate le attività di enzimi chiave del metabolismo dell'azoto (NR e GS) nelle piante sottoposte a diverse condizioni di illuminazione.

Risultati e Discussione

L'enzima NR ha mostrato una maggior attività (59% e 132%) nelle piante esposte rispettivamente agli spettri AP67-Arch e NS2, mentre non si sono riscontrate differenze nelle piante cresciute con le lampade AP67 e G2, rispetto al controllo (Figura **4.37a**).

Mentre le lampade NS2 e G2 non hanno avuto effetti significativi nell'attività della GS, gli spettri AP67-Arch e AP67 hanno determinato un aumento di tale attività enzimatica (111% e 57% rispettivamente) rispetto alle lampade fluorescenti (Figura **4.37b**).

Il contenuto di MDA nelle foglie delle piante di leccio è stato utilizzato come indice di stress ossidativo. Le piante di leccio cresciute con gli spettri AP67 hanno mostrato un aumento del contenuto di MDA (+59%), rispetto al controllo, mentre le plantule esposte alla lampada G2 hanno mostrato un minor contenuto (-40%) di MDA in rapporto alle lampade fluorescenti (Figura **4.38**). Gli altri spettri LED non hanno determinato un aumento significativo di questo dato.

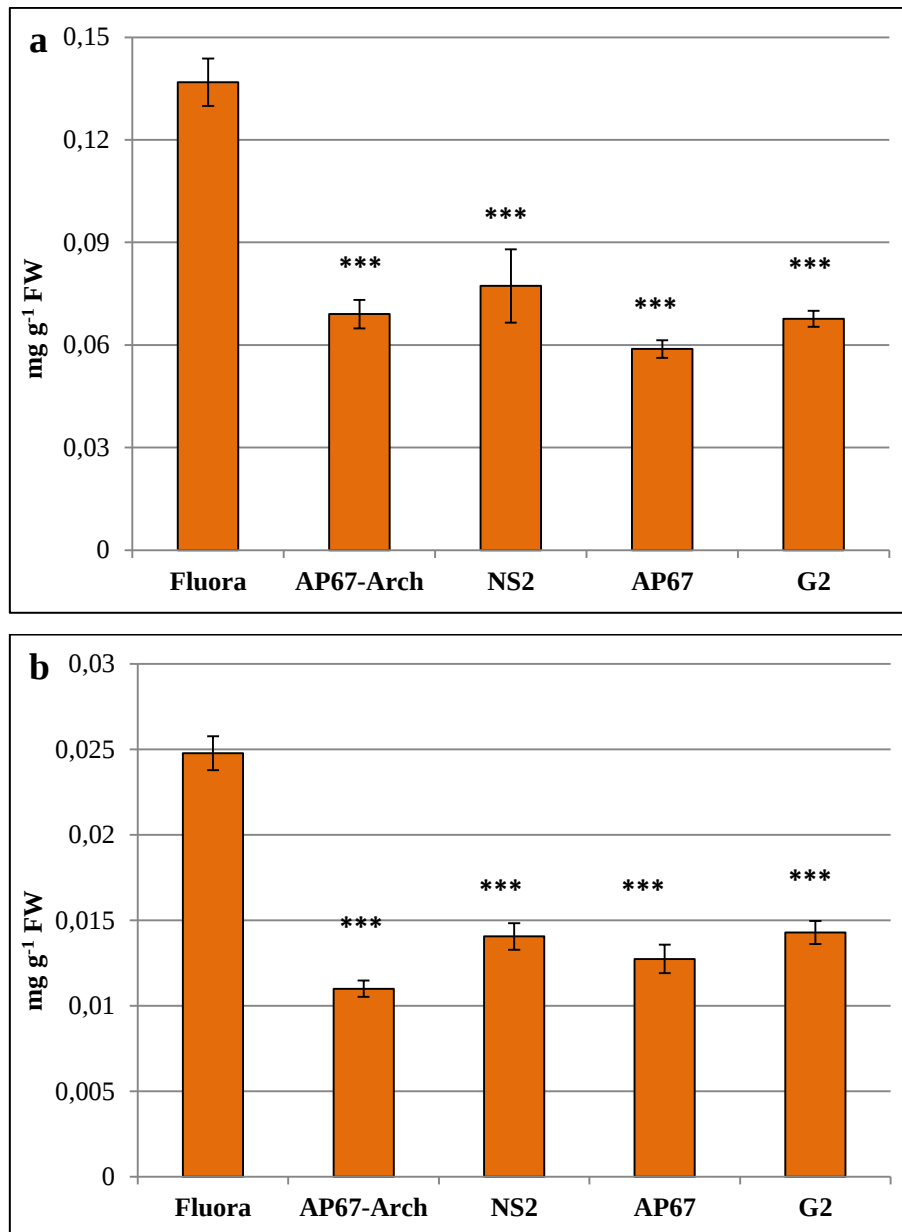


Figura 4.35 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

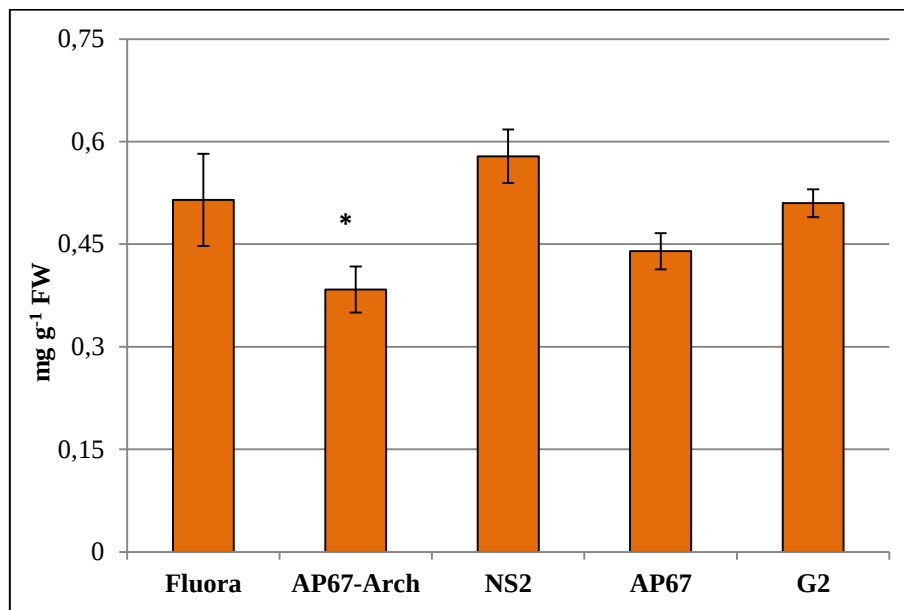


Figura 4.36 – Contenuto di proteine nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

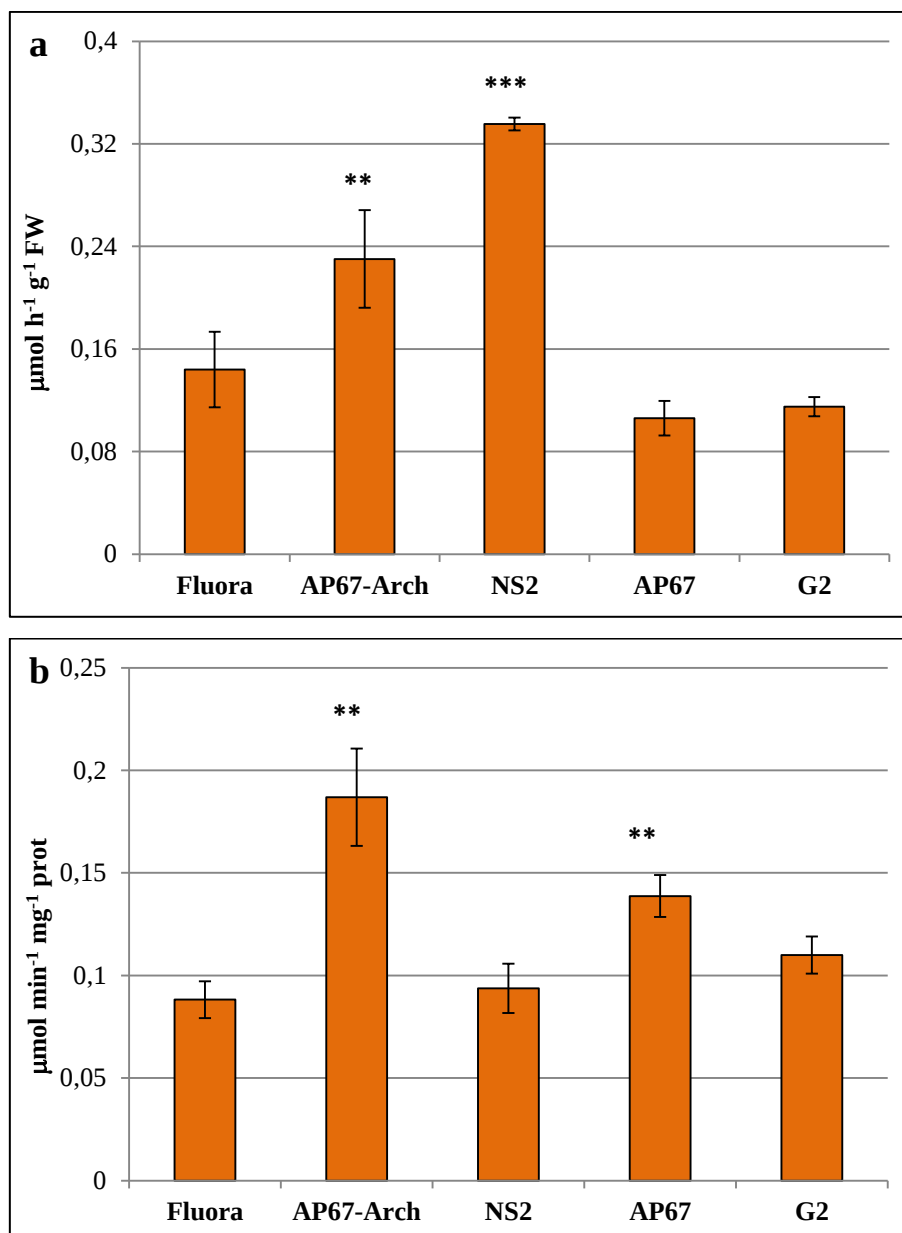


Figura 4.37 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

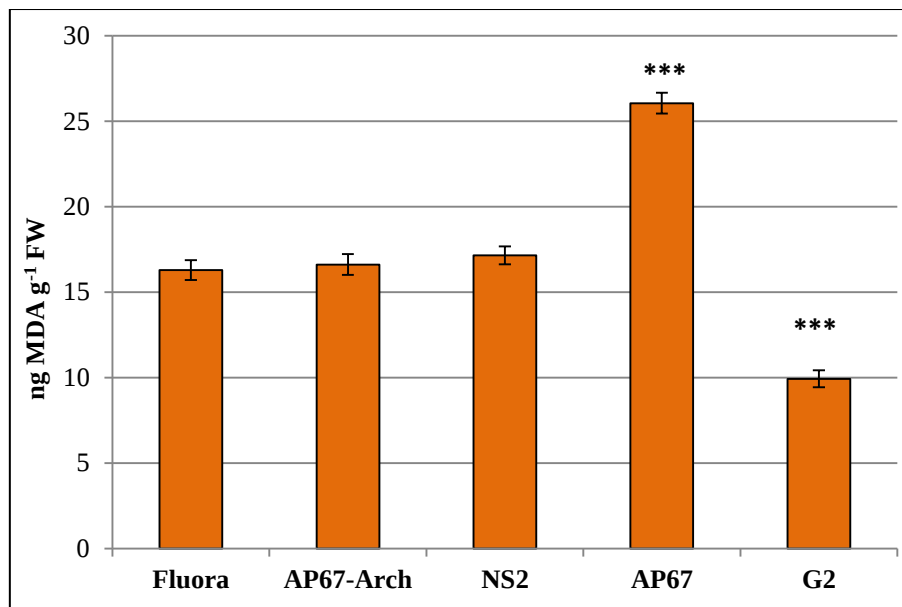


Figura 4.38– Contenuto di MDA nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

4.2.2.2 Prototipo

La camera climatica sperimentale ha influenzato positivamente il contenuto di clorofilla e carotenoidi rispetto alla camera di crescita tradizionale (Figura **4.39a**, **4.39b**). Infatti, le piantine di leccio hanno mostrato un aumento del 147% e 109% nel contenuto di clorofilla e β -carotene rispettivamente.

Inoltre, la crescita nel Prototipo ha determinato un aumento significativo del contenuto proteico (+186%) in relazione al controllo (Figura **4.39c**).

L'aumento del contenuto di proteine non è però accompagnato da una maggiore attività di assimilazione dell'azoto come mostrato dalla significativa diminuzione della NR (21%) e un rilevante decremento nell'attività della GS (73%) (Figura **4.40**).

La crescita nel Prototipo infine ha determinato una minor concentrazione di MDA (-67%), che si traduce con un minor stress ossidativo da parte delle piante di leccio, rispetto alla crescita in camera climatica tradizionale, con un valore del (Figura **4.41**).

Risultati e Discussione

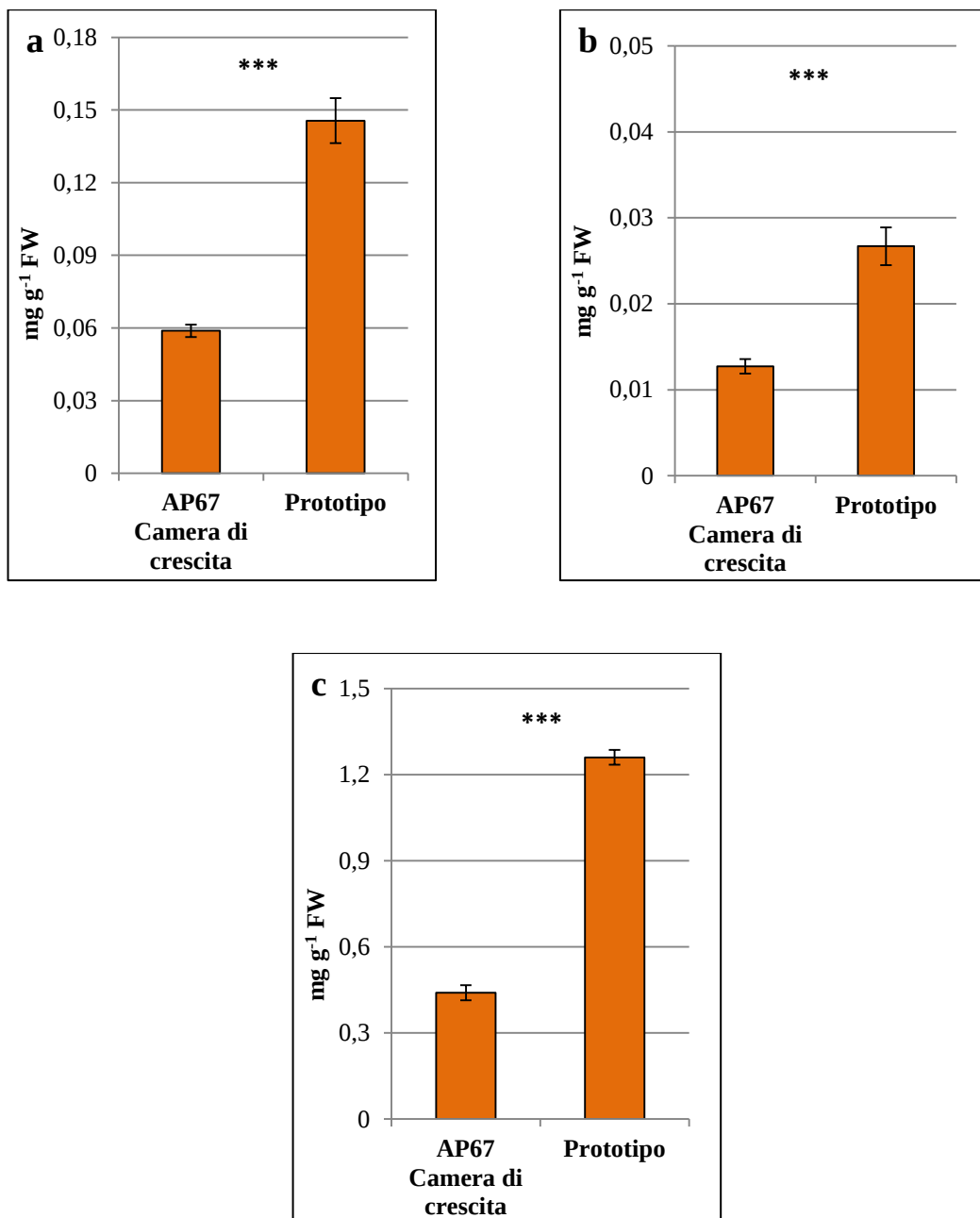


Figura 4.39 – Contenuto di clorofilla (a), di β -carotene (b) e di proteine (c) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni con terreno DAFNE nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

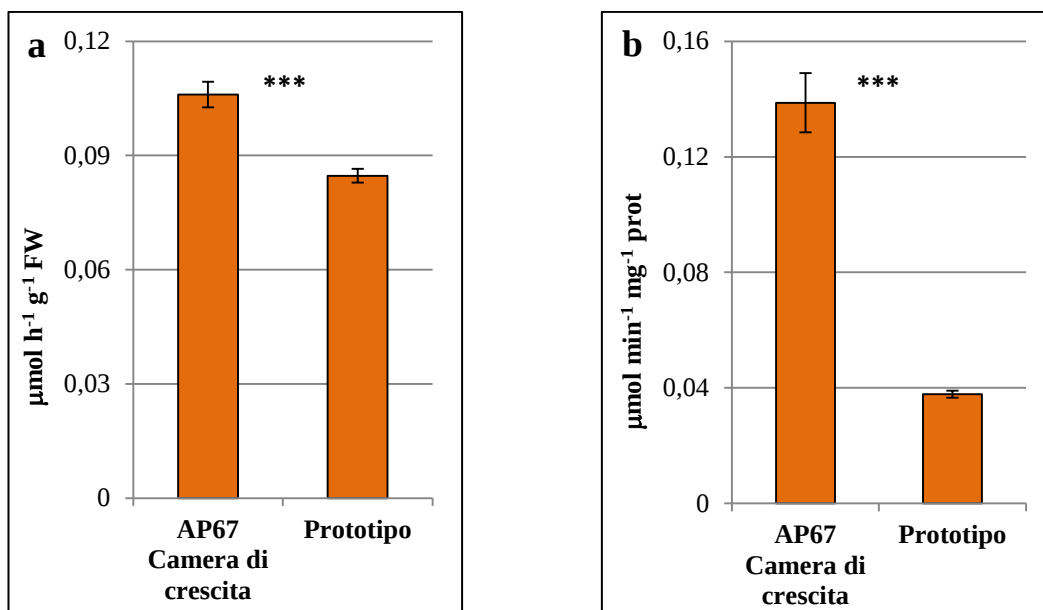


Figura 4.40 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni con terreno DAFNE nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

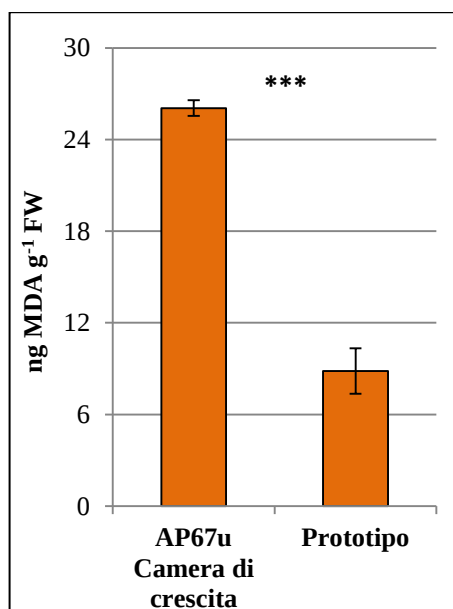


Figura 4.41 – Contenuto di MDA nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni con terreno DAFNE nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

4.2.2.3 Discussione

L'utilizzo dei mini-contenitori ha permesso di ottenere un normale sviluppo delle piantine di leccio, suggerendo che le condizioni colturali adottate sono state idonee (Kostopoulou *et al.*, 2010; Mattsson *et al.*, 2010).

La crescita con le lampade LED, indipendentemente dal tipo di spettro studiato, ha causato una diminuzione del contenuto di clorofilla rispetto al controllo, come riportato in Figura **4.35a**. Questo risultato potrebbe essere una conseguenza della presenza della luce R nei LED utilizzati, in quanto è nota la sua influenza negativa sul contenuto di questo pigmento (Yorio *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2010).

Inoltre, la crescita per 30 giorni con gli spettri LED ha causato una diminuzione anche del contenuto di β -carotene nelle piantine rispetto al controllo fluorescente (Figura **4.35b**). I carotenoidi sono pigmenti che assorbono fortemente nella regione dello spettro blu. Infatti, i LED B utilizzati in combinazione con i LED R stimolano il contenuto di carotenoidi nelle piante verdi (Lefsrud *et al.*, 2008; Li e Kubota, 2009). In questo senso, sarebbe ragionevole pensare che la quantità di luce B presente nei LED utilizzati in questo studio non sia sufficiente a favorire la sintesi di β -carotene nelle piante di leccio coltivate nel terreno DAFNE. Inoltre, una combinazione di luce RB favorisce la biosintesi di clorofilla, in accordo con quanto trovato in letteratura (Mizuno *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). In quest'ottica, si potrebbe ipotizzare quindi che la miscela di luce prodotta dagli spettri LED utilizzati in questo lavoro non sia idonea a stimolare la biosintesi dei pigmenti fotosintetici nelle plantule di leccio coltivate in terreno DAFNE.

Per quanto riguarda il metabolismo dell'azoto, sono stati analizzati attività degli enzimi chiave quali NR e GS.

È ben noto che l'attività della NR è stimolata dalla luce (Sasakawa e Yamamoto, 1977; Figueroa, 1996; Lillo, 2004). Nel nostro studio si è riscontrato che l'attività dell'enzima NR è maggiore nelle piante allevate con gli spettri AP67-Arch e NS2 rispetto al controllo (Figura **4.37a**), indicando quindi un effetto positivo sull'assimilazione del nitrato di questi spettri LED nelle piante di leccio nel terreno DAFNE. Inoltre, questa induzione potrebbe essere una conseguenza della luce R e della luce B presenti negli spettri AP67-Arch e NS2. Questa teoria è in accordo con quanto ipotizzato da Lillo (2004) riguardo il ruolo che la luce R possa giocare nella

Risultati e Discussione

stimolazione della NR e che l'aggiunta di luce B promuove l'assorbimento e l'assimilazione dello ione nitrato (Ohashi-Kaneko *et al.*, 2006; Urbonaviciut *et al.*, 2007). È interessante notare come l'attività della NR era stimolata dagli spettri AP67-Arch e NS2 sia nelle plantule di leccio cresciute con substrato Jiffy (Figura 4.22a) che con substrato sperimentale DAFNE (Figura 4.37a), rispetto al controllo fluorescente. Questo risultato potrebbe confermare che l'effetto sull'attività della NR è indotto in modo specifico da questi spettri LED.

Anche l'attività della GS è regolata dalla luce (Sakakibara *et al.*, 1992; Simonovic e Anderson, 2008). Dai dati ottenuti, si nota che le lampade AP67-Arch e AP67 hanno determinato un aumento dell'attività enzimatica rispetto alla lampada fluorescente (Figura 4.37b). L'attività di questo enzima è garantita da un sufficiente apporto di energia proveniente dal processo fotosintetico (Lillo, 1984), quindi sarebbe ragionevole ipotizzare che l'attività fotosintetica delle piante di leccio esposte a queste due lampade LED sia adeguata per mantenere un'elevata attività enzimatica della GS, nonostante il basso contenuto di pigmenti fotosintetici (Figura 4.35) e di proteine (Figura 4.36). In questo senso, l'attività fotosintetica delle plantule potrebbe essere indipendente dal contenuto di clorofilla e carotenoidi (Saebo *et al.*, 1995). È interessante notare come la lampada LED AP67-Arch ha avuto un effetto positivo sia sull'attività dell'enzima NR sia della GS, indicando quindi che la composizione spettrale della luce potrebbe essere ottimale per il metabolismo dell'azoto nelle piante di leccio nel terreno DAFNE.

Infine, le piante di leccio hanno risposto in maniera diversa, a seconda della luce LED analizzata, sul contenuto di MDA rispetto al controllo (Figura 4.38). Più precisamente, le lampade AP67-Arch e NS2 non hanno determinato differenze significative nei contenuti di MDA, mentre si è notato un maggior stress ossidativo nelle piante cresciute con AP67 e un minor stress ossidativo nelle plantule esposte allo spettro G2. Un aumento di MDA è generalmente considerato come indice di stress ossidativo nelle piante, in quanto la MDA è uno dei prodotti finali della perossidazione dei lipidi (Masia, 2003; Bacelar *et al.*, 2006). L'effetto dell'intensità luminosa sul contenuto di MDA nelle piante è molto vario in letteratura. Infatti, sono stati riscontrati contenuti elevati di MDA nelle piante esposte a bassa intensità luminosa (Huang *et al.*, 2002), oppure nelle piante esposte a un'alta intensità luminosa (Xu *et al.*, 2010). Inoltre, Baque *et al.* (2010) ha dimostrato che accumuli tossici di MDA erano indotti nelle

Risultati e Discussione

foglie di piante di gelso quando esposte a un mix di luce R, B e FR. In questo senso, il maggior contenuto di aldeide, che si traduce con un aumento dello stress ossidativo, nelle piante di leccio allevate con la luce AP67 nel terreno DAFNE, potrebbe essere una conseguenza della miscela di colori presente nello spettro. Invece, il minor contenuto di MDA riscontrato nelle plantule allevate con la lampada G2 potrebbe essere una conseguenza della peculiarità dello spettro stesso. Infatti, questa lampada è caratterizzata dalla quasi totale presenza di luce R e FR con un R:FR ratio pari al 2,7% (Tabella 3.1). Yang *et al.* (2012) trovarono che il contenuto di MDA diminuiva nelle piante esposte a un R:FR ratio del 2,5%, percentuale molto simile a quella presente nel LED G2.

Il confronto tra le piante allevate nel Prototipo e quelle allevate nella camera tradizionale, entrambe dotate della lampada AP67 hanno mostrato che le piantine di leccio in contenitore con terreno DAFNE sono cresciute normalmente indicando che le condizioni di allevamento erano appropriate.

La crescita per 30 giorni nel Prototipo delle plantule di leccio ha determinato un forte aumento del contenuto di clorofilla e carotenoidi rispetto alla tradizionale camera di crescita (Figura 4.39a, 4.39b). L'aumento del contenuto di clorofilla e carotenoidi riscontrato nelle piante di leccio allevate con il Prototipo potrebbe essere considerato come un meccanismo di adattamento della pianta alle condizioni alternate di illuminazione. Infatti, il foto-adattamento 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 (Boardman, 1977; Leong e Anderson, 1984). In questo senso, le piante di leccio potrebbero aumentare il contenuto di pigmenti fotosintetici in modo da catturare la luce più efficacemente al fine di mantenere un'adeguata velocità del processo fotosintetico.

Inoltre, nelle stesse piantine di leccio si è riscontrato un aumento del contenuto di proteine rispetto alle piante controllo (Figura 4.39c). Un maggior contenuto proteico potrebbe essere la conseguenza di una sintesi proteica stimolata probabilmente in risposta a un'efficiente attività fotosintetica, al fine di mantenere un'elevata attività metabolica (Evans, 1989).

È interessante notare che le plantule di leccio allevate nel Prototipo avevano un maggior contenuto di pigmenti fotosintetici e di proteine rispetto al controllo, sia con il terreno Jiffy (Figura 4.24) che con il terreno DAFNE (Figura 4.39). Questo dato confermerebbe l'efficacia della camera sperimentale nel sostenere la biosintesi di clorofilla e β -carotene e delle proteine

Tuttavia, da quanto riportato in Figura 4.40, la maggior sintesi proteica (Figura 4.39c) non è correlata a una maggiore attività di assimilazione dell'azoto in quanto la camera di crescita sperimentale ha inibito fortemente sia l'attività dell'enzima NR sia l'attività dell'enzima GS, rispetto al controllo. Questi dati sono del tutto inattesi, in quanto è ampiamente risaputo in letteratura un aumento delle attività della NR e della GS in relazione all'aumento dell'attività fotosintetica (Lillo, 1984; Vincentz *et al.*, 1993).

Infine, si è valutato il livello di perossidazione dei lipidi, utilizzando come indicatore di stress il contenuto di MDA. La fase di pre-coltivazione in una camera di crescita tradizionale ha aumentato estremamente il contenuto di MDA nelle foglie di leccio rispetto alla camera sperimentale (Figura 4.41), suggerendo quindi che l'allevamento nel Prototipo causi un minor stress ossidativo con conseguente minor danno a livello cellulare. Infatti, un aumentato accumulo di MDA è considerato un marker della perossidazione nelle piante stressate (Bacelar *et al.*, 2006).

4.2.3 Differenze di crescita fra il terreno Jiffy e il terreno DAFNE

Le piante di leccio hanno mostrato in generale un minor contenuto di clorofilla totale, β -carotene e proteine quando coltivate nel terreno DAFNE piuttosto che nel terreno Jiffy (Figura 4.42; Figura 4.43). Il substrato Jiffy stimolerebbe la biosintesi dei pigmenti fotosintetici e la sintesi proteica.

Per quanto riguarda il metabolismo dell'azoto, l'attività enzimatica della NR e della GS è stata stimolata nelle plantule allevate con terreno DAFNE rispetto a quelle allevate con terreno Jiffy (Figura 4.44). Probabilmente la composizione del terriccio utilizzato per la preparazione del terreno sperimentale sarebbe idoneo a sostenere l'attività di questi due enzimi. Tuttavia, le plantule allevate con terreno DAFNE

Risultati e Discussione

potrebbero avere un'attività fotosintetica sufficiente per mantenere il metabolismo dell'azoto.

Le piante di leccio allevate con terreno DAFNE sotto AP67 hanno evidenziato un maggior contenuto di MDA rispetto alle stesse piante coltivate nel substrato Jiffy, al contrario delle plantule esposte allo spettro G2 che hanno mostrato una minor perossidazione lipidica rispetto a quelle coltivate con substrato Jiffy (Figura 4.45). Il danno ossidativo a carico delle membrane cellulari sembrerebbe essere influenzato quindi sia dal tipo di illuminazione utilizzata nella camera di crescita (vedere discussione precedente) e sia dal tipo di substrato impiegato nei contenitori.

Per quanto riguarda la fase sperimentale del Prototipo, in generale non sono state evidenti differenze significative nei vari parametri analizzati nelle piante allevate con terreno Jiffy o DAFNE (Figura 4.46a, 4.46b; Figura 4.47b; Figura 4.48), fatta eccezione per il contenuto di proteine (maggiore nel leccio con substrato DAFNE) (Figura 4.46c) e per l'attività enzimatica della NR (maggiore con il Jiffy) (Figura 4.47a).

I due terreni utilizzati hanno dimostrato di sostenere, durante la fase di pre-coltivazione, la crescita e il metabolismo della specie forestale in ambiente controllato. Inoltre, il terreno DAFNE, utilizzato per la prima volta per la crescita del leccio, è risultato comunque essere un buon substrato di crescita per la specie viste le buone condizioni delle plantule e la maggior attività metabolica riscontrata in esse nelle camere di crescita.

Nonostante ciò, sarebbero necessarie ulteriori indagini per valutare meglio le differenze fra questi due terreni.

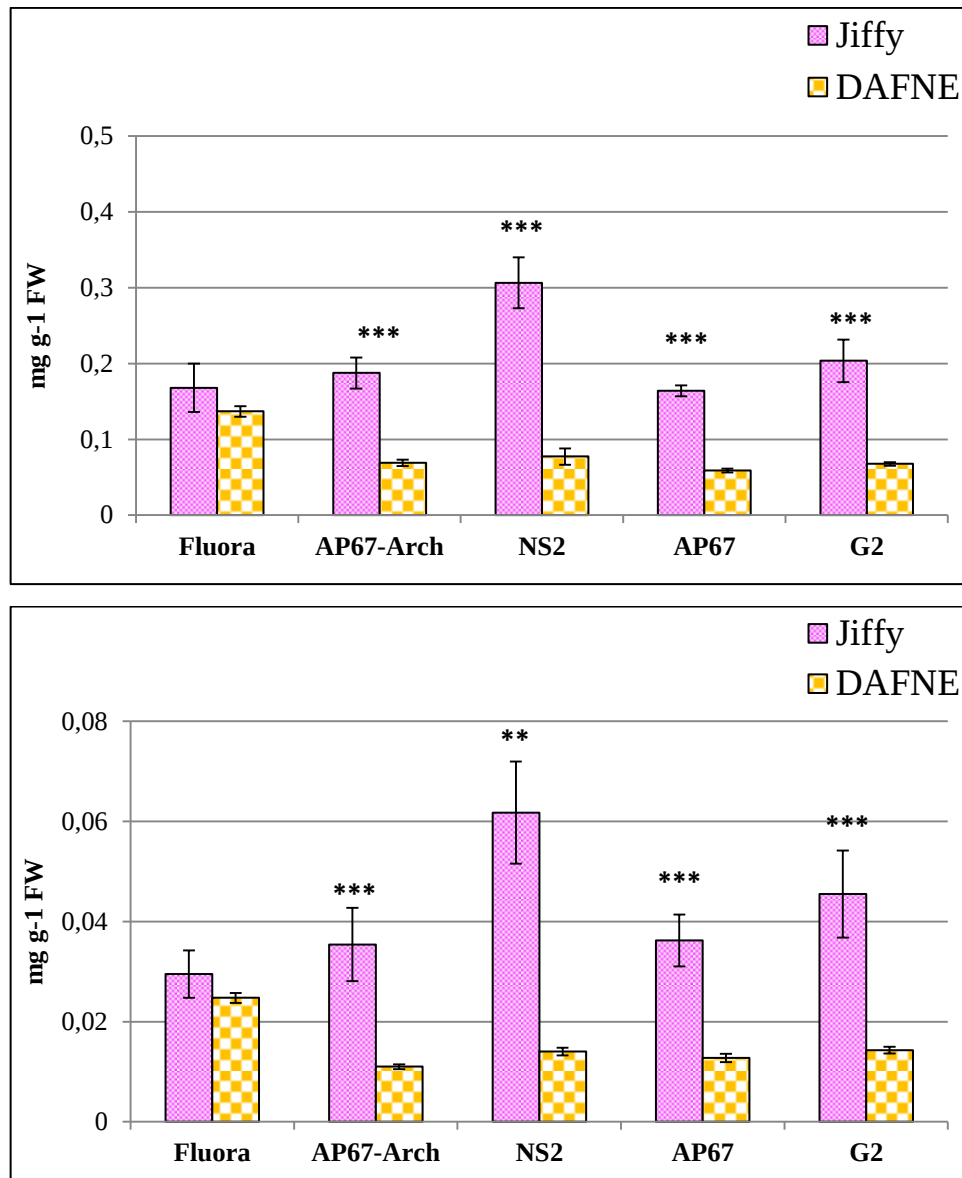


Figura 4.42 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

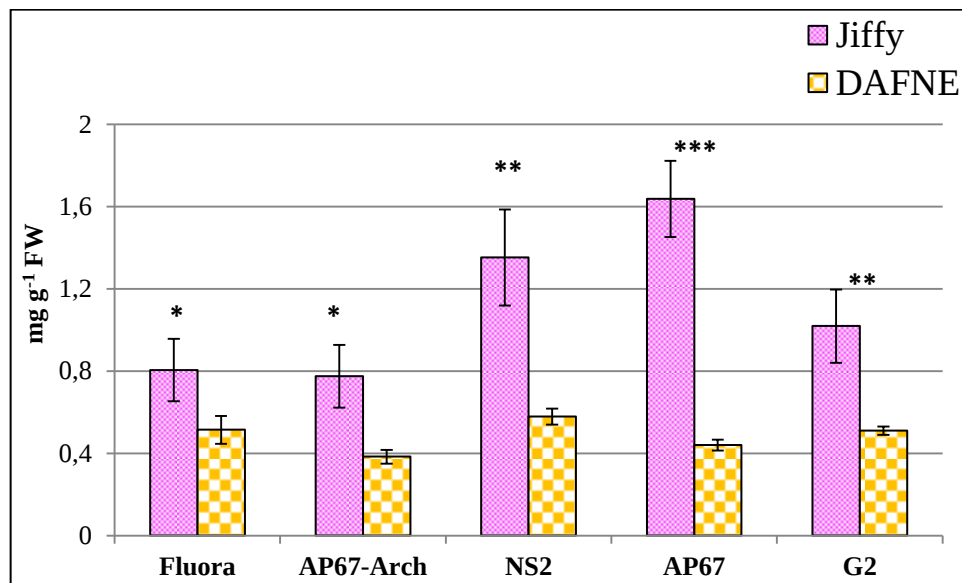


Figura 4.43 – Contenuto di proteine nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

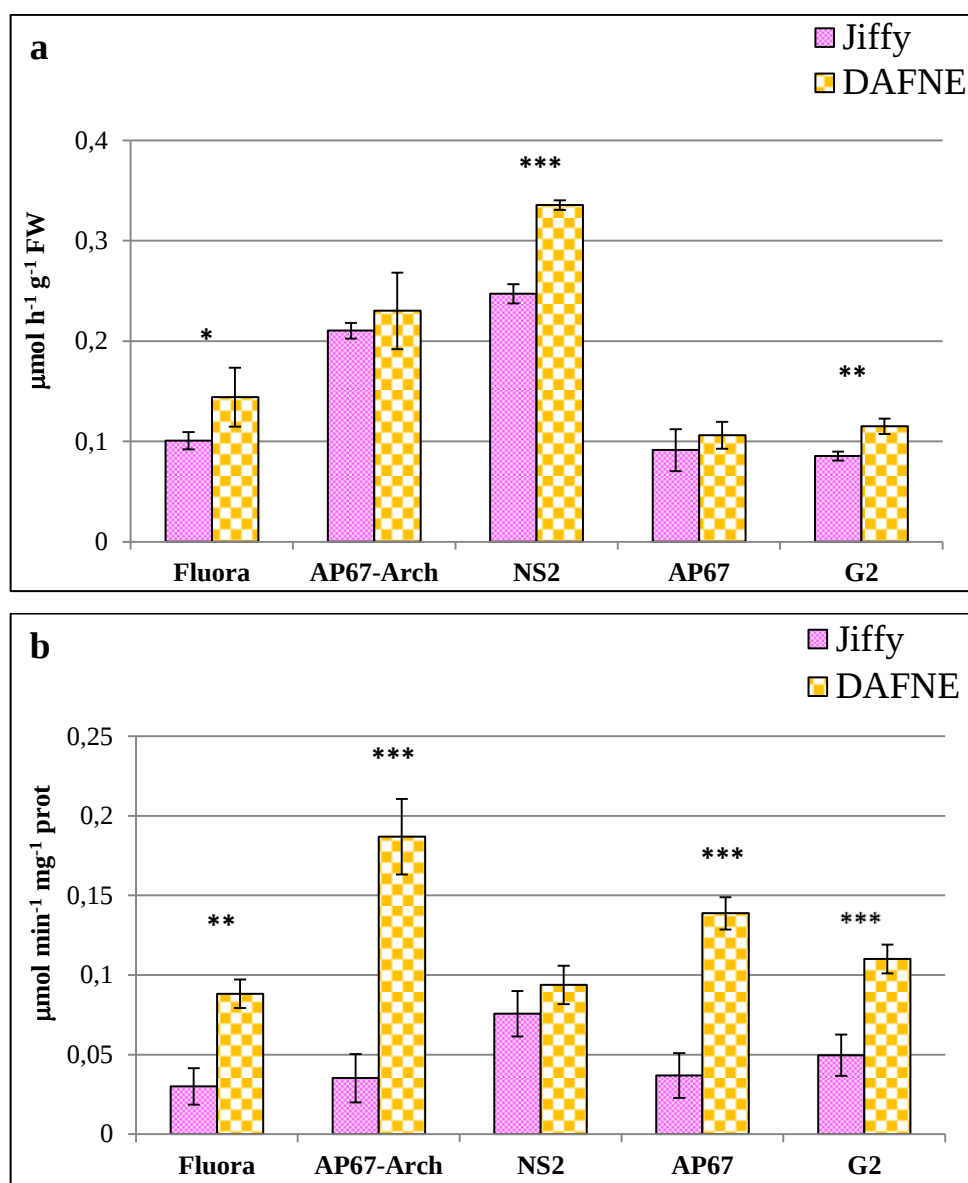


Figura 4.44 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

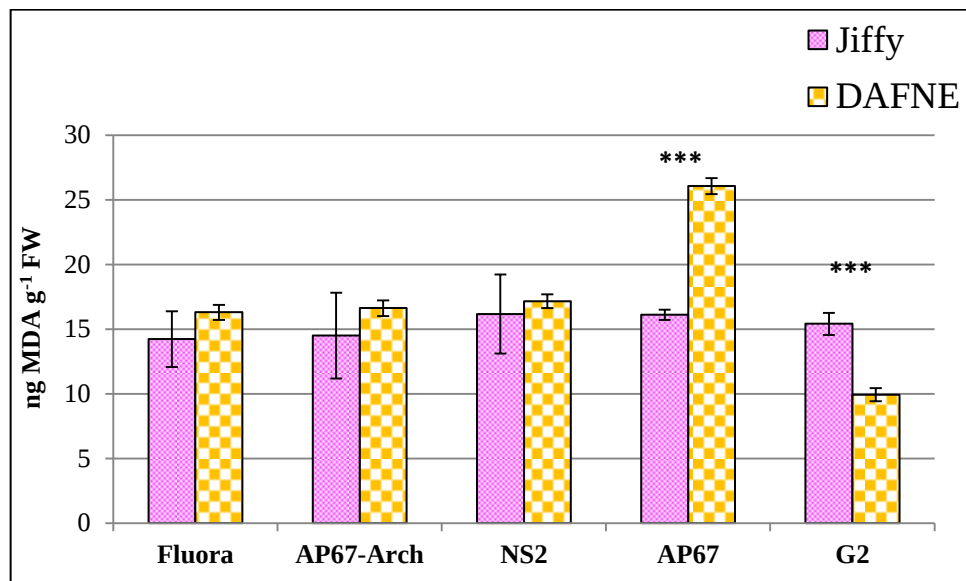


Figura 4.45 – Contenuto di MDA nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS

Risultati e Discussione

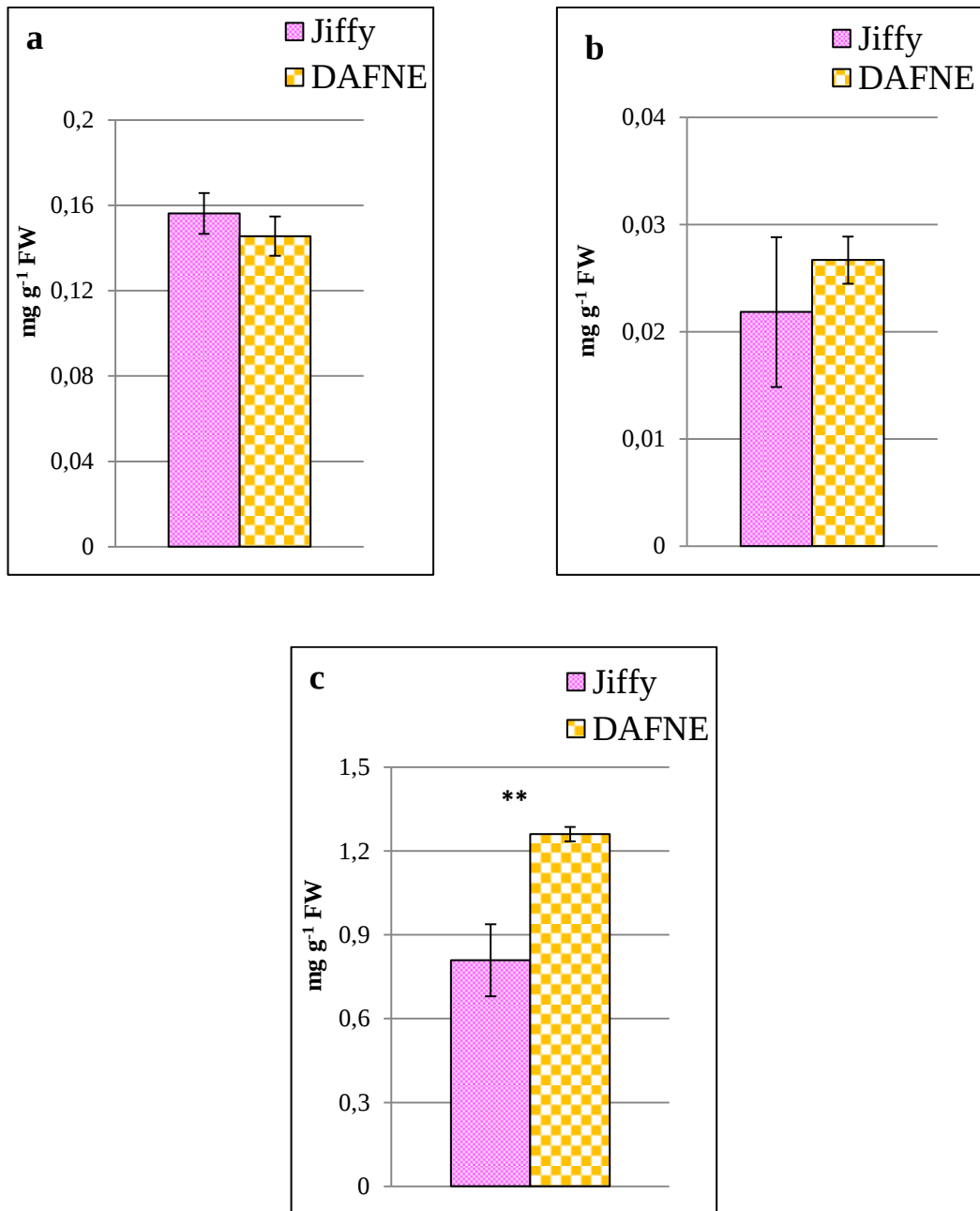


Figura 4.46 – Contenuto di clorofilla (a), di β -carotene (b) e di proteine (c) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni con terreno Jiffy e con terreno DAFNE nel Prototipo con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

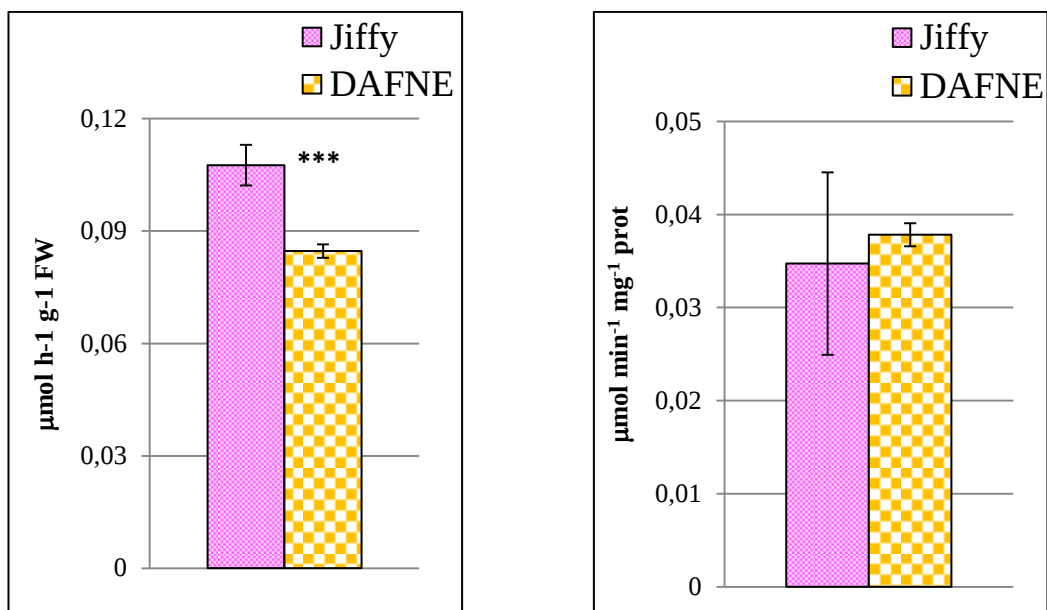


Figura 4.47 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni con terreno Jiffy e con terreno DAFNE nel Prototipo con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

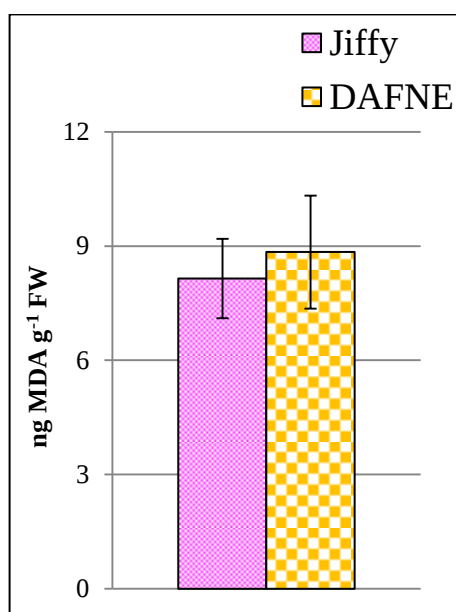


Figura 4.48 – Contenuto di MDA nelle foglie di leccio allevate per 30 giorni con terreno Jiffy nel Prototipo con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

4.2.4 Conclusioni

In conclusione, le lampade LED utilizzate nella fase di pre-coltivazione di plantule di *Quercus ilex* L. sono risultate idonee nel sostenere la crescita delle piante.

In particolare, i dati ottenuti mostrano che lo spettro LED NS2, utilizzando il substrato di coltura Jiffy, è risultato l'alternativa migliore per la crescita del leccio in termini di contenuto di clorofilla, carotenoidi e proteine e di attività metabolica, rispetto al controllo e alle altre lampade LED. Inoltre, questa luce non ha determinato un aumento del contenuto di MDA, indicando un minor danno da stress ossidativo. Essendo la lampada NS2 lo spettro che più si avvicina alla luce solare, si potrebbe ipotizzare che la miglior crescita del leccio con questo spettro derivi proprio da una condizione che simula il più possibile all'ambiente naturale. Pertanto, tale lampada LED può sicuramente rappresentare una fonte di luce alternativa alle tradizionali lampade utilizzate nelle camere di crescita, in quanto migliora in generale la crescita delle piante di leccio consentendo di sfruttare tutti i vantaggi relativi al suo utilizzo.

Invece, per quanto riguarda le piante di leccio allevate utilizzando il terreno DAFNE, le lampade LED hanno determinato la riduzione del contenuto di clorofilla e carotenoidi rispetto alla lampada fluorescente, suggerendo quindi che il loro utilizzo non stimoli l'attività fotosintetica. Nonostante ciò, lo spettro AP67-Arch si è dimostrato il migliore, rispetto al controllo e rispetto agli altri spettri LED, nel favorire il metabolismo dell'azoto, in quanto ha determinato significativi aumenti delle attività degli enzimi NR e GS, facendo ipotizzare un'attività metabolica elevata nelle piante esposte a questo spettro. Inoltre, questo spettro non ha avuto effetti sul contenuto di MDA rispetto al controllo, indicando quindi di non indurre lo stress fotossidativo.

Gli spettri AP67-Arch e NS2 confermano la loro efficacia nello stimolare l'attività enzimatica della NR, come dimostrato negli esperimenti eseguiti sulle piante di leccio coltivate con terreno Jiffy e con terreno DAFNE.

Questo lavoro rappresenta il primo studio che riguarda l'effetto del Prototipo, dotato di lampade LED, sullo sviluppo di piantine forestali, e i risultati relativi a questa fase sperimentale indicano che il Prototipo potrebbe essere utilizzato per lo sviluppo della specie forestale *Quercus ilex* L., in substrato Jiffy e DAFNE, in quanto stimola la biosintesi di pigmenti fotosintetici e la sintesi proteica, che potrebbero essere le risposte

Risultati e Discussione

ad una elevata attività fotosintetica. Inoltre, la camera di crescita sperimentale non aumentava il contenuto di MDA rispetto a una camera di crescita tradizionale, sia negli esperimenti con il terreno Jiffy e DAFNE. Sulla base di ciò, si può ipotizzare che un allevamento con ripiani movibili non induca uno stress ossidativo con la formazione di ROS come potrebbe avvenire in una camera di crescita tradizionale.

Questo lavoro è il primo studio che prende in considerazione gli effetti dell'illuminazione LED, utilizzata durante la pre-coltivazione di una specie forestale, una volta che le piante sono trasferite in serra e dopo la messa a dimora nell'ambiente naturale.

I risultati ottenuti indicano che con il successivo passaggio in serra le piante di leccio hanno mostrato un comportamento pressoché simile quando pre-coltivate con luce LED o fluorescente, fatta eccezione per l'attività metabolica della GS. Inoltre, la pre-coltivazione con l'illuminazione a LED non ha determinato differenze nella concentrazione di MDA rispetto alla lampada fluorescente una volta avvenuto il trasferimento in serra, indicando quindi che il loro utilizzo non induce uno stress fotossidativo successivo.

Dopo il trapianto in campo, le piante pre-coltivate con alcuni spettri LED hanno mostrato un basso contenuto di clorofilla indicando una sensibilità di questi pigmenti nei confronti del tipo di illuminazione utilizzata durante la fase di pre-coltivazione, così come per quanto riguarda l'attività degli enzimi dell'azoto. Inoltre, sembrerebbe che gli spettri LED utilizzati determinerebbero un minor contenuto di proteine nelle piante di leccio, suggerendo che il loro utilizzo durante la fase di pre-coltivazione nelle camere di crescita non favorisca la sintesi proteica dopo il trapianto.

Tuttavia, la pre-coltivazione con l'illuminazione a LED NS2 ha migliorato la capacità di assorbimento dell'azoto e ha determinato un minor contenuto di MDA. Questo spettro potrebbe essere idoneo per la crescita in ambiente controllato e per il successivo passaggio in campo delle piante di leccio.

Sono sicuramente necessarie ulteriori indagini per spiegare chiaramente le risposte ottenute durante queste fasi sperimentali, ma dalle risposte vegetative ottenute si può affermare che l'illuminazione a LED può essere utilizzata nella fase di pre-coltivazione nelle camere di crescita per la produzione di piantine di leccio.

4.3 Sughera

4.3.1 Esperimenti con terreno Jiffy

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di sughera coltivate con substrato Jiffy in ambiente controllato (camere di crescita e Prototipo).

4.3.1.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita

Le piantine di sughera cresciute con gli spettri LED AP67-Arch, NS2 e AP67 hanno mostrato valori del contenuto di clorofilla più alti, con valori compresi fra il 59 e il 180%, rispetto alle lampade fluorescenti, mentre la crescita con i LED G2 non hanno influenzato significativamente tale parametro quando paragonate al controllo (Figura **4.49a**).

Per quanto riguarda il contenuto di carotenoidi, si è riscontrato un aumento del 91% e del 50% rispettivamente nelle piante allevate sotto AP67-Arch e AP67 in rapporto alle lampade tradizionali. D'altra parte, la pre-coltivazione con i LED G2 ha causato una diminuzione del contenuto di β -carotene del 21% rispetto al controllo (Figura **4.49b**).

Le plantule coltivate sotto i LED AP67-Arch e NS2 non hanno mostrato differenze significative rispetto al controllo fluorescente nel contenuto di proteine, valore che invece è diminuito nelle sughere cresciute con i LED AP67 (-42%) e G2 (-53%) (Figura **4.50**).

Successivamente, sono stati studiati i cambiamenti delle attività degli enzimi del metabolismo dell'azoto nelle querce sottoposte ai diversi tipi di irradianza.

Le piante di sughera allevate con i LED, indipendentemente dal tipo di spettro analizzato, hanno mostrato un aumento dell'attività enzimatica NR rispetto al controllo (Figura **4.51a**). Questo aumento è particolarmente evidente per gli spettri AP67-Arch (+287%) e G2 (+310%).

Allo stesso modo, si è notato un effetto positivo delle lampade LED sull'attività della GS, con un aumento dei valori fra il 79-270% indipendentemente dallo spettro studiato, in rapporto alle luci fluorescenti (Figura **4.52b**).

Risultati e Discussione

Infine, è stato valutato il livello di perossidazione dei lipidi misurando il contenuto di MDA. Lo spettro G2 ha aumentato significativamente il contenuto di MDA del 60% rispetto al controllo, mentre le piantine di sughera allevate con le lampade AP67-Arch hanno mostrato una diminuzione del dato pari al 10% in rapporto alle stesse piante cresciute con le lampade tradizionali (Figura 4.53).

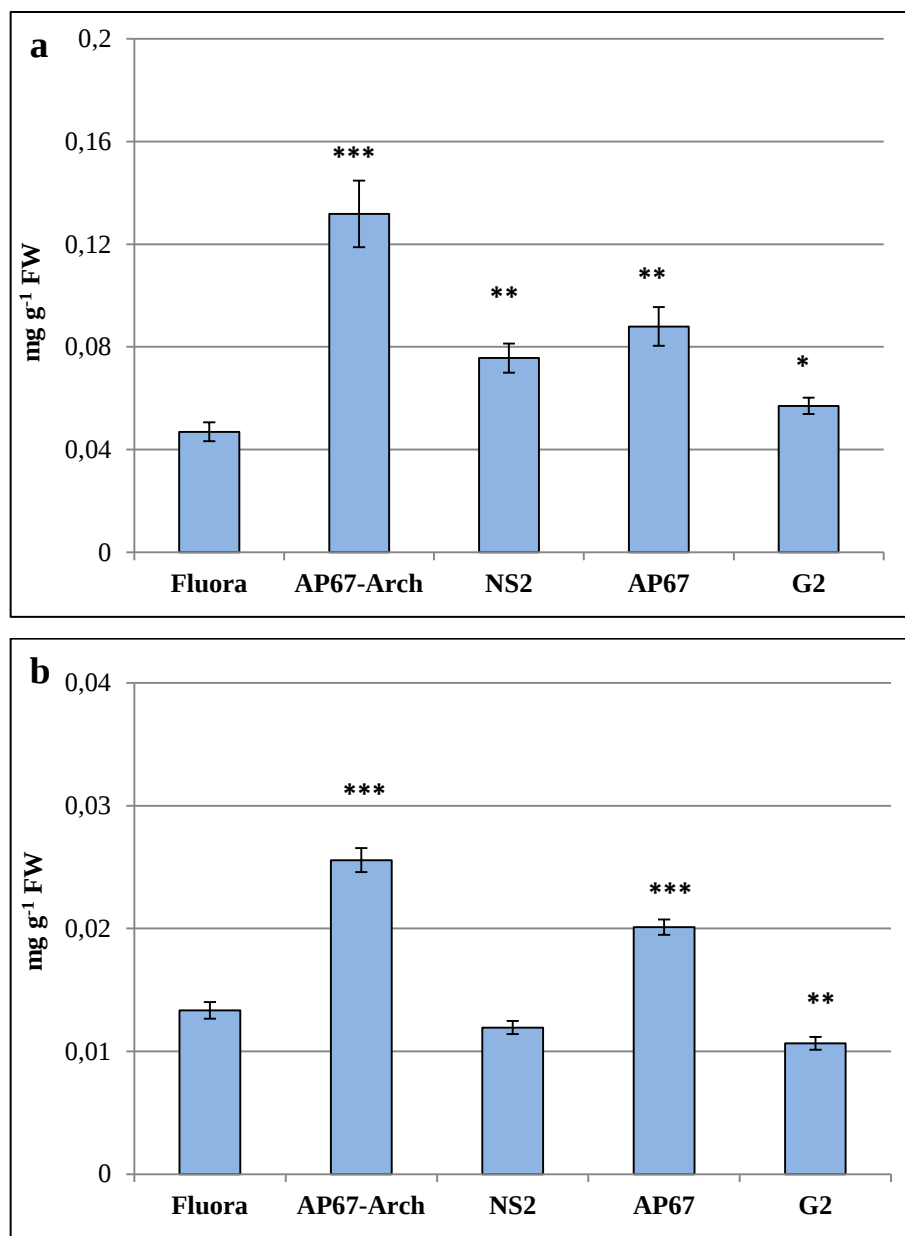


Figura 4.49 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

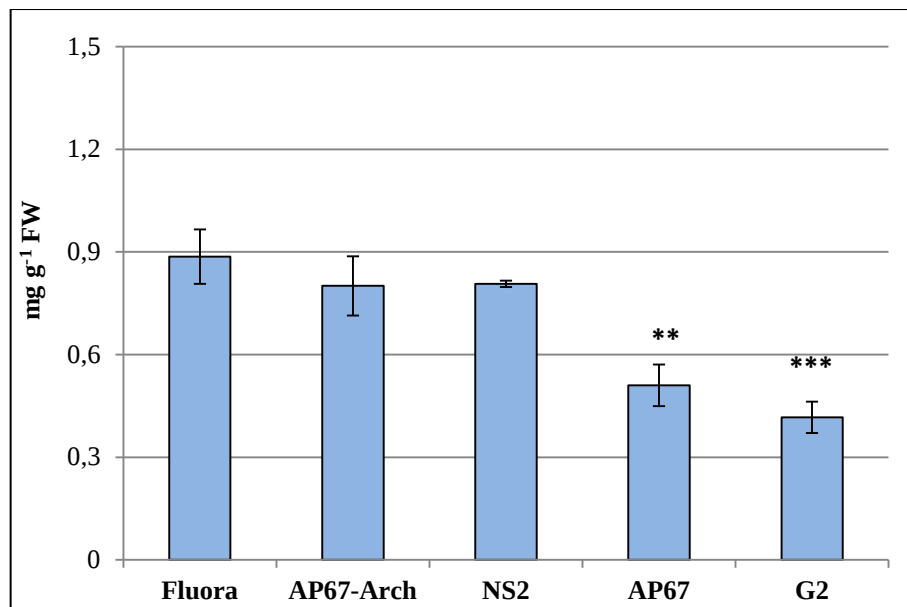


Figura 4.50 – Contenuto di proteine nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

Risultati e Discussione

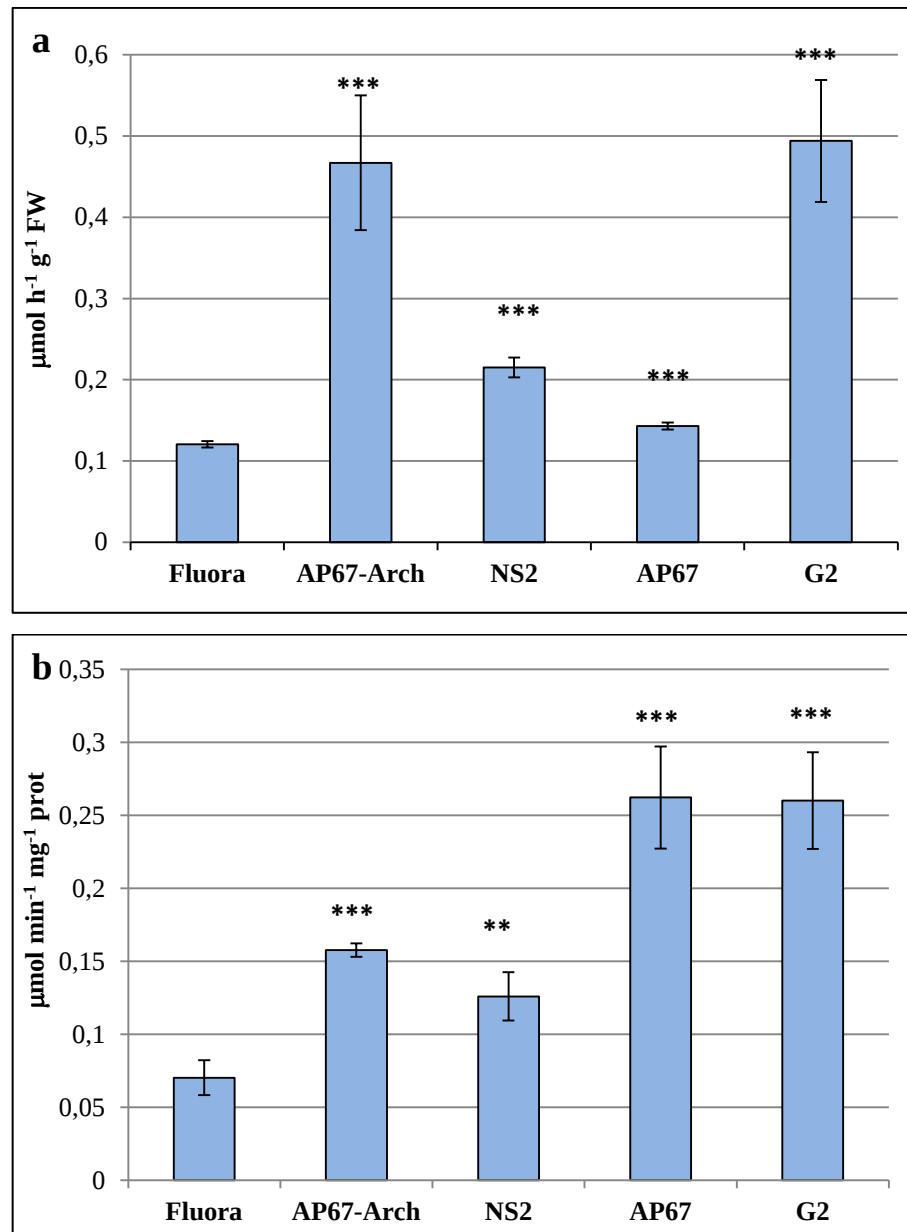


Figura 4.51 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$

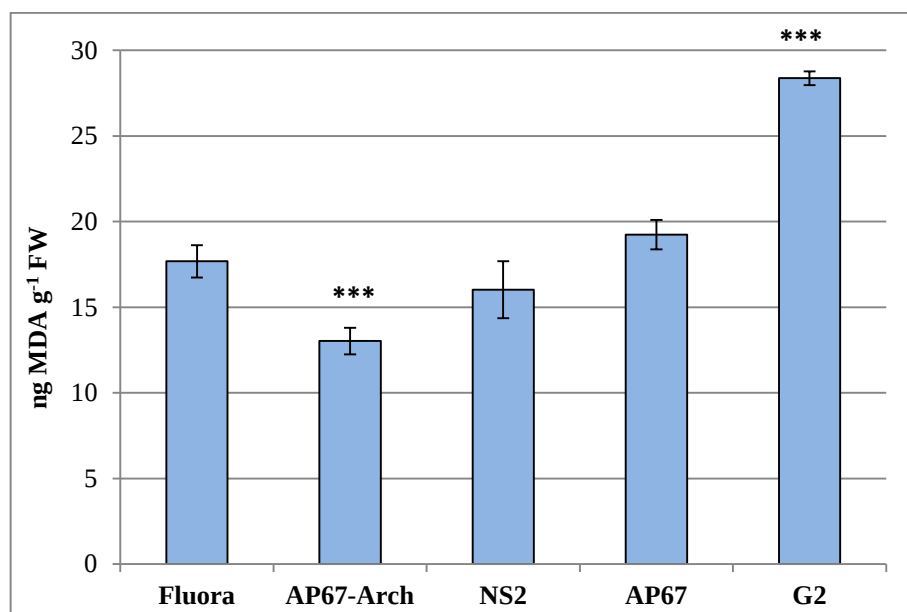


Figura 4.52 – Contenuto di MDA nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP6/-ARCH, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

4.3.1.2. Prototipo

La fase di pre-coltivazione nel Prototipo ha aumentato significativamente il contenuto di clorofilla (+243%) e di carotenoidi (+400%) nella sughera rispetto al controllo, mentre ha determinato una diminuzione delle proteine del 59% in relazione alla camera di crescita tradizionale (Figura 4.54).

L'attività della NR è stata maggiore nelle piantine di sughera pre-coltivate nella camera sperimentale rispetto al controllo (Figura 4.54a), mostrando un incremento pari al 130%, mentre l'attività della GS è stata inibita (-63%) dalla crescita nel Prototipo (Figura 4.54b).

Infine è stato valutato l'effetto delle due condizioni di crescita sul livello di perossidazione dei lipidi. Come si può notare (Figura 4.55), la concentrazione di MDA non ha mostrato variazioni significative nelle piante allevate nel Prototipo o nella camera di crescita.

Risultati e Discussione

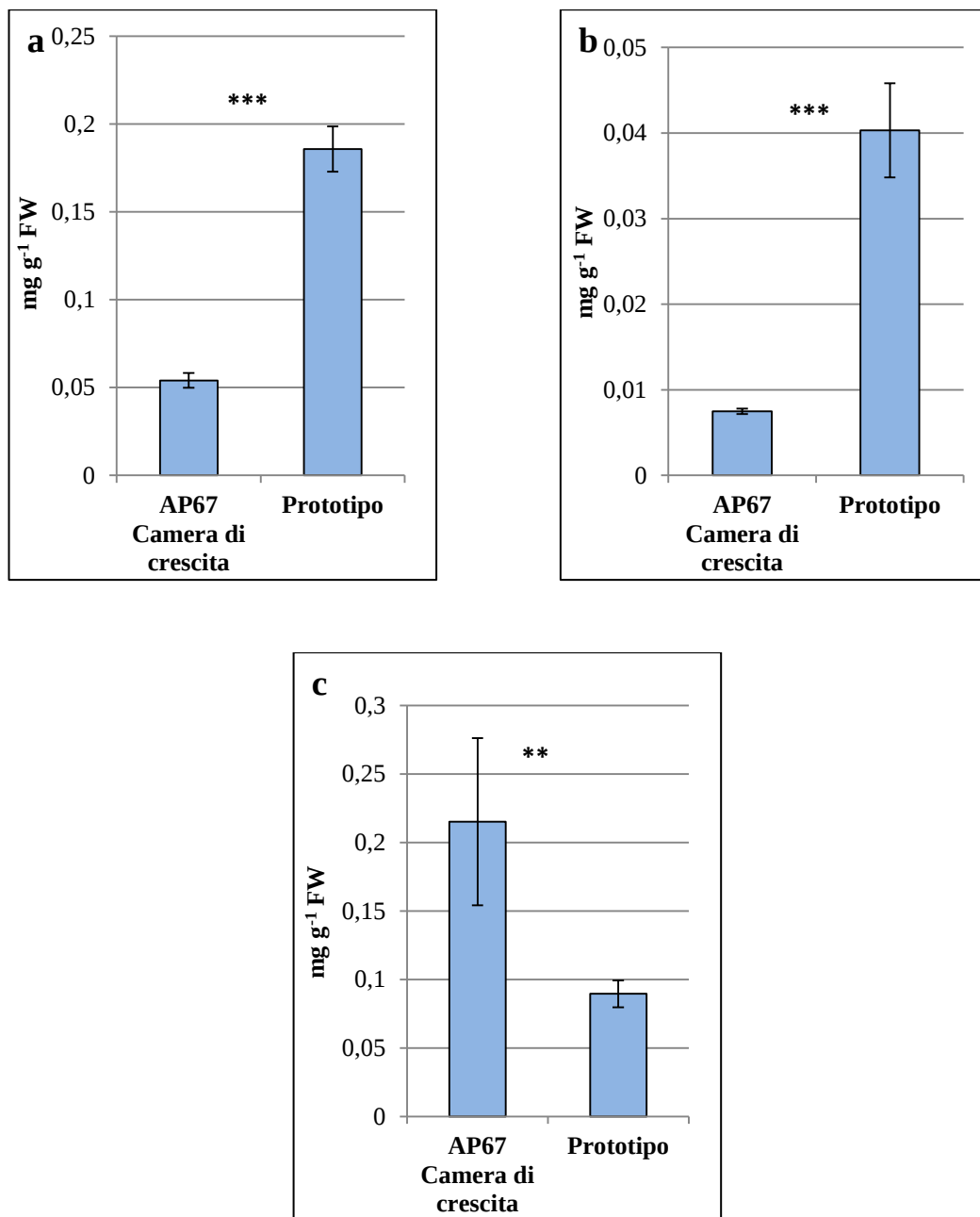


Figura 4.53 – Contenuto di clorofilla (a), di β -carotene (b) e di proteine (c) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni con terreno Jiffy nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

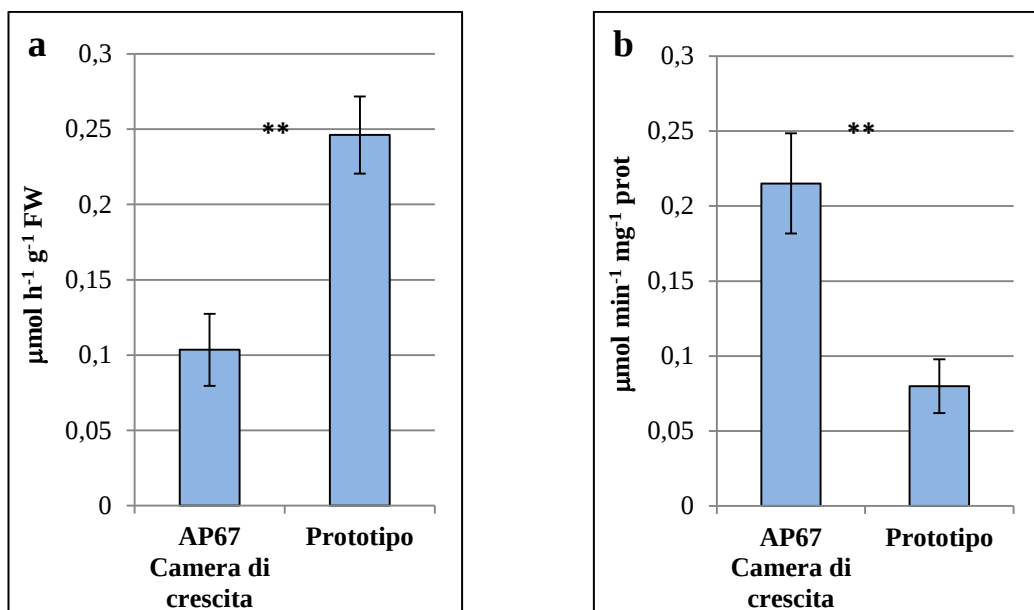


Figura 4.54 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazione dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di sughera (b) allevate per 30 giorni con terreno Jiffy nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$.

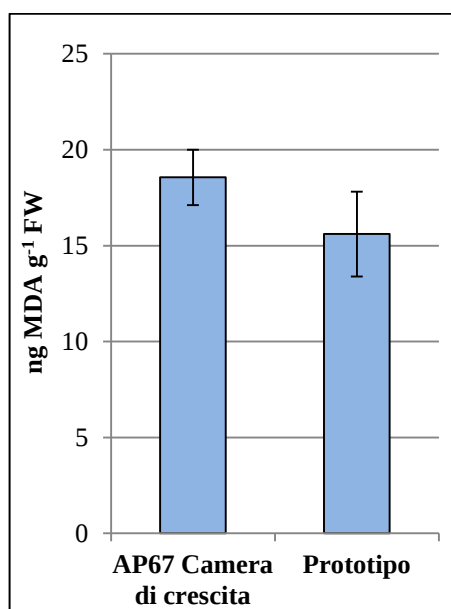


Figura 4.55 – Contenuto di MDA nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni con terreno Jiffy nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$.

4.3.1.3 Serra

Una volta terminata la fase di pre-coltivazione in ambiente controllato, le piante di sughera cresciute sotto i quattro spettri LED e sotto luce fluorescente sono state trapiantate in contenitori più grandi e trasferite in serra per l'ambientamento.

Pesanti attacchi parassitari hanno determinato la perdita delle foglie rendendole inutilizzabili per le analisi biochimiche.

Il cattivo stato vegetativo delle piante ne ha sconsigliato il successivo passaggio in piena terra..

4.3.1.4 Discussione

Terminato il ciclo colturale nelle camere di crescita, le piante di sughera si sono sviluppate normalmente nei mini-contenitori, suggerendo quindi che le modalità di coltivazione sono state appropriate (Radoglou *et al.*, 2011; Mattsson *et al.*, 2010).

Il contenuto di clorofilla è aumentato nelle foglie delle piante di sughera allevate con gli spettri LED AP67-Arch, NS2 e AP67 mentre è rimasto invariato nelle piante esposte alla lampada G2, rispetto al controllo (Figura 4.49a). Un aumento del contenuto di questo pigmento è stato riscontrato nelle piantine di piselli (Wu *et al.*, 2007) e di cavolo (Li *et al.*, 2012) quando allevate in presenza di una miscela di luce RB, rispetto a un'irradianza monocromatica. In questo senso, la combinazione di colori presente nelle lampade AP67-Arch, NS2 e AP67 sarebbe sufficiente a stimolare la biosintesi della clorofilla nelle piante di sughera con terreno Jiffy, mentre la lampada G2, proprio per l'elevata percentuale di luce R non influenzerebbe questo dato.

Il contenuto di carotenoidi invece varia a seconda del tipo di LED utilizzato (Figura 4.49b). Infatti, il LED NS2 non ha determinato differenze significative di questo parametro rispetto al controllo fluorescente, mentre i LED AP67-Arch e AP67 hanno causato un aumento del contenuto di questo pigmento nelle foglie di sughera. Come descritto precedentemente, i carotenoidi sono pigmenti che assorbono lunghezze d'onda diverse da quelle assorbite dalla clorofilla e la loro biosintesi è funzione della qualità della luce (Ramalho *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007). La luce prodotta da questi due spettri LED stimolerebbe quindi le foglie a sintetizzare β -carotene, probabilmente grazie alle lunghezze d'onda presenti nella regione del blu (Lefsrud *et al.*, 2008; Li e Kubota,

2009). Invece il LED G2, forse a causa della percentuale di luce FR diminuirebbe il contenuto di questo pigmento nella sughera (Stutte *et al.*, 2009).

Come previsto, sono stati studiati le attività degli enzimi NR e GS in funzione delle differenti condizioni di crescita.

Dai dati ottenuti si nota che l'attività di entrambi gli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'azoto è maggiore nelle piante di sughera esposte ai quattro spettri LED rispetto alle piante allevate con lampade fluorescenti (Figura 4.51), suggerendo quindi un effetto positivo di questo tipo di luce sul metabolismo dell'azoto. È ampiamente riportato in letteratura che la qualità della luce ha effetti sia sull'enzima NR sia sull'enzima GS (Figuerola, 1996; Lillo, 2004; Lillo 2008). In particolare, è stato dimostrato che la luce R e la luce B giocano un ruolo fondamentale nello stimolare l'enzima NR (Tischner, 2001; Lillo, 2004; Ohashi-Kaneko *et al.*, 2006).

Inoltre, la maggior attività della GS riscontrata nelle piante esposte alle lampade LED potrebbe essere una conseguenza di una maggiore attività fotosintetica, probabilmente correlata con il maggior contenuto di pigmenti fotosintetici riscontrato nelle medesime piante (Figura 4.49).

Il contenuto di malondialdeide (MDA) nei tessuti delle piante è considerato un marker biochimico della perossidazione lipidica e del danneggiamento delle membrane cellulari (Taulavuori *et al.*, 2001; Sochor *et al.*, 2012). I risultati ottenuti (Figura 4.52) mostrano che le lampade NS2 e AP67 non hanno avuto alcun effetto su questi parametri quando confrontati con la lampada fluorescente, mentre lo spettro AP67-Arch ha causato un minor accumulo dell'aldeide e, al contrario, lo spettro G2 ha determinato un aumento significativo della MDA. Non è chiaro il comportamento di questo parametro, in quanto l'effetto dell'intensità luminosa sul contenuto di MDA nelle piante è molto vario in letteratura. Infatti, un aumento del contenuto di MDA è stato riscontrato in piante esposte sia a un'elevata intensità luminosa (Queiroz *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2010; Ilieva *et al.*, 2010) sia a bassa intensità luminosa (Huang *et al.*, 2002). Allo stesso modo un mix di luce R, B e FR produce accumuli tossici di MDA (Baque *et al.*, 2010). Tali osservazioni sembrano suggerire che la qualità della luce prodotta dalla lampada G2 sia in grado di stimolare la perossidazione lipidica nelle piantine di sughera rispetto al controllo, effetto probabilmente causato dalla peculiarità dello spettro, al contrario del LED AP67-Arch che invece diminuirebbe i danni da stress fotossidativo. È interessante

Risultati e Discussione

notare inoltre che l'aumento della concentrazione di MDA nelle piante esposte allo spettro G2 è accompagnata dalla diminuzione del contenuto di carotenoidi (Figura 4.49b). Essendo i carotenoidi importanti agenti antiossidanti, la loro diminuzione aumenta la possibilità di formazione di radicali liberi, che quindi potrebbe essere la causa del forte aumento della perossidazione dei lipidi di membrana. Tale ipotesi sembra essere supportata da quanto riportato precedentemente in letteratura (Candan e Tarhan, 2003; Candan e Tarhan, 2009; Ayala-Astorga e Alcaraz-Meléndez, 2010).

Dopo un periodo di 30 giorni, le plantule di sughera allevate nel Prototipo in contenitore con terreno Jiffy hanno mostrato parametri di crescita paragonabili a quelle allevate nella camera di crescita tradizionale, indicando che le condizioni di allevamento impostate sono state idonee.

Le plantule di sughera hanno mostrato un maggior contenuto di pigmenti fotosintetici rispetto al controllo (Figura 4.53a, 4.53b). La clorofilla e i carotenoidi sono pigmenti vitali per la pianta data la loro importanza per il processo fotosintetico. Un aumento del contenuto di questi pigmenti è stato riscontrato da Lichtenthaler *et al.* (1981; 1982) quando le piante erano sottoposte a cambiamenti nell'intensità di luce. In questo senso, le plantule di sughera potrebbero aumentare il contenuto di clorofilla e di β -carotene in seguito a un adattamento alle condizioni di crescita nel Prototipo, considerata la peculiarità di questa camera sperimentale e dei suoi ripiani muovibili.

I carboidrati prodotti dalla fotosintesi forniscono gli scheletri carboniosi per la sintesi di importanti composti biologici, come per esempio gli amminoacidi (Wickert *et al.*, 2007) e quindi rivestono un ruolo importante nel processo di assimilazione dell'azoto. Quindi, sono state studiate le variazioni dell'attività di due enzimi coinvolti nel metabolismo dell'azoto, NR, coinvolto nella reazione di riduzione dello ione nitrato, e GS, che catalizza la reazione di organicazione dell'ammonio per la sintesi di glutammina.

Come riportato in Figura 4.54, l'attività di questi enzimi è diversamente influenzata nelle plantule di sughera dal tipo di camera di crescita utilizzata durante la fase di pre-coltivazione. L'allevamento nel Prototipo ha determinato un notevole aumento dell'attività della NR e una forte riduzione di quella della GS. La concentrazione di NO_3^- e la luce sono i fattori che più di ogni altro regolano l'attività

della NR (Lillo, 2008) e la sua attività è stimolata da un'elevata attività fotosintetica (Cheng *et al.*, 1992; Vincentz *et al.*, 1993). L'aumento del contenuto dei pigmenti fotosintetici potrebbe essere il risultato di un'aumentata attività fotosintetica che, di conseguenza, condizionerebbe positivamente la riduzione dello ione nitrato a nitrito. Inatteso è il dato relativo all'enzima della GS. Siccome la sua attività è garantita da metaboliti prodotti durante la fotosintesi, l'elevato contenuto di clorofilla e carotenoidi riscontrato nelle plantule di sughera cresciute nel Prototipo (Figura 4.53a, 4.53b) farebbe ipotizzare un'attività fotosintetica efficiente e quindi una maggiore attività di assimilazione dell'azoto nelle medesime piante. Tuttavia, la diminuita attività della GS potrebbe essere una conseguenza di una ridotta sintesi proteica, valutata come contenuto di proteine (Figura 4.53c), riscontrata nelle foglie di sughera allevate nel Prototipo. Inoltre, l'induzione dell'attività della NR potrebbe essere determinata dalla disponibilità di glutammato, substrato utilizzato dalla GS per la sintesi di glutammina, e dall' α -chetoglutarato, precursore del glutammato (Ali *et al.*, 2007)

Infine, si è considerato il livello di perossidazione dei lipidi, utilizzando come indicatore di stress il contenuto di MDA (Bacelar *et al.*, 2006; Sochor *et al.*, 2012). Il contenuto di MDA non è stato influenzato dalle condizioni di crescita (Figura 4.55). Il Prototipo quindi non causerebbe un maggior stress ossidativo nelle piante di sughera, rispetto al controllo, riducendo il danno a carico delle membrane cellulari.

4.3.2 Esperimenti con terreno DAFNE

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di sughera coltivate con substrato DAFNE in ambiente controllato (camere di crescita e Prototipo).

4.3.2.1 Pre-coltivazione nelle camere di crescita

La crescita con gli spettri LED non ha determinato un aumento del contenuto di clorofilla nelle piantine di sughera, mentre ha causato una diminuzione nel contenuto di β -carotene specialmente con gli spettri AP67-Arch (-23%), NS2 (-26%) e AP67 (-31%) rispetto alle piante cresciute con il controllo fluorescente (Figura 4.56).

Risultati e Discussione

Il contenuto proteico è rimasto pressoché invariato nelle piante esposte alla luce LED rispetto alla fluorescente, tranne per le piante allevate con AP67 che hanno mostrato un aumento di questo parametro del 49% rispetto al controllo (Figura 4.57).

Come previsto dal lavoro, sono stati analizzati i cambiamenti delle attività di due enzimi (NR e GS) in funzione delle lampade utilizzate.

L'attività dell'enzima NR è stata stimolata dalle lampade AP67-Arch (+57%) e NS2 (+84%) rispetto alla sughera cresciuta con lampade fluorescenti (Figura 4.58a), mentre l'enzima GS ha aumentato la sua attività nelle piante cresciute con AP67-Arch (+54%) e AP67 (+98%), rispetto alle piante controllo (Figura 4.58b).

Infine, è stato valutato il livello di perossidazione dei lipidi valutando il contenuto di MDA. Le piante allevate con gli spettri AP67-Arch e NS2 hanno mostrato una diminuzione del contenuto dell'aldeide del 30% e del 42% rispettivamente, mentre lo spettro AP67 ha determinato un aumento di concentrazione pari all'8% in relazione al controllo (Figura 4.59).

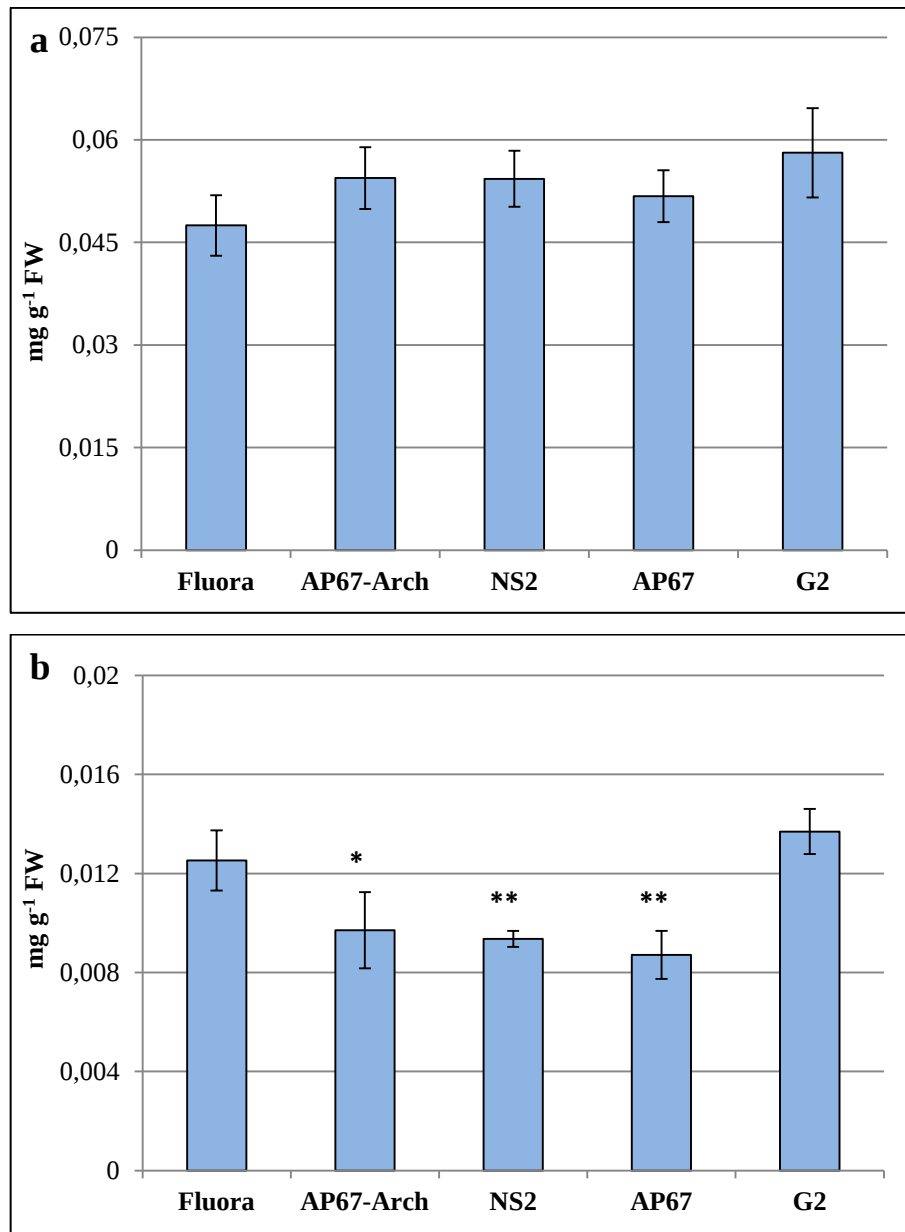


Figura 4.56 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

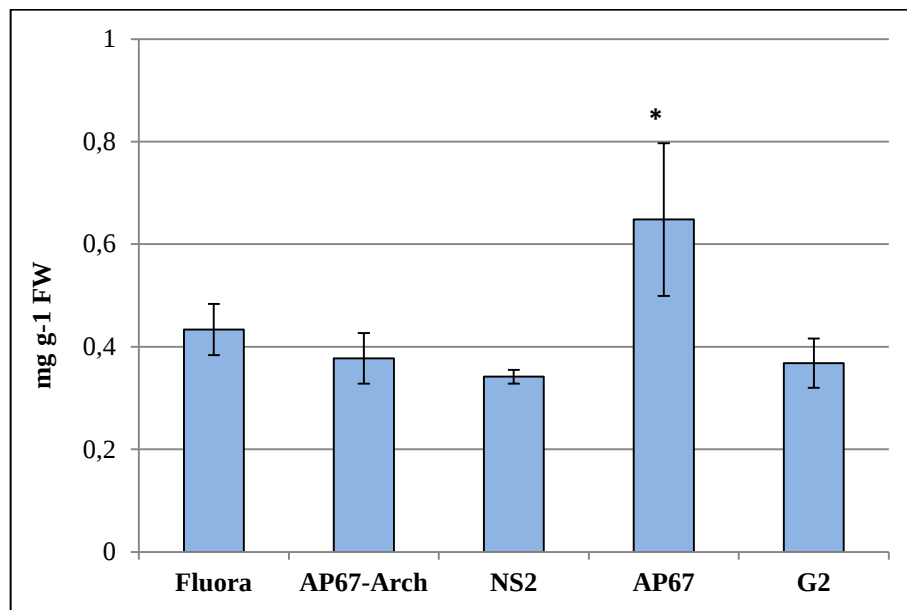


Figura 4.57– Contenuto di proteine nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

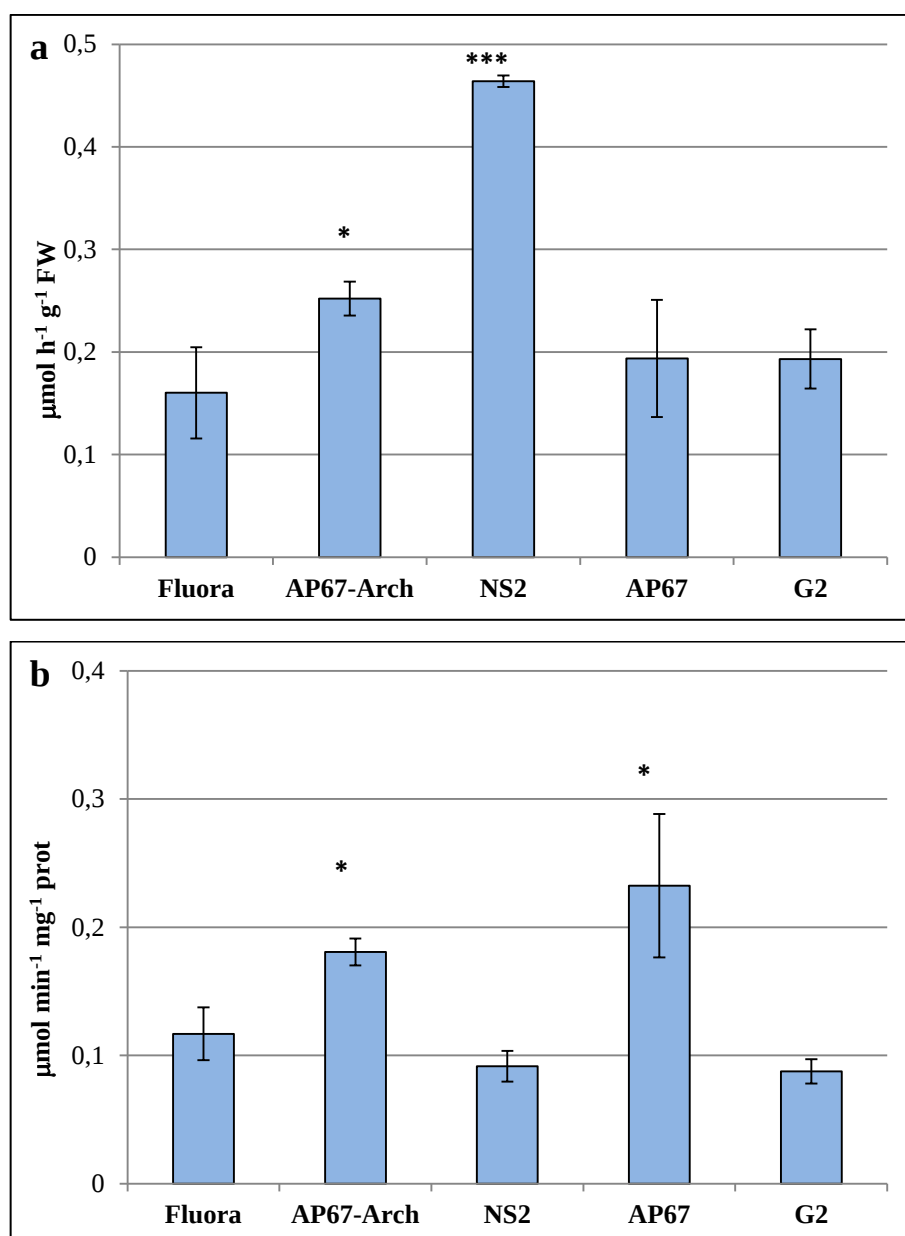


Figura 4.58– Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm\text{DS}$

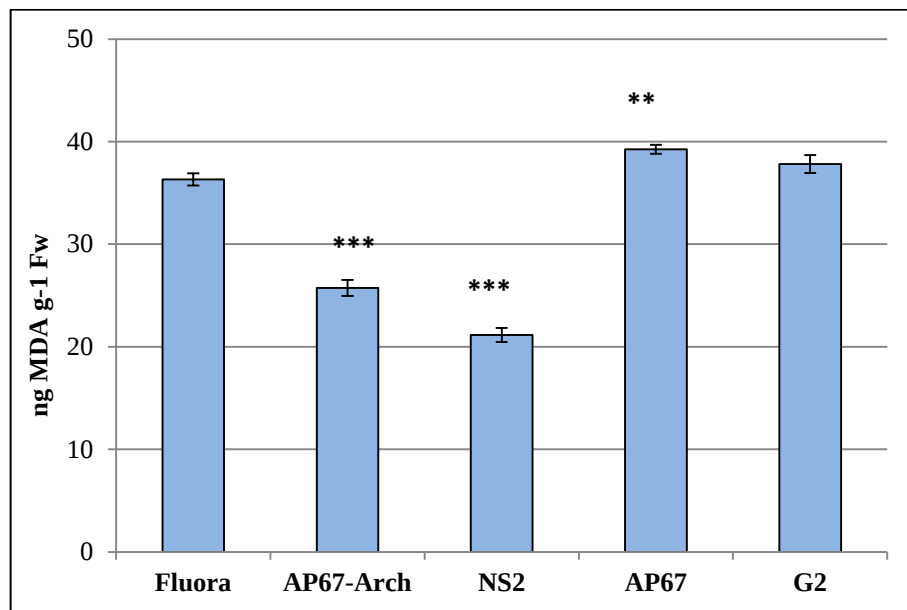


Figura 4.59 – Contenuto di MDA nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

4.3.2.2 Prototipo

La crescita nella camera sperimentale non ha determinato un aumento nel contenuto di clorofilla e carotenoidi, mentre il contenuto di proteine è stato maggiore (+38%) rispetto alla camera tradizionale (Figura **4.60**).

Un fattore che potrebbe essere influenzato dalle condizioni di crescita nella camera sperimentale è la capacità delle piante di assimilare azoto, per questo motivo sono stati studiati enzimi chiave coinvolti in questo processo.

Le piantine di sughera hanno mostrato attività della NR pressoché simili quando allevate nel Prototipo o nella camera di crescita tradizionale (Figura **5.61a**). Invece, lo sviluppo nel Prototipo ha inibito fortemente l'attività della GS dell'84% nelle plantule, rispetto al controllo (Figura **5.61b**).

Infine, le piantine di sughera cresciute nel Prototipo hanno mostrato sintomi più lievi di stress ossidativo rispetto a quelle sviluppatesi nella tradizionale camera di crescita, come indicato dal più basso contenuto di MDA (-76%) (Figura **4.62**).

Risultati e Discussione

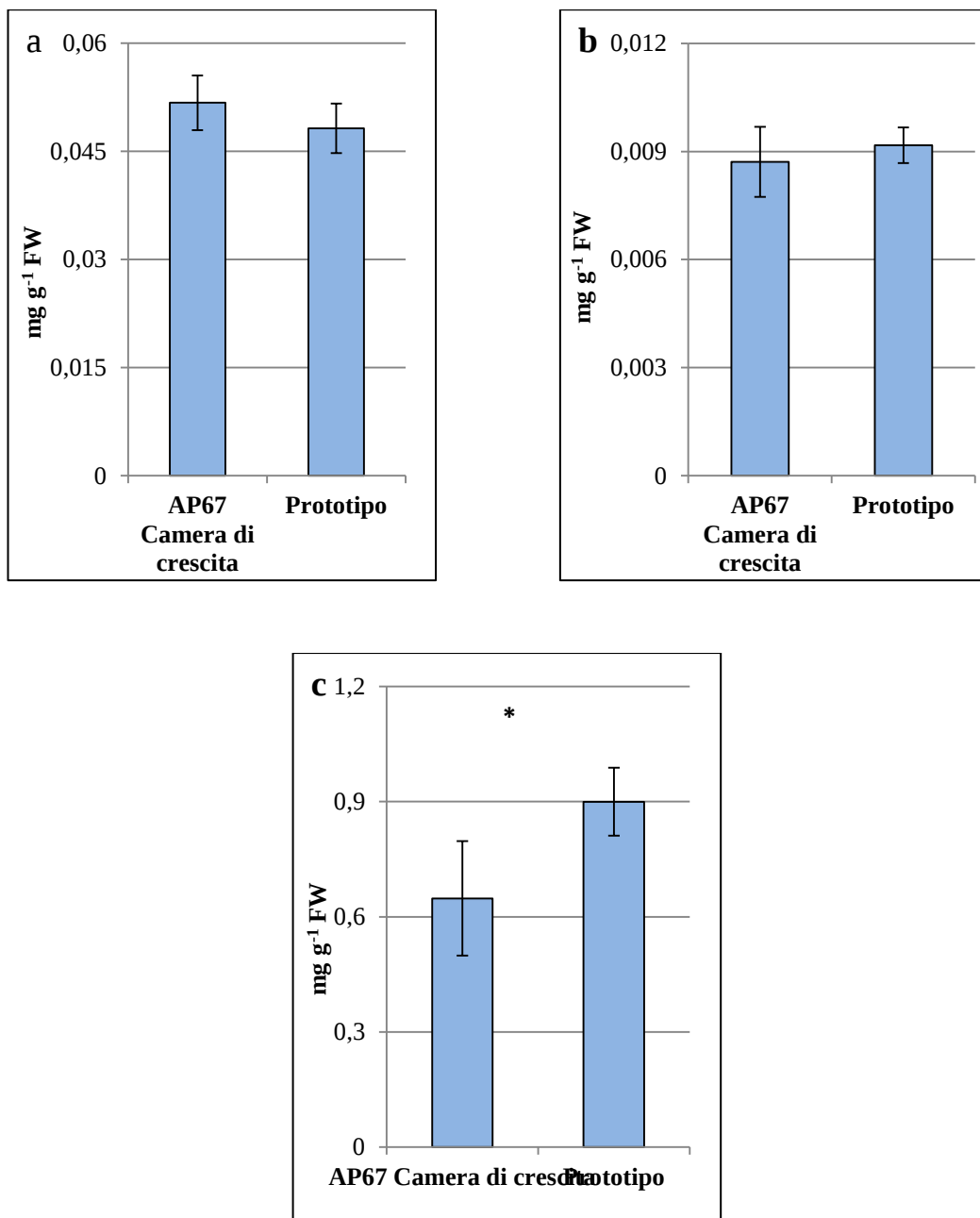


Figura 4.60 – Contenuto di clorofilla (a), di β -carotene (b) e di proteine (c) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni con terreno DAFNE nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

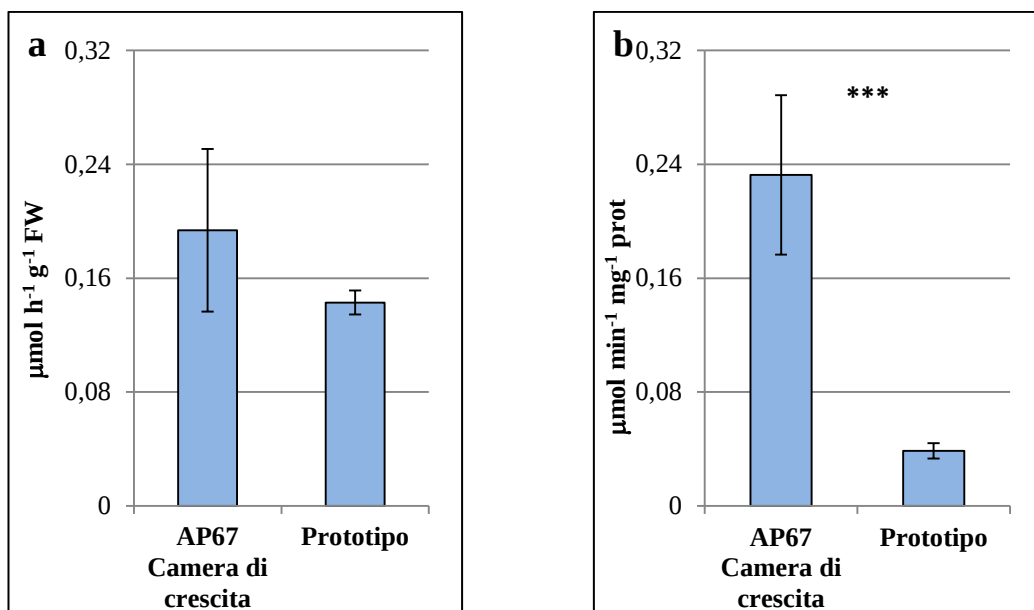


Figura 4.61 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazione dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di sughera (b) allevate per 30 giorni con terreno DAFNE nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

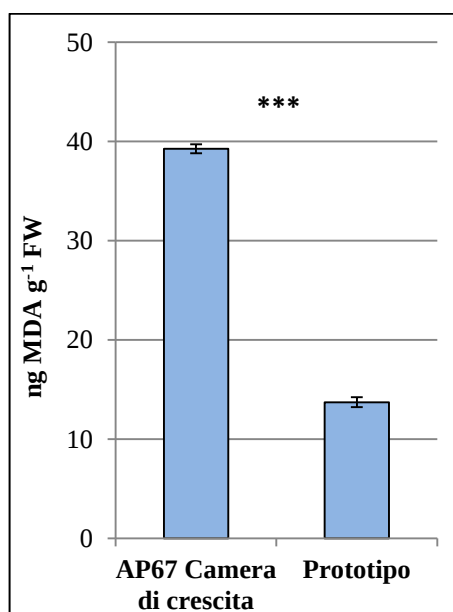


Figura 4.62 – Contenuto di MDA nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni con terreno DAFNE nel Prototipo e in camera di crescita con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

4.3.2.3 Discussione

Terminato il periodo di allevamento di 30 giorni nelle camere di crescita, le plantule di sughera sono cresciute normalmente e non hanno mostrato sintomi di disturbo, confermando l'efficacia della pre-coltivazione nei mini-contenitori (Iakovoglou *et al.*, 2012; Mattsson *et al.*, 2010).

La sughera cresciuta con terreno DAFNE non ha mostrato differenze nel contenuto di clorofilla totale in base al tipo di illuminazione utilizzata durante la fase di pre-coltivazione (Figura 4.53a), mentre si è notata una diminuzione del contenuto di β -carotene nelle plantule pre-allevate con gli spettri AP67-Arch, NS2 e AP67 rispetto al controllo (Figura 4.53b). La biosintesi di questo pigmento, e di conseguenza la sua concentrazione nel tessuto fogliare, è strettamente legata alla qualità della luce a cui sono esposte le piante (Ramalho *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007). In particolare, è stato osservato un maggior contenuto di carotenoidi nelle piante esposte a luce B (Lefsrud *et al.*, 2008; Li e Kubota, 2009). In questo senso, la percentuale di luce B presente negli spettri LED AP67-Arch, NS2 e AP67 non sarebbe sufficiente a stimolare la biosintesi di questo pigmento nelle piante di sughera in terreno DAFNE. Alla luce di quanto detto, ci si aspetterebbe che anche lo spettro G2, caratteristico per le sue lunghezze d'onda nel R e nel FR, diminuisca il contenuto di β -carotene (Stutte *et al.*, 2009) rispetto alla lampada fluorescente. Invece, le plantule di sughera esposte all'illuminazione di questo spettro non hanno mostrato differenze significative con le plantule controllo.

Successivamente, sono state indagate l'attività degli enzimi NR e GS nelle piante di sughera esposte ai diversi tipi di irradianza.

L'attività dell'enzima NR varia a seconda dello spettro LED analizzato. Infatti, l'attività enzimatica non ha mostrato differenze nelle piante esposte alle lampade AP67 e G2 rispetto al controllo, mentre l'attività è stata maggiore nelle foglie delle plantule cresciute con gli spettri LED AP67-Arch e NS2 (Figura 4.55a). La riduzione dello ione nitrato a nitrito da parte dell'enzima NR è fortemente dipendente dalla luce (Sanchez e Heldt, 1990; Lillo, 1994; Lillo, 2004). Un aumento dell'attività di questo enzima è stato riportato in diversi lavori in piante esposte a una miscela di luce RB (Ohashi-Kaneko *et al.*, 2006; Urbonaviciut *et al.*, 2007). I risultati ottenuti indicano che gli spettri AP67-Arch e NS2 stimolerebbero il metabolismo del nitrato nelle piante di sughera con terreno DAFNE, probabilmente grazie alla loro combinazione di colori.

Risultati e Discussione

Anche l'enzima GS è regolato in maniera diversa in funzione del tipo di spettro utilizzato per la crescita della sughera nel terreno DAFNE. Dai dati ottenuti, si nota che le lampade AP67-Arch e AP67 hanno stimolato l'attività enzimatica rispetto alla lampada fluorescente, mentre l'enzima ha avuto un'attività pressoché simile quando esposto alle lampade NS2 e G2 rispetto al controllo (Figura 4.55b). La GS è regolata dalla luce nella reazione di assimilazione dell'azoto inorganico con gli scheletri carboniosi prodotti durante la fotosintesi (Sakakibara *et al.*, 1992; Cren e Hirel, 1999; Simonovic e Anderson, 2008) e l'attività di questo enzima è garantita da un sufficiente apporto di energia proveniente dal processo fotosintetico (Lillo, 1984). Nelle nostre condizioni sperimentali sembra che l'attività fotosintetica delle piante di sughera esposte a queste due lampade LED sia adeguata per mantenere un'elevata attività enzimatica della GS. Inoltre, l'aumentata attività della GS nelle plantule allevate con AP67 è correlata con un aumento del contenuto di proteine nelle stesse piante (Figura 4.54), indicando quindi una maggior sintesi proteica.

È interessante notare che la lampada LED AP67-Arch aveva un effetto positivo sull'attività dell'enzima NR e della GS nella sughera coltivata sia nel substrato Jiffy sia nel substrato DAFNE, indicando quindi che la composizione spettrale della luce potrebbe essere ottimale per il metabolismo dell'azoto nelle piante di sughera.

Infine, abbiamo osservato che le diverse luci LED impiegate hanno avuto effetti diversi sul contenuto di MDA nelle piante di sughera (Figura 4.56). Un aumento di MDA è generalmente considerato nelle piante come indice di stress ossidativo, in quanto la MDA è uno dei prodotti finali della perossidazione dei lipidi (Sochor *et al.*, 2012; Anjum *et al.*, 2015). Dai dati ottenuti si nota che la lampada G2 non ha influenzato il contenuto di MDA rispetto al controllo, mentre gli spettri AP67-Arch e NS2 hanno determinato un minor accumulo dell'aldeide e il LED AP67 un aumento di tale parametro, seppur lieve. La luce gioca un ruolo importante per favorire lo stress ossidativo nelle piante (Sofa *et al.*, 2004) e un elevato contenuto di MDA è stato riscontrato in piante esposte sia a bassa intensità luminosa che a alta intensità luminosa (Queiroz *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2002; Ilieva *et al.*, 2010). In questo senso, la luce prodotta dalla lampada AP67 avrebbe un'intensità tale da aumentare il contenuto di MDA nelle piante di sughera, aumentando i rischi derivati dalla perossidazione dei lipidi, al contrario delle lampade AP67-Arch e NS2 che non

Risultati e Discussione

stimolerebbero lo stress ossidativo. È interessante notare che lo spettro AP67-Arch riduce la formazione di ROS, rispetto al controllo, nelle plantule di sughera quando allevate con substrato Jiffy che con terreno DAFNE, confermando la sua efficacia nel sostenere la crescita delle piante riducendo i danni causati da un'eccessiva perossidazione lipidica.

Nella successiva fase sperimentale è stato valutato l'effetto della pre-coltivazione con spettri LED nel Prototipo rispetto a una pre-coltivazione in una camera di crescita tradizionale su plantule di sughera allevate con substrato DAFNE.

Trascorso il periodo sperimentale di 30 giorni, la piante allevate nel Prototipo hanno raggiunto uno stadio di crescita paragonabile a quelle allevate nella camera di crescita tradizionale indicando che le condizioni di allevamento impostate erano idonee.

Le plantule di sughera cresciute nel Prototipo non hanno mostrato differenze significative sia nel contenuto di clorofilla sia nel contenuto di carotenoidi rispetto al controllo (Figura 4.57a, 4.57b), suggerendo quindi che la biosintesi di pigmenti fotosintetici nelle piante con il terreno DAFNE non sarebbe condizionata dal tipo di camera di crescita utilizzata durante la fase di pre-coltivazione.

L'azoto è uno dei nutrienti più importanti e maggiormente limitante la crescita di una pianta e la sua assimilazione è strettamente interconnessa con l'attività fotosintetica. Le variazioni nella velocità di assimilazione dell'azoto sono state studiate attraverso l'analisi delle attività della NR, coinvolta nella prima reazione di assimilazione dell'azoto, e della GS, che catalizza la reazione di sintesi dell'aminoacido glutammina.

L'attività della NR è pressoché simile nelle piante pre-coltivate nel Prototipo e nella camera di crescita tradizionale (Figura 4.58a), mentre l'attività della GS è fortemente ridotta dalla camera di crescita sperimentale (Figura 4.58b). È interessante notare che nelle stesse plantule tale risposta è accompagnata da un maggior contenuto di proteine (Figura 4.57c). Quindi, tale osservazione potrebbe indicare che le piante di sughera allevate con il Prototipo potrebbero aumentare la sintesi proteica in modo da mantenere un'attività metabolica efficiente. È interessante notare che l'attività della GS era inibita dal Prototipo nella sughera sia quando si utilizzava il terreno Jiffy che il terreno DAFNE, confermando la sensibilità dell'enzima, in questa specie, alle variazioni continue dell'intensità di luce.

Infine, analizzando il livello di perossidazione dei lipidi, utilizzando come indicatore di stress il contenuto di MDA (Bacelar *et al.*, 2006; Sochor *et al.*, 2012), è emerso che l'allevamento delle piante nel Prototipo risultava in un minor contenuto di MDA (Figura 4.59), indicando quindi che l'esposizione delle piante a una continua e variabile intensità di luce rallenterebbe la formazione di radicali liberi, riducendo il rischio derivante dalla perossidazione lipidica.

4.3.3 Differenze di crescita fra il terreno Jiffy e il terreno DAFNE

La pre-coltivazione con terreno DAFNE delle plantule di sughera nelle camere di crescita ha diminuito significativamente il contenuto di pigmenti fotosintetici, in generale, rispetto alla pre-coltivazione con substrato Jiffy, indicando una ridotta biosintesi di clorofilla e carotenoidi (Figura 4.63).

Anche il contenuto di proteine è stato minore nelle piante allevate con il terreno sperimentale (Figura 4.64), in relazione al Jiffy, in particolare nella sughera esposta alla luce fluorescente, AP67-Arch e NS2, suggerendo una minor sintesi proteica.

La crescita con il terreno DAFNE ha stimolato l'attività della NR nelle plantule esposte allo spettro NS2, mentre ha inibito fortemente l'attività nella sughera allevata sotto AP67-Arch e G2, rispetto al Jiffy (figura 4.65a). Invece, per quanto riguarda l'enzima GS, il terreno DAFNE ha incrementato l'attività nelle plantule esposte agli spettri fluorescente e AP67-Arch mentre l'ha inibito quando le piante erano cresciute sotto NS2 e G2, rispetto al substrato Jiffy (Figura 4.65b). Non è chiaro il motivo di questo andamento, però la riduzione delle attività enzimatiche riscontrata nelle piante prodotte con il terreno sperimentale (specialmente sotto lo spettro G2) potrebbe essere una conseguenza di una ridotta attività fotosintetica, probabilmente causata da un minor contenuto di pigmenti fotosintetici. La ridotta attività della NR riscontrata nella sughera DAFNE esposta allo spettro AP67-Arch è correlata con un aumento dell'attività della GS nelle stesse piante. Come precedentemente descritto, l'attività della NR potrebbe essere inibita da un'elevata concentrazione di glutammina, prodotto finale della GS.

Infine, la pre-coltivazione con il terreno DAFNE ha determinato un maggior accumulo di MDA nella sughera rispetto alle piante allevate con terreno Jiffy (Figura

Risultati e Discussione

4.66), indicando quindi un maggior rischio di danno ossidativo a carico delle membrane cellulari.

Anche per quanto riguarda la crescita nel Prototipo, la piantine cresciute con terreno DAFNE hanno mostrato un minor contenuto di clorofilla e carotenoidi (Figura **4.67a**, **4.67b**) e una ridotta attività metabolica degli enzimi dell'azoto (figura **4.68**), nonostante il maggior contenuto di proteine (Figura **4.67c**), rispetto alle piante seminate nel substrato Jiffy.

In definitiva, i due terreni testati nella fase di pre-coltivazione sono risultati buoni substrati per la crescita delle piantine di sughera in ambiente controllato.

Tuttavia, sembrerebbe che la sughera prediligga il terreno Jiffy rispetto al DAFNE, sia nelle camere di crescita che nel Prototipo. Nonostante ciò, il substrato sperimentale si è dimostrato comunque un buon terreno di coltura per la sughera, considerando la qualità delle piantine prodotte.

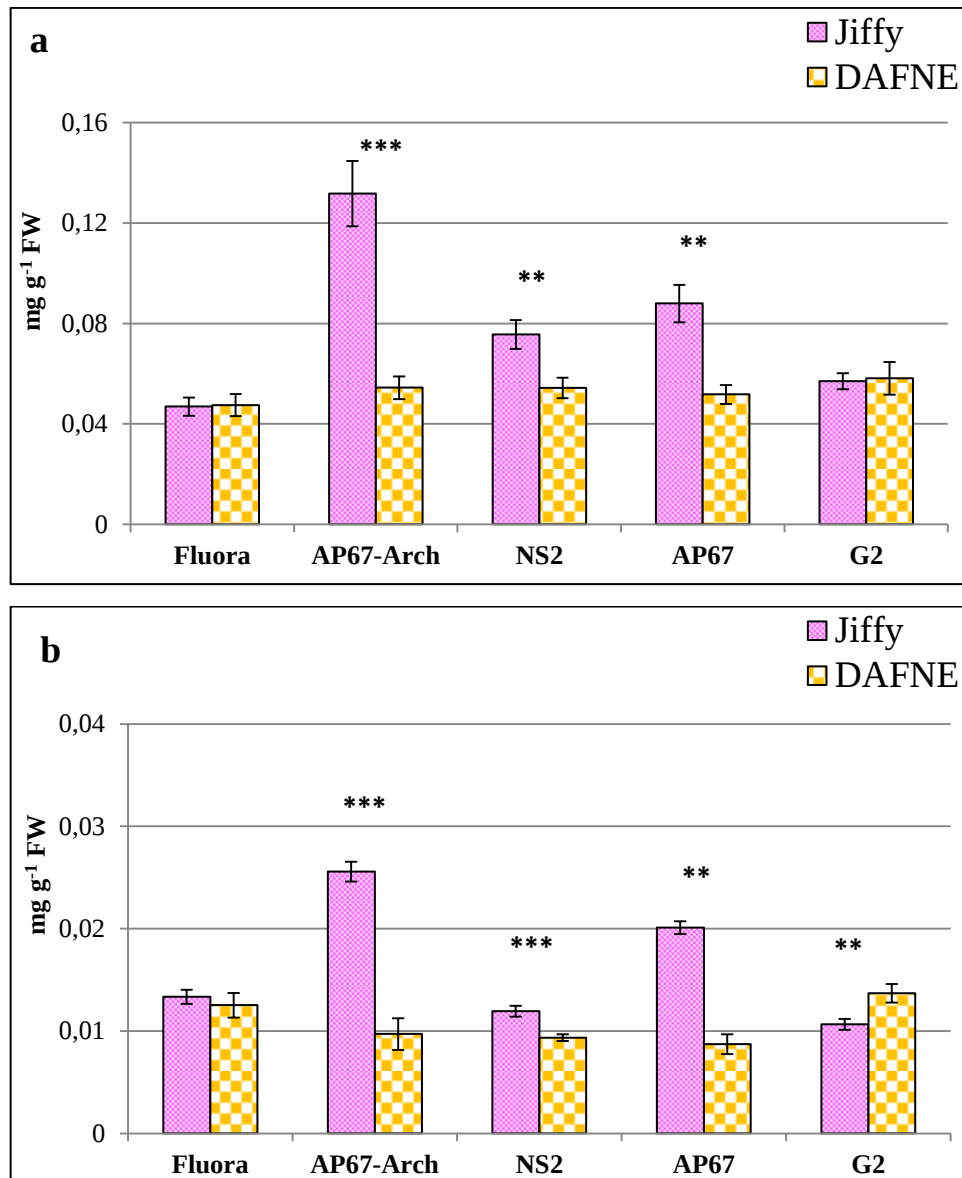


Figura 4.63 – Contenuto di clorofilla (a) e di β -carotene (b) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

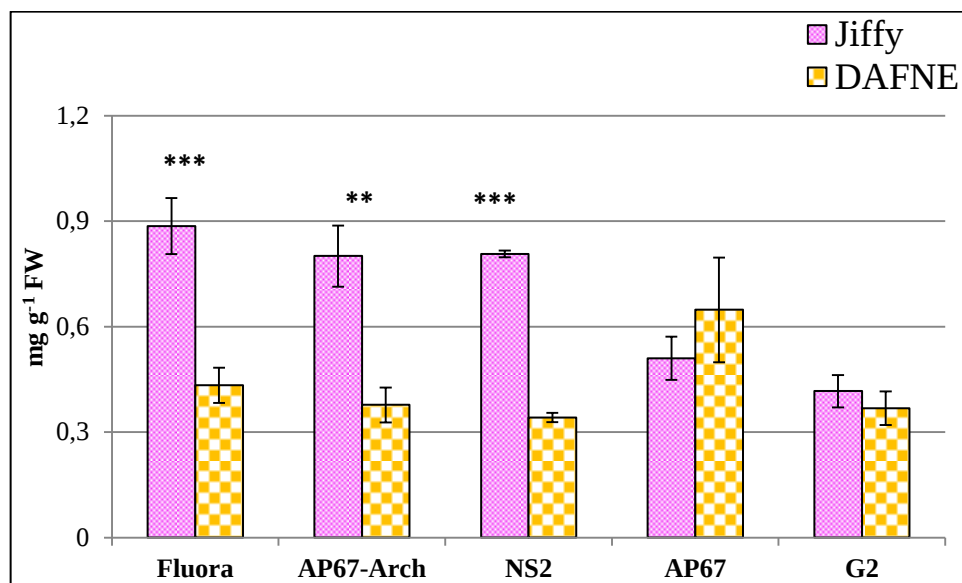


Figura 4.64 – Contenuto di proteine nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

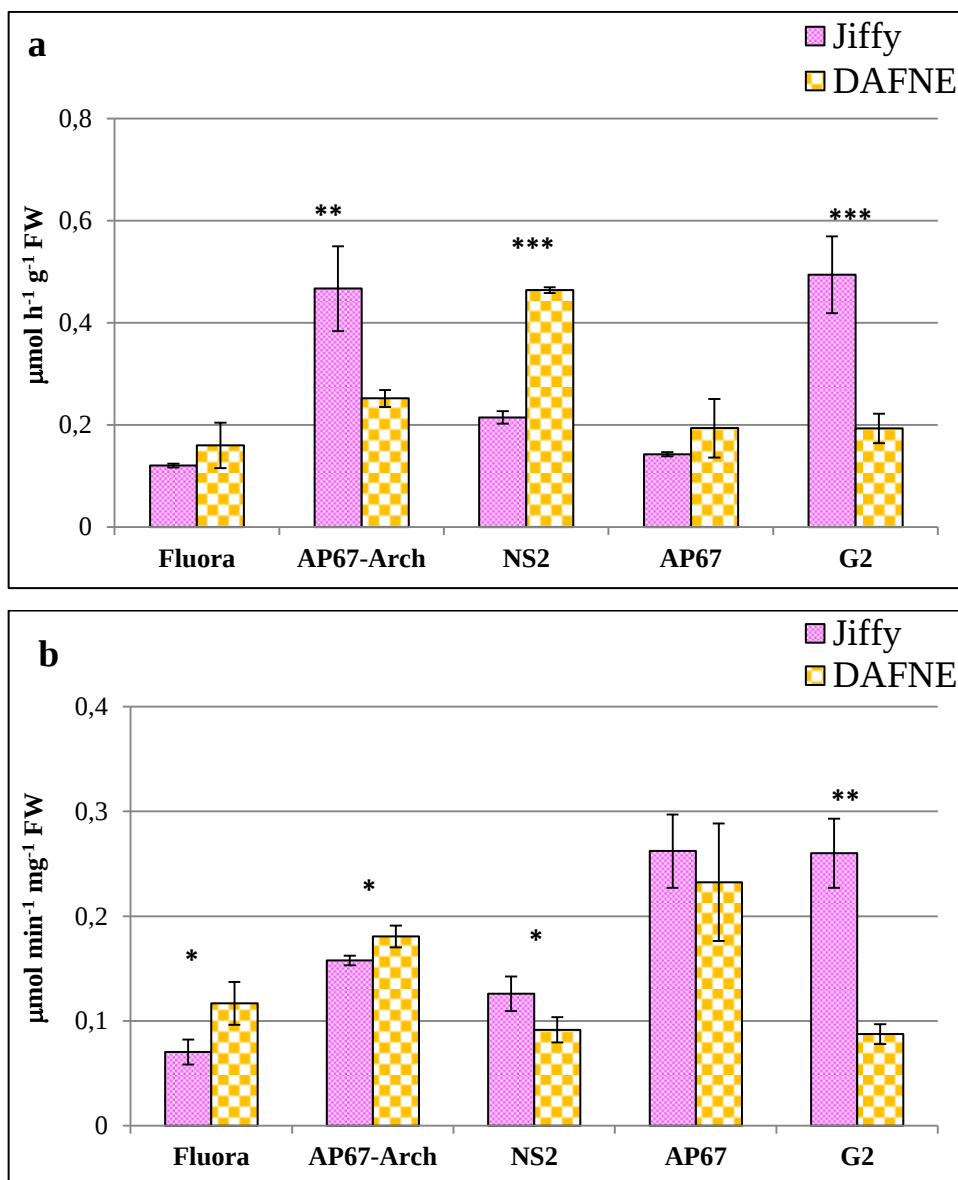


Figura 4.65 – Variazioni dell'attività dell'enzima NR (a) e variazioni dell'attività dell'enzima GS (b) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS.

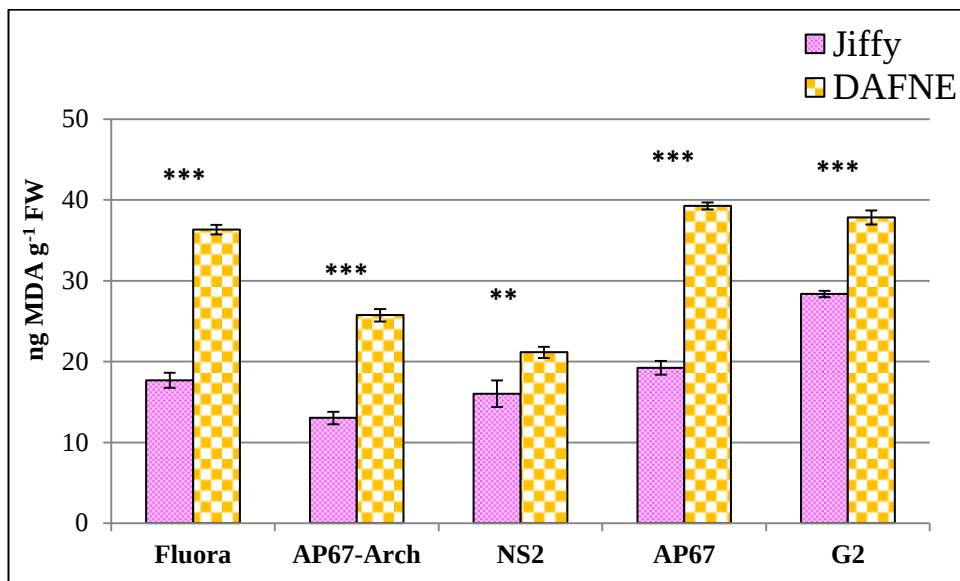


Figura 4.66 – Contenuto di MDA nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni in camere di crescita con luci fluorescenti o luci LED AP67-Arch, NS2, AP67 e G2 con terreno Jiffy e con terreno DAFNE. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm$ DS

Risultati e Discussione

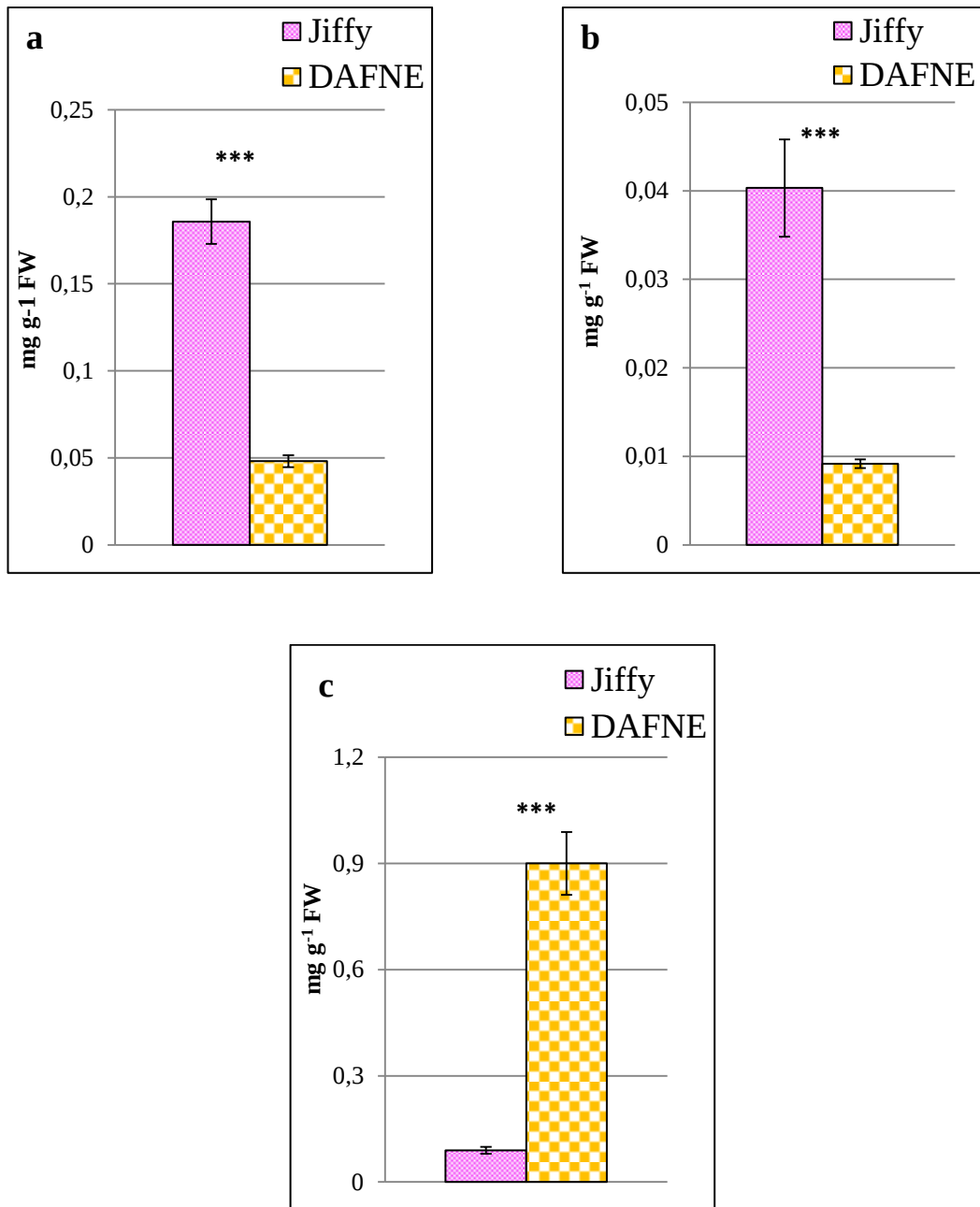


Figura 4.67 – Contenuto di clorofilla (a), di β -carotene (b) e di proteine (c) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni con terreno Jiffy e con terreno DAFNE nel Prototipo con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore $\pm \text{DS}$.

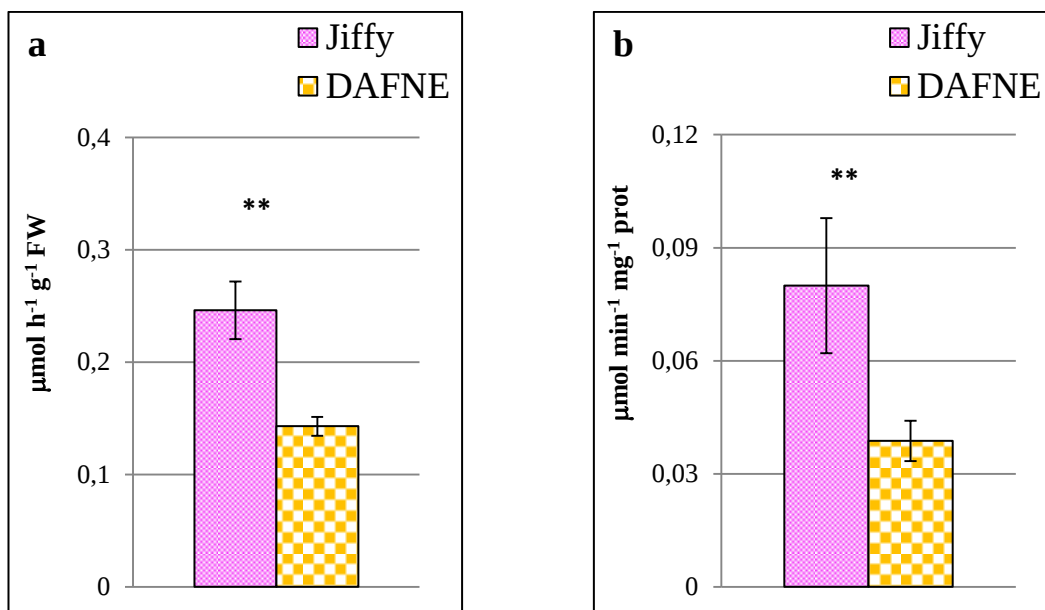


Figura 4.47 – Variazioni dell’attività dell’enzima NR (a) e variazioni dell’attività dell’enzima GS (b) nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni con terreno Jiffy e con terreno DAFNE nel Prototipo con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l’errore $\pm \text{DS}$.

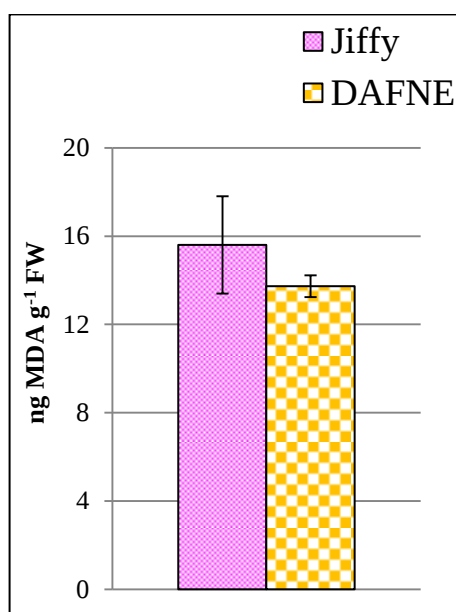


Figura 4.67 – Contenuto di MDA nelle foglie di sughera allevate per 30 giorni con terreno Jiffy nel Prototipo con luci LED AP67. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l’errore $\pm \text{DS}$.

4.3.4 Conclusioni

I risultati ottenuti dimostrano che le quattro lampade LED possono essere utilizzate come fonte di luce nella fase di pre-coltivazione della specie *Quercus suber* L., al posto della lampada fluorescente, in ambiente controllato con substrato di coltura Jiffy e DAFNE.

In particolare, il loro utilizzo stimolerebbe il contenuto di pigmenti fotosintetici e stimolerebbe le piante a assimilare e organizzare l'azoto per la sintesi di amminoacidi.

Tra quelli analizzati, lo spettro AP67-Arch si è confermato essere lo spettro ottimale, e quindi una valida alternativa alla tradizionale lampada fluorescente, per la crescita della sughera, sia in terreno Jiffy che DAFNE, in quanto ha stimolato l'attività degli enzimi NR e GS, fondamentali per il metabolismo dell'azoto, e non ha indotto stress ossidativo riducendo quindi la produzione di ROS, che potrebbero apportare gravi danni alle membrane cellulari. Le lunghezze d'onda prodotte da questo spettro sarebbero quindi ben assorbite dalle plantule di sughera.

I risultati ottenuti relativi alla fase sperimentale del Prototipo, indicano che questa camera sperimentale potrebbe essere utilizzata per lo sviluppo della specie forestale *Quercus suber* L., in substrato Jiffy, in quanto ha stimolato la biosintesi di pigmenti fotosintetici e l'attività del primo enzima della catena di assorbimento dell'azoto.

Inoltre, il Prototipo non ha aumentato il contenuto di MDA rispetto a una camera di crescita comune, sia negli esperimenti con terreno Jiffy che DAFNE, salvaguardando le piante dai danni derivati dalla produzione di ROS.

Sarebbero necessarie ulteriori ricerche a riguardo per stabilire con esattezza i meccanismi coinvolti nelle risposte delle piante alla coltivazione nel Prototipo, dato che questo lavoro rappresenta il primo studio che riguarda l'effetto del Prototipo, dotato di lampade LED, sullo sviluppo di piantine forestali in terreno Jiffy e DAFNE.

Tuttavia, il Prototipo potrebbe essere utilizzato per la coltivazione della specie *Quercus suber* L., permettendo di ottenere una produzione su larga scala di materiale forestale impiegando minor risorse energetiche.

5. Conclusioni

Il futuro delle foreste di tutto il mondo è messo a repentaglio a causa dell'uso indiscriminato del territorio, con una perdita di terreno forestale di circa 13 milioni di ettari all'anno, e dei cambiamenti climatici repentini, in particolare l'aumento della temperatura. Queste condizioni ambientali potrebbero influenzare la distribuzione e la crescita di importanti specie arboree influenzando i servizi forniti dalle foreste all'uomo (Lindner *et al.* 2010).

La vivaistica forestale ha come scopo principale la produzione di piantine forestali da utilizzare negli imboschimenti protettivi e produttivi al fine di ridurre la pressione antropica sulle foreste naturali preservandone la biodiversità. Quindi la vivaistica forestale svolge un ruolo fondamentale nel sostenere il ripristino delle foreste, in quanto aumenta la possibilità di recuperare l'ecosistema naturale tramite la rinnovazione artificiale di specie forestali autoctone rispetto alla loro colonizzazione spontanea o alla semina diretta (Willoughby *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2011).

Un metodo per ottenere materiale forestale su larga scala, più rapidamente e con minor uso di risorse è quello di utilizzare camere di crescita durante le prime fasi di vita della pianta (pre-coltivazione), dove è possibile controllare temperatura, umidità e intensità luminosa in modo da soddisfare le esigenze di crescita delle piante.

Generalmente, nelle camere di crescita sono utilizzate fonti di luce tradizionali, come la luce fluorescente, ma recentemente, diodi ad emissione luminosa (LED) sono stati introdotti come alternativa luminosa grazie al fatto di presentare diversi vantaggi: sono meno ingombranti, hanno una maggior durata, producono una minor dispersione di calore e consentono di ottenere un risparmio energetico fino all'80% (Yeh e Chung, 2009).

Alla luce di quanto detto, appare quindi ragionevole supporre che l'illuminazione LED potrebbe essere una fonte di luce alternativa per la crescita nella fase di pre-coltivazione di specie forestali in ambiente controllato.

In questo studio sono stati presi in esame alcuni aspetti della relazione tra il tipo di radiazione luminosa, prodotta da lampade LED o fluorescente, e la crescita e lo

Conclusioni

sviluppo di tre specie forestali tipiche dell'area mediterranea (faggio, leccio e sughera), utilizzando due substrati di crescita (Jiffy e DAFNE), al fine di evidenziare i meccanismi metabolici potenzialmente coinvolti nella risposta alle diverse condizioni di illuminazione.

I dati relativi alle fasi sperimentali nelle camere di crescita variano a seconda della specie considerata e del tipo di terreno utilizzato per la semina.

In generale, la pre-coltivazione con le lampade LED ha determinato nel faggio una diminuzione dei pigmenti fotosintetici, ma allo stesso tempo ha stimolato l'assorbimento dell'azoto da parte degli enzimi NR e GS. Inoltre, questa nuova tecnologia, non ha aumentato, rispetto a una lampada tradizionale, il contenuto di MDA riducendo il rischio di danno cellulare alle membrane plasmatiche.

L'illuminazione a LED ha dato risultati soddisfacenti anche per quanto riguarda la pre-coltivazione delle querce.

In particolare, nelle piante di leccio sono stati ottenuti buoni risultati con gli spettri NS2 e AP67-Arch, per le semine nel terreno Jiffy e DAFNE rispettivamente. Inoltre, questi spettri non hanno avuto effetti sul contenuto di MDA rispetto al controllo, indicando quindi di non indurre stress fotossidativo. Oltre a ciò, gli spettri AP67-Arch e NS2 confermano la loro efficacia nello stimolare l'attività enzimatica della NR, come dimostrato negli esperimenti eseguiti sulle piante di leccio coltivate con terreno Jiffy e con terreno DAFNE.

Lo spettro AP67-Arch sembrerebbe essere il migliore anche per la sughera in quanto ha stimolato l'attività degli enzimi NR e GS, fondamentali per il metabolismo dell'azoto, e non ha indotto stress ossidativo riducendo quindi la produzione di ROS, che potrebbero apportare gravi danni alle membrane cellulari. Le lunghezze d'onda prodotte da questo spettro sarebbero quindi ben assorbite dalle plantule di sughera.

Con il successivo passaggio in serra, le piantine di leccio, allevate con le luci LED e fluorescenti, hanno mostrato un comportamento simile in ambiente naturale. Inoltre, la pre-coltivazione con i LED non ha determinato uno stress ossidativo, dopo il trasferimento in serra, rispetto alle piante controllo, riducendo il danno derivato dalla perossidazione lipidica.

Le piante di faggio e leccio pre-coltivate con gli spettri LED, dopo il trapianto in piena terra hanno dimostrato una buona ripresa vegetativa, nonostante il minor

Conclusioni

contenuto di pigmenti fotosintetici rispetto al controllo, suggerendo quindi che le condizioni adottate durante le fasi sperimentali precedenti sono state idonee.

Questo lavoro rappresenta il primo studio che prende in considerazione lo sviluppo di specie forestali in camere di crescita e in presenza di luci LED con l'intento di iniziare a comprendere le complesse interazioni che si stabiliscono tra la luce e la piantina forestale in ambiente artificiale nonché l'eventuale perdurare della loro influenza nel successivo passaggio in campo. Nonostante siano necessari ulteriori indagini riguardo le fasi sperimentali in serra e in pieno campo, si può affermare che le lampade LED hanno mostrato la loro efficacia nel sostenere lo sviluppo delle piante in ambiente artificiale e quindi sono un'ottima alternativa alle lampade fluorescenti.

Una loro più diffusa applicazione consentirebbe di ridurre notevolmente i costi energetici nella fase di pre-coltivazione grazie alle loro particolari caratteristiche legate soprattutto al basso consumo energetico, ad un alto numero di ore di funzionamento e ad una bassa emissione di calore.

Inoltre, questo lavoro di tesi è il primo studio che prende in considerazione l'effetto determinato da una camera di crescita sperimentale (Prototipo) caratterizzata da 10 ripiani in continuo movimento esposti all'illuminazione prodotta da tre lampade LED AP67.

In generale, il Prototipo stimola la biosintesi di pigmenti fotosintetici nelle tre specie analizzate e non induce stress fotossidativo, diminuendo il rischio di danno derivato dalla perossidazione lipidica.

La buona qualità del materiale forestale ottenuto dal Prototipo lascia supporre che l'utilizzo di questa camera sperimentale potrebbe garantire una produzione continua di un alto numero di piantine forestali in condizioni climatiche uniformi, un considerevole risparmio di spazio e un ridotto consumo energetico. Inoltre, consentirebbe di sviluppare protocolli standard di crescita per la produzione certificata del materiale pre-coltivato per la rigenerazione forestale, in particolare, e per la produzione vivaistica in generale (Ortolani *et al.*, 2014).

6. Bibliografia

- 1) Alessa L., Chapin F.S. (2008). Anthropogenic biomes: a key contribution to earth-system science. *Trends Ecol. Evol.*, 23: 529-531;
- 2) Ali A., Sivakami S., Raghuram N. (2007). Effect of Nitrate, Nitrite, Ammonium, Glutamate, Glutamine and 2-oxoglutarate on the RAN Levels and Enzyme Activities of Nitrate Reductase and Nitrite Reductase in Rice. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 13(1): 17- 25;
- 3) Ali M.B., Hahn E.J., Paek K.Y. (2005). Effects of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micropropagated Phalaenopsis plantlet. *Environ.Exp. Bot.*, 54: 109-120;
- 4) Allen C.D., Macalady A.K., Chenchouini, H., Bachelet A.D., McDowell N., Vennetier M., Kitzberger T., Rigling A., Breshears D. D., Hogg E.H., Gonzalez P., Fensham R., Zhang Z., Castron J., Demidov N., Limp J.-H., Allard G., Running S.W., Semerci A., Cobb N. (2010): A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecol. Manag.*, 259: 660-684;
- 5) Allen R.D. (1995). Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants. *Plant Physiol.*, 107: 1049-1054;
- 6) Anderegg, W.R.L., Berry, J.A., Smith, D.D., Sperry, J.S., Anderegg, L.D.L., Field, C.B., 2012. The roles of hydraulic and carbon stress in a widespread climate-induced forest die-off. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109: 233-237;
- 7) Anjum N.A., Sofo A., Scopa A., Roychoudhury A., Gill S.S., Iqbal M., Lukatkin A.S., Pereira E., uarte A.C., Ahmad I. (2015). Lipids and proteins-major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22: 4099-4121. DOI 10.1007/s11356-014-3917-1
- 8) APAT. Biodiversità e vivaistica forestale. Manuali e linee guida 18/2003

Bibliografia

- 9) Ariz I., Esteban R., García-Plazaola J.I., Becerril J.M., Aparicio-Tejo P.M., Moran J.F. (2010). High irradiance induces photoprotective mechanisms and a positive effect on NH_4^+ stress in *Pisum sativum* L.. *J. Plant. Physiol.*, 167:1038-1045;
- 10) 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): 31-38;
- 11) Astolfi S., Zuchi S. (2012). Adequate S supply protects barley plants from adverse effects of salinity stress by increasing thiol contents. *Acta Physiol. Plant.* (in press) DOI: 10.1007/s11738-012-1060-5
- 12) 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;
- 13) Ayala-Astorga G.I., Alcaraz-Meléndez L. (2010). Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments, and proline in *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann & Hemsley) grown in vitro. *Electron. J. Biotechnol.* DOI: 10.2225/vol13-issue5-fulltext-13
- 14) 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,
- 15) Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Côme D. (1996). Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seed as related to deterioration during accelerated aging. *Physiol. Plant.*, 97: 104-110;
- 16) Barbero M., Loisel R., Quzel P. (1992). Biogeography, ecology and history of Mediterranean *Quercus ilex* ecosystems. *Vegetatio* 99–100: 19-34;
- 17) Bellarosa R., Ciccarese L., Dini-Papanastasi O., Ferreira R., Kostopoulou P., Mattsson A. (2007). Pre-Forest: A new European technology for cost efficient and environmental friendly production of pre-cultivated forest regeneration material. IUFRO Tree Biotechnology, Ponta Delgada, Azores, June 3-8 2007 (Abstract);

Bibliografia

- 18) Bindi D., Luzi L., Pacor F., Franceshina G., Castro R.R. (2006). Ground-motion predictions from empirical attenuation relationships versus recorded data: The case of the 1997-1998 Umbria-Marche, central Italy, strong-motion data set. *B. Seismol. Soc. Am.*, 96(3): 984-1002;
- 19) Blaauw O., Blaauw-Jansen G. (1970). The phototropic responses of *Avena* coleoptiles. *Acta Botan. Neer.*, 19: 755-763;
- 20) Boardman N.K. (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 28: 355-377;
- 21) Bourget C.M. (2008). An introduction to light-emitting diodes. *HortScience* 43: 1944-1946;
- 22) 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;
- 23) Briggs W.R., Beck C.F., Cashmore A.R., Christie J.M., Hughes J. (2001). The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell.*, 13: 993-997;
- 24) Brown C.S., Schuerger A.C., Sager J.C.. (1995). Growth and photomorphogenesis of pepper plants grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red illumination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120: 808- 813;
- 25) Bubenheim D.L., Bugbee B., Salisbury F.B. (1988). Radiation in controlled environments: Influence of lamp type and filter material. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113: 468-474;
- 26) Bugalho M.N., Caldeira M.C., Pereira J.S., Aronson J., Pausas J.G. (2011). Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Front. Ecol. Environ.*, 9: 278-286;
- 27) Bula R.J., Morrow R.C., Tibbitts T.W., Barta D.J., Ignatius R.W., Martin T.S. (1991). Lightemitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience* 26: 203-205;
- 28) Butchart S.H.M., Walpole M., Collen B. (2010). Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science* 328: 1164-1168;
- 29) Calvo E. (1996). L'approvvigionamento del materiale vegetale per il recupero ambientale. *Sherwood*, 16: 35-39;

Bibliografia

- 30) 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;
- 31) Candan N., Tarhan L. (2003). Changes in Chlorophyll-Carotenoid Contents, Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation Levels in Zn-Stressed *Mentha pulegiu*. *Turk. J. Chem.*, 27: 21-30;
- 32) Candan N., Tarhan L. (2009). Alterations of the antioxidative enzyme activities, lipid peroxidation levels, chlorophyll and carotenoid contents along the peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves exposed to copper deficiency and excess stress conditions. *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 83: 103-109;
- 33) 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;
- 34) Chen M., Chory J., Fankhauser C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.*, 38: 87-117;
- 35) Cheng C.L., Acedo G.N., Cristins M., Conkling M.A. (1992). Sucrose mimic the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1861-1864;
- 36) Ciais P., Reichstein M., Viovy N., Granier A., Ogee J., Allard V., Aubinet M., Buchmann N., Bernhofer C., Carrara A., Chevallier F., De Noblet N., Friend A.D., Friedlingstein P., Grunwald T., Heinesch B., Keronen P., Knohl A., Krinner G., Loustau D., Manca G., Matteucci G., Miglietta F., Ourcival J.M., Papale D., Pilegaard K., Rambal S., Seufert G., Soussana J.F., Sanz M.J., Schulze E.D., Vesala T., Valentini R. (2005). Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, 437: 529-533;
- 37) Ciancio O. (1997). Strategie per la conservazione della biodiversità: il ruolo della vivaistica forestale. In: Atti della giornata di studio "Vivaistica forestale e conservazione della biodiversità", Palermo, 16 dicembre 1996, Regione Siciliana, Assessorato Regionale Agricoltura e Foreste, Collana Sicilia Foreste, 1: 29-38;
- 38) Ciccacese L., Luci S., Mattsson A. (2005). Nursery production and stand establishment of broadleaves to promote sustainable forest management. APAT, Dalarna University (IUFRO Group S3.02.00, pp. 171-178);

Bibliografia

- 39) Clough T.J., Condon L.M., Kammann C., Müller C. (2013). A Review of Biochar and Soil Nitrogen Dynamics. *Agronomy*, 3(2): 275-293 DOI 10.3390/agronomy3020275
- 40) Cole R.J., Holla K.D., Keene C.L., Zahawi R.A. (2011). Direct seeding of late-successional trees to restore tropical montane forest. *Forest Ecol.Manag.*, 261: 1590-1597;
- 41) Colombo S.J. (2004). How to Improve the Quality of Broadleaved Seedlings Produced in Tree Nurseries. In Nursery production and stand establishment of broadleaves to promote sustainable forest management. Proceeding of the IUFRO Conference (groups S3.02.00; S3.02.03 and S3.02.01), Rome, Italy, May 7-10, 2001.
- 42) 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.
- 43) Cosgrove, D.J. (1981). Rapid suppression of growth by blue light. *Plant Physiol.*, 67: 584-590;
- 44) Costanza R., D'Arge R., De Groot R.S., Farber S., Grasso M., Hannon B. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387: 253-260;
- 45) Cren M., Hirel B. (1999). Glutamine Synthetase in Higher Plants: Regulation of Gene and Protein Expression from the Organ to the Cell. *Plant CellPhysiol.*, 40 (12): 1187-1193;
- 46) Croxdale J., Cook M., Tibbitts T.W., Brown C.S., Wheeler R.M.. (1997). Structure of potato tubers formed during spaceflight. *J. Expt. Bot.*, 48: 2037-2043;
- 47) D.P.R. 24 luglio 1977, n. 616. Attuazione della delega di cui all'art. 1 della Legge 22 luglio 1975, n. 382. G.U. (S.O.), del 29 agosto 1977, n. 234;
- 48) Daily G.C. (1997). Nature's services. Island Press, Covelo California;
- 49) Dasmann R. F. (1968). Different Kind of Country. Macmillan, New York; Collier-Macmillan, London;

Bibliografia

- 50) Delzon S., Urli M., Jean-Charles Samalens, Lamy J.B., Lischke H., Sin F., Zimmermann N.E., Porté A.J. (2013). Field Evidence of Colonisation by Holm Oak, at the Northern Margin of Its Distribution Range, during the Anthropocene Period. *PLoS ONE* 8(11): e80443. DOI: 10.1371/journal.pone.0080443
- 51) Di Filippo A., Piovesan G., Schirone B. (2004). Le foreste vetuste: criteri per l'identificazione e la gestione. 14th Meeting of the Italian Society of Ecology, 4-6 October 2004, Siena;
- 52) Dias M.C., Pinto G., Santos C. (2011). Acclimatization of micropropagated plantlets induces an antioxidative burst: a case study with *Ulmus minor* Mill. *Photosynthetica*, 49(2): 259-266. DOI 10.1007/s11240-007-9317-1
- 53) Díaz S., Fargione J., Chapin F.S., Tilman D. (2006). Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS Biology* 4: e277. DOI 10.1007/s11676-012-0235-7
- 54) Dougher T., Bugbee B. (2004). Long-term blue light effects on the histology of lettuce and soybean leaves and stems. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 129: 467-472;
- 55) Du D., Bramlage W.J. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J. Agric. Food. Chem.*, 40: 1566-1570;
- 56) Duryea M.L. (1985). Evaluating seedling quality: importance to reforestation. In: Duryea M.L. (ed.), *Evaluating Seedling Quality: Principles, Procedures, and Predictive Abilities of Major Tests. For. Res. Lab.*, Oregon State Univ., Corvallis, OR: 1-6.
- 57) EEA (2006). European forest types. Categories and types for sustainable forest management reporting and policy. EEA Technical report No 9/2006. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2006;
- 58) EEA (2008). European forests ecosystem conditions and sustainable use. Report No 3/2008. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2008;
- 59) Evans J.R. (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia*, 78: 9-19;
- 60) 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;

Bibliografia

- 61) FAO (2010). Global forest resources assessment 2010. Rome: UNFAO;
- 62) Figueroa F.L. (1993). Photoregulation of nitrogen metabolism and protein accumulation in the red alga *Corallina elongata* Ellis et Soland. *Z. Naturforschung C.*, 48: 788-794;
- 63) 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;
- 64) Forde B.G. (2002). Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 203-224;
- 65) Frelich L.E., Reich P.B. (2003). Perspectives on development of definitions and values related to old-growth forests. *Environ. Rev.*, 11: 9-22;
- 66) Gardiner B.A., Blennow K., Carnus J.M., Fleischer P., Ingermarson F., Landmann G., Lindner M., 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;
- 67) Gellini R. and Grossoni P. (1997a). Botanica Forestale. II Angiosperme. Edizione Cedam Milano: 68-78;
- 68) Gellini R. and Grossoni P. (1997b). Botanica Forestale. II Angiosperme. Edizione Cedam Milano: 142-147;
- 69) Gellini R. and Grossoni P. (1997c). Botanica Forestale. II Angiosperme. Edizione Cedam Milano: 135-139;
- 70) Giordano E. (1997). Una proposta di valorizzazione delle risorse genetiche forestali in applicazione delle raccomandazioni dell'Unione Europea. In: Atti della giornata di studio "Vivaistica forestale e conservazione della biodiversità", Palermo, 16 dicembre 1996, Regione Siciliana, Assessorato Regionale Agricoltura e Foreste, Collana Sicilia Foreste, 1: 22-28;
- 71) Gratani L. (1995). Structural and ecophysiological plasticity of some evergreen species of the Mediterranean maquis in response to climate. *Photosynthetica*, 31: 335-343;
- 72) Gratani L., Bombelli A. (2001). Forecasted stability of Mediterranean evergreen species considering global changes. In: Visconti G, Beniston M, Iannorelli ED,

Bibliografia

- Barba D (eds) Global change and protected areas. Kluwer Academic, Dordrecht, 245-252;
- 73) Gratani L., Meneghini M., Pesoli P., Crescente M.F. (2003). Structural and functional plasticity of *Quercus ilex* seedlings of different provenances in Italy. *Trees*, 17: 515-521;
- 74) Gratani L., Pesoli P., Crescente M.F., Aichner K., Larcher W. (2000) Photosynthesis as a temperature indicator in *Quercus ilex* L.. *Glob. Planet. Change.*, 24: 153-163;
- 75) Gratani L., Tisi F., Crescente M.F., Pesoli P., Larcher W. (1996). Phenology, leaf morphology and trends in CO₂ uptake of *Quercus ilex* L. in the climax area and at its northern distribution limit in Italy. *Arch. Geobot.*, 2: 13-18;
- 76) Grossnickle S.C. (2005). Importance of root growth in overcoming planting stress. *New For.*, 30: 273- 294;
- 77) Harmer R., Kerr G. (1995). Creating woodlands: to plant trees or not? In: Ferris-Kaan, R. (Ed.), *The Ecology of Woodland Creation*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 113-128;
- 78) Heynes R.J., Goh K.M. (1978). Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol. Rev.*, 53: 465-510;
- 79) Hoenecke M.E., Bula R.J., Tibbits T.W. (1992). Importance of blue photon levels for lettuce seedlings grown under red-lightemitting diodes. *HortScience* 27: 427-430;
- 80) Holmlund C.M., Hammer M. (1999). Ecosystem services generated by fish populations. *Ecol.Econ.*, 29: 253-268;
- 81) Hopkins W.G., Huner N.P.A. (2004). *Introduction to plant physiology*. 3rd Ed. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ.
- 82) Huang W.D., Wu L.K., Zhan J.C. (2002). Effect of weak light on the peroxidation of membrane-lipid of cherry leaves. *Acta Bot. Sin.*, 44: 920-924;
- 83) Iakovoglou V., Radoglou K., Kostopoulou P., and Dini-Papanastasi O. (2012). Effects of “short” photoperiods on seedling growth of *Pinus brutia*. *J. Environ. Biol.*, 33: 149-154;
- 84) Ilieva I., Ivanova T., Naydenov Y., Dandolov I., Stefanov D. (2010). Plant experiments with light-emitting diode module in Svet space greenhouse. *Adv. Space Res.* 46: 840-845;

Bibliografia

- 85) IPCC (2007a). Climate Change 2007: The Physical Science Basis. (eds.) Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K., Tignor M.M.B., Miller H.L., Working Group 1 Contribution to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Technical Summary and Chapter 10 (Global Climate Projections);
- 86) IPCC (2007b). Climate Change 2007: Mitigation. Eds. Metz B., Davidson O.R., Bosch P.R., Dave R., Meyer L.A., Working Group III contribution to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), Technical Summary, chapters 3 (Issues related to mitigation in the long term context) and 11 (Mitigation from a cross sectoral perspective);
- 87) ISTA, 2004. International rules for seed testing. Editin 2004. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland;
- 88) Izzo R., Quartacci M. (2010). Nutrizione azotata dei vegetali. Riduzione dell'inquinamento delle acque dai nitrati provenienti dall'agricoltura, Felici Editore: 191-209.
- 89) 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;
- 90) Jones H. (2006). Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.*, 49: 387- 398;
- 91) Joshi P.K., Rawat A., Narula S., Sinha V. (2012). Assessing impact of climate change on forest cover type shifts in Western Himalayan Eco-region. *J.Forest. Res.*, 23(1): 75-80;
- 92) Kasajima S., Inoue N., Mahmud R., Kato M. (2008). Developmental responses of wheat cv. Norin 61 to fluence rate of green light. *Plant Prod. Sci.*, 11: 76-81,
- 93) Kim H.H., Goins G.D., Wheeler R.M., Sager J.C. (2004a). A comparison of growth and photosynthetic characteristics of lettuce grown under red and blue light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental green LEDs. *Acta Hort.*, 659: 467-475;
- 94) Kim H.H., Goins G.D., Wheeler R.M., Sager J.C. (2004b). Green-light supplementation for enhanced lettuce growth under red- and bluelight- emitting diodes. *HortScience* 39: 1617-1622;

Bibliografia

- 95) Kim H.H., Wheeler R.M., Sager J.C., Yorio N.C., Goins G.D. (2005). Light-emitting diodes as an illumination source for plants: A review of research at Kennedy Space Center. *Habitation (Elmsford)*, 10: 71-78;
- 96) Kopsell D.A., Kopsell D.E. (2008). Genetic and environmental factors affecting plant lutein/zeaxanthin. *Agro Food Ind. Hi-Tech.*, 19: 44-46;
- 97) Kostopoulou P, Radoglou K, Dini-Papanastasi O, Spyroglou G (2010). Enhancing planting stock quality of Italian cypress (*Cupressus sempervirens* L.) by pre-cultivation in mini-plugs. *Ecol. Engin.*, 36: 912-919;
- 98) Krapp A., Truong H.N. (2005). Regulation of C/N interaction in model plant species. *J. Crop. Improv.*, 15: 127-173;
- 99) Kremen C. (2005). Managing ecosystem services: What do we need to know about their ecology? *Ecol. Lett.*, 8: 468-479;
- 100) La Strategia Nazionale per la Biodiversità. Ministero dell'Ambiente e della tutela del territorio e del mare. 2010.
- 101) Lavecchia A., Pietramellara G. (2012). Rilevanza dello studio degli ecosistemi forestali per dare risposta alle sfide ambientali del terzo millennio. *Ital. J. Forest. Mt. Environ.*, 67 (4): 363-370;
- 102) 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;
- 103) Lee S.H., Tewari R.K., Hahn E.J., Pack K.Y. (2007). Photon flux and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.*, 90: 141-151;
- 104) Lefsrud M.G., Kopsell D.A., Sams C.E. (2008). Irradiance from distinct wavelength light-emitting diodes affect secondary metabolites in kale. *HortScience* 43: 2243-2244;
- 105) 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;

Bibliografia

- 106) Li H., Tang C., Xu Z., Liu X., Han X. (2012). Effects of Different Light Sources on the Growth of Non-heading Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L.). *J. Agr. Sci.*, 4: 262-273;
- 107) Li Q., Kubota C. (2009). Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environ. Exp. Bot.*, 67: 59-64,
- 108) Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Döll M., Fietz H.J., Bach T., Kozel U., Meier D., Rahmsdorf U. (1981). Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth. Res.*, 2: 115-141;
- 109) 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;
- 110) Lillo C. (1984). Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine syntetase, glitamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiol. Plant.*, 61: 214-218;
- 111) Lillo C. (1994). Light regulation nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.*, 90: 616-620;
- 112) 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 (eds. Amancio S, and Stulen I) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht; 149- 184;
- 113) Lillo C. (2008). Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochem. J.*, 415: 11-19;
- 114) 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.
- 115) Liu X.Y., Guo S.R., Xu Z.G., Jiao X.L., Takafumi T. (2011). Regulation of chloroplast ultrastructure cross-section anatomy of leaves and morphology of stomata of cherry tomato by different light irradiations of light-emitting diodes. *HortScience*, 46: 1-5;

Bibliografia

- 116) MA: Millennium Ecosystem Assessment. Ecosystems and Human Well-being. Synthesis. Washington, DC: Island Press; 2005;
- 117) 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;
- 118) Marianello C., Astolfi S., Bellarosa R. (2013). Valutazione della capacità di ripresa vegetativa di plantule pre-coltivate di leccio (*Quercus ilex* L.) sottoposte al trattamento di conservazione al freddo. In: Società Italiana di Chimica Agraria (SICA) XXXI Convegno Nazionale. Napoli 16-17 settembre 2013;
- 119) Marianello C., Bellarosa R., Astolfi S. (2012). Studio preliminare dell'effetto di luci a LED sulla crescita di piante forestali. In: Società Italiana di Chimica Agraria (SICA) Atti del XXX Convegno Nazionale. Milano, 18-19 settembre 2012;
- 120) Marianello C., Bellarosa R., Astolfi S. (2014). Studio dell'effetto della luce rossa prodotta da lampade LED sulla crescita di tre specie forestali (leccio, sughera e faggio). In: Società Italiana di Chimica Agraria (SICA) Atti del XXXII Convegno Nazionale. Bolzano, 7-9 settembre 2014;
- 121) Marianello C., Ortolani M.R., Astolfi S., Bellarosa R. (2013). Effects of LEDs on growth and metabolic activity of *Fagus Sylvatica* L., *Quercus suber* L., *Quercus ilex* L. and *Myrtus communis* L.. In: International Symposium Sustainable production of forest regeneration materials for protection against climate change "REGEN-FOREST". Viterbo, 16 dicembre 2013;
- 122) Marnett L.J. (1999). Lipid peroxidation DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.*, 424: 83-95;
- 123) 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;
- 124) Marschner H. (1995). Mineral Nutrition in Higher Plants, 2nd edn. London, UK: Academic Press Ltd;
- 125) Masia A. (2003). Physiological effects of oxidative stress in relation to ethylene in postharvest produce, p. 165-197. In: Hodges DM (Eds.). Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops. Food Products Press, New York;

Bibliografia

- 126) Massa G.D., Kim H.H., Wheeler R.M., Mitchell C.A. (2008). Plant productivity in response to LED lighting. *HortScience*, 43: 1951-1956,
- 127) 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;
- 128) Mattsson A. (1997). Predicting field performance using plant quality assessment. *New For.*, 13: 227-252;
- 129) 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;
- 130) McNally S.F., Hirel B., Gadal P., Mann A.F., Stewart G.R. (1983). Glutamine synthetases of higher plants. *Plant Physiol.*, 72: 22-25;
- 131) MCPFE (2007). State of Europe's Forests 2007. Jointly prepared by the MCPFE Liaison Unit Warsaw, UNECE and FAO. 247 p. Warsaw;
- 132) 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;
- 133) Mezzalana G. (1995). Riforma della P.A.C. e difesa degli ecotipi locali della flora legnosa indigena. *Sherwood*, 4: 8-11;
- 134) Mezzalana G. (1998). La vivaistica italiana alle soglie del duemila: evoluzione, problemi, prospettive. In: Atti del "Secondo Congresso Nazionale di Selvicoltura", Venezia, 24-27 Giugno 1998, Consulta Nazionale per le Foreste ed il Legno-Direzione generale per le risorse forestali, montane ed idriche; Accademia Italiana di Scienze Forestali, Vol II: 469-492;
- 135) Miyashita Y., Kimura T., Kitaya Y., Kubota C., Kozai T. (1997). Effect of red light on the growth and morphology of potato plantlets in vitro: using light emitting diodes (LEDs) as a light source for micropropagation. *Acta Horti.*, 418: 169-173;
- 136) Mizuno T., Amaki W. And Watanabe H. (2011). Effects of monochromatic light irradiation by LED on the growth and anthocyanin contents in leaves of cabbage seedlings. *Acta Horti.*, 907: 179-184;
- 137) Mohammed G.H., McLeod G.R., Menes P.A., Timmer V.R. (2001). A comparison of bareroot and container stock. In: R.G. Wagner and S.J. Columbo

Bibliografia

- (eds.). Regenerating the Canadian forest: principles and practices for Ontario. pp. 343–348. Fitzhenry & Whiteside, Markham, ON. 650 p.
- 138) Mooney H., Larigauderie A., Cesario M., Elmquist T., Hoegh-Guldberg O., Lavorel S., Mace G.M., Palmer M., Scholes R., Yahara T. (2009) Biodiversity, climate change, and ecosystem services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 1: 46-54. DOI 10.1016/j.cosust.2009.07.006
- 139) Morrow R.C. (2008). LED lighting in horticulture. *HortScience*, 43: 1947-1950;
- 140) Morrow R.C., Duffie N.A., Tibbitts T.W., Bula R.J., Barta D.J., Ming D.W., Wheeler R.M., Porterfield D.M. (1995). Plant Response in the ASTROCULTURE Flight Experiment Unit, SAE Technical Paper Series No. 951624, presented at 25th International Conference on Environmental Systems, San Diego, CA, July 10-13, 1995;
- 141) Moshe R., Dalia E. (2007). On the effect of light on shoot regeneration in petunia. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 89: 49-54;
- 142) Navarro R.M., Retamosa M.J., Lopez J., Del Campo A., Ceaceros C., Salmoral L. (2006). Nursery practices and field performance for the endangered Mediterranean species *Abies pinsapo* Boiss. *Eco. Eng.*, 27: 93-99;
- 143) Niinemets Ü. (2010). Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: past stress history stress interactions tolerance and acclimation. *Forest Ecol. Manage.*, 260: 1623-1639;
- 144) Norbya R.J., Warrena J.M., Iversena C.M., Medlynb B.E., McMurtriec R.E. (2010). CO₂ enhancement of forest productivity constrained by limited nitrogen availability. DOI 10.1073/pnas.1006463107
- 145) 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;
- 146) 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;
- 147) 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;

Bibliografia

- 148) Perez-Balibrea S., Moreno D.A., Garcia-Viguera C. (2008). Influence of light on healthpromoting phytochemicals of broccoli sprouts. *J. Sci. Food Agric.*, 88, 904–910;
- 149) Queiroz C.G.S., Alonso A., Mares-Guia M., Magalhaes A.C. (1998). Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biol. Plant*, 41: 403–413;
- 150) Radoglou K., Kostopoulou P., Raftoyannis Y., Dini-Papanastasi O. and Spyroglou G. (2011). The physiological and morphological quality of *Pinus brutia* container seedlings produced from mini-plug transplants. *Plant Biosystems*, 145: 216-223. DOI: 10.1080/11263504.2010.547683
- 151) Rajasekar V.K., Gowrl G., Campbell W.H. (1988). Phytochrome-Mediated Light Regulation of Nitrate Reductase Expression in Squash Cotyledons. *Plant Physiol.*, 88: 242-244;
- 152) Ramalho J.C., Marques N.C., Semedo J.N., Matos M.C., Quartin V.L. (2002). Photosynthetic performance and pigment composition of leaves from two tropical species is determined by light quality. *Plant Biol.*, 4: 112–120;
- 153) Ray D. (2008): Impacts of Climate Change on Forests in Scotland. A preliminary synopsis of spatial modelling research. *Forestry Commission Research Note 101*. Edinburgh, Forestry Commission: 8
- 154) Richmond A. (2004). Handbook of microalgae culture: biotechnology and applied phycology. *Blackwell Science Ltd*, Oxford (UK).
- 155) Rosen, D. 1986. The role of taxonomy in effective biological control programs. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 15: 121-129;
- 156) Sabaté S., Sala A., Gracia C.A. (1999). Leaf traits and canopy organization. In: Rod F, Retana J, Gracia CA, Bellot J (eds) *Ecology of Mediterranean evergreen oak species*. Ecological studies 137. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 121–133;
- 157) Saebo A., Krekling T., Appelgren M. (1995). Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. *Plant Cell. Tiss. Org.*, 41:177-185;
- 158) Sager J.C., J.C. McFarlane (1997). Radiation, p. 1–29. In: Langhans, R.W. and T.W. Tibbitts (eds.). *Plant growth chamber handbook*. Iowa State Univ. Press: North

Bibliografia

- Central Region Research Publication No. 340, Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report no. 99, Ames, IA.
- 159) Sakakibara H., Kawabata S., Hase T., Sugiyama T. (1992) Differential effects of nitrate and light on the expression of glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Plant Cell. Physiol.*, 33: 1193-1198;
- 160) Sanchez J., Heldt H.W. (1990). On the regulation of spinach nitrate reductase. *Plant. Physiol.*, 92: 684-689;
- 161) Sasakawa H., Yamamoto Y. (1977). Influences of some internal and external conditions on the induction of nitrate reductase in rice seedlings. *Plant Cell. Physiol.*, 18: 207-214;
- 162) Schuerger A.C., Brown C.S. (1994). Spectral quality may be used to alter plant disease development in CELSS. *Adv. Space Res.*, 14: 395-398;
- 163) Schuerger A.C., Brown C.S., Stryjewski E.C. (1997). Anatomical Features of Pepper Plants (*Capsicum annuum* L.) Grown under Red Light-emitting Diodes Supplemented with Blue or Far-red Light. *Ann. Bot.*, 79: 273±282;
- 164) Schützendübel A., Polle A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.*, 53: 1351-1365;
- 165) Schwartz A., Zeiger E. (1984). Metabolic energy for stomatal opening: Roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta* 161: 129-136;
- 166) Senger H. (1982). The effect of blue light on plants and microorganisms. *Photochem. Photobiol.*, 35: 911-920;
- 167) Shin K.S., Mrthy H.N., Heo J.W., Hahn E.J., Paek K.Y. (2008). The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiol. Plant.*, 30: 339-343;
- 168) Siedow J.N. (1991). Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 42: 145-188;
- 169) Simonovic A.D., Andreson M.D. (2008). Light modulates activity and expression of glutamine synthetase isoform in maize seedling roots. *Arch. Biol. Sci.*, 60 (4), 649-660;
- 170) Smirnoff N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotech.*, 9: 214-219;

Bibliografia

- 171) Smith A.L. (1997). *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*, Oxford University Press, 1997.
- 172) Smith F.W., Cybinski D., Rae A.L. (1999). Regulation of expression of genes encoding phosphate transporters in barley roots, 145-150 p. In: Gissel-Nielsen G, Jensen A (Eds.). *Plant Nutrition - Molecular Biology and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 173) 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
- 174) Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A. (2004). Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Sci.*, 166: 293-302;
- 175) Stankovic B., Zhou W., Link B.M. (2002). Seed to seed growth of *Arabidopsis thaliana* on the International Space Station. SAE Technical Paper 2002-01-2284.
- 176) Stitt M., Krapp, A. (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular back-ground. *Plant Cell. Environ.*, 22: 583±621;
- 177) Stutte G.W., Edney S., Skerritt T. (2009). Photoregulation of bioprotectant content of red leaf lettuce with light-emitting diodes. *HortSci.*, 44: 79-82;
- 178) Suszka B., Muller C., Bonnet-Masimbert M. (1994): *Seeds of Forest Broadleaves from Harvest to Sowing*. Warszawa-Poznan, Wydawnictwo naukowe PWN: 299.
- 179) Suszka B., Muller C., Bonnet-Masimbert M., (2000). *Semi di latifoglie forestali, dalla semina alla raccolta*. INRA Calderini edagricole.
- 180) 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;
- 181) 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;

Bibliografia

- 182) Tennessen D.J., Singaas E.L., Sharkey T.D. (1994). Light-emitting diodes as a source for photosynthesis research. *Photosynth. Res.*, 39: 85-92;
- 183) Thuiller W. (2007). Climate change and the ecologist. *Nature* 448: 550-552. Nature Publishing;
- 184) Tischner R. (2001). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant Cell. Environ.*, 23: 1005-1024;
- 185) 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;
- 186) Tripathy B.C., Brown C.S. (1995). Root-shoot interaction in the greening of wheat seedlings grown under red light. *Plant Physiol.*, 107: 407-411;
- 187) Urbonaviciut A., Pinho P., Samuolien G., Duchovskis P., Vitta P., Stonkus A., Tamulaitis G. , Žukauskas A., Halonen L. (2007) , Effect of short-wavelength light on lettuce growth and nutritional quality. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture - Sodrininkyst_ Ir Daržininkyst*, vol. 26, pp. 157-165;
- 188) Valladares F., Martinez-Ferri E., Balaguer L., Perez-Corona E., Manrique E. (2000a). Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy? *New Phytol.*, 148: 79-91;
- 189) Valladares F., Wright S.J., Lasso E., Kitajima K., Pearcy W. (2000b). Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest. *Ecology*, 81: 1925-1936;
- 190) Vankus V. (1997). The Tetrazolium Estimated Viability Test for Seeds of Native Plants. In: LANDIS T.D., THOMPSON J.R. (eds.), National Proceedings Forest and Conservation Nursery Associations. Portland, OR: U.S. Departement of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station: 57-62;
- 191) Vincentz M., Moureaux T., Leydecker M. T., Vaucheret H., Caboche M. (1993). Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.*, 3, 315-324;
- 192) Wang F.X., Wang Z.Y., Leeb J.H.W. (2007). Acceleration of vegetation succession on eroded land by reforestation in a subtropical zone. *Ecol. Eng.*, 31: 232-241;

Bibliografia

- 193) Wang W., Vinocur B., Altman A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* (2003) 218: 1–14 DOI 10.1007/s00425-003-1105-5
- 194) Whisenant S. (1999) (ed): Repairing damaged ecosystems. - Cambridge University Press, New York;
- 195) Whitaker J.R. (1994). Principles of enzymology for the food sciences (second edition). *Marcel Dekker Inc*, 27, 579-589
- 196) 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): 810-818;
- 197) Williams A.P., Allen C.D., Millar C.I., Swetnam T.W., Michaelsen J., Still C.J., Leavitt, S.W. (2010). Forest responses to increasing aridity and warmth in the southwestern United States. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107: 21289–21294;
- 198) Willoughby I., Jinks R., Gosling P. and Kerr G. (2004). Creating new broadleaved woodland by direct seeding. Forestry Commission Practice Guide. Forestry Commission, Edinburgh. 1–32 pp.
- 199) Wilson B.C., Jacobs D.F. (2006). Quality assessment of temperate zone deciduous hardwood seedlings. *New For.*, 31: 417-433;
- 200) 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;
- 201) 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;
- 202) Xu Y., Sun X., Jin J., Zhou H. (2010). Protective effect of nitric oxide on lightinduced oxidative damage in leaves of tall fescue. *J. Plant Physiol.*, 167: 512-518;
- 203) Yamori W., Evans J.R., Von Caemmerer S. (2010). Effects of growth and measurement light intensities on temperature dependence of CO₂ assimilation rate in tobacco leaves. *Plant Cell. Environ.*, 33: 332-343;
- 204) Yanagi T., Okamoto K., Takita S. (1996). Effect of blue and red light intensity on photosynthetic rate of strawberry leaves. *Acta Hort.*, 440: 371-376;

Bibliografia

- 205) Yang Z.Q., Lil Y.X., Jiangl X.D., Zhu J., Zhang J.B. (2012). Effects of different red to far-red radiation ratios on the senescence of greenhouse chrysanthemum leaves. *Afr. J. Agr. Res.*, 7(12): 1919-1925. DOI: 10.5897/AJAR11.1548
- 206) Yeh N., Chung J.P. (2009). High-brightness LEDs-Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. *Renew Sust. Energ. Rev.*, 13: 2175-2180;
- 207) Yorio N.C., Goins G.D., Kagie H.R. (2001). Improving Spinach, Radish, and Lettuce Growth under Red Lightemitting Diodes (LEDs) with Blue Light Supplementation. *HortSci.*, 36(2):380–383;
- 208) Yorio N.C., Wheeler R.M., Goins G.D., Sanwo-Lewandowski M.M., Mackowiak C.L., Brown C.S., Sager J.C., Stutte G.W. (1998). Blue light requirements for crop plants used in bioregenerative life support systems. *Life Support Biosph. Sci.*, 5: 119-128;
- 209) Zhang X.L., Jia X.F., Yu B., Gao Y., Bai J.G. (2011). Exogenous hydrogen peroxide influences antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in cucumber leaves at low light. *Sci. Hortic.*, 129: 656-662;
- 210) Zhou W. (2005). Advanced Astroculture plant growth unit: Capabilities and performances. SAE Technical Paper 2005-01- 2840.
- 211) Zhu J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 247-273;
- 212) 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.

Bibliografia

Sitografia

www.minambiente.it/pagina/la-sfida-2011-2020-la-biodiversita

www.infc.it

<http://whc.unesco.org/en/list/1133>

<http://www.euforgen.org/distribution-maps/>

http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/biblioteca/protezione_natura/foreste_vetuste_it.pdf

Bibliografia

Abbreviazioni

APAT	Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici
B	Blue, luce blu
CBD	Convenzione per la Diversità Biologica
DPR	Decreto del Presidente della Repubblica
EEA	European Environmental Agency (Agenzia Ambientale Europea)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations - Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura
FR	Far-Red, luce rosso-lontano
G	Green, luce verde
GFS	Gestione Forestale Sostenibile
GOGAT	Glutammato Sintetasi
GS	Glutamina Sintetasi
INFC	Inventario Nazionale delle Foreste e dei Serbatoi forestali del Carbonio
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
ISTA	The International Seed Testing Association
LED	Light Emitting Diode
MA	Millennium Ecosystem Assessment
MCPFE	Conferenze Ministeriali sulla Protezione delle Foreste in Europa
MDA	Malondialdeide
NR	Nitrato Reduttasi
PES	Payments for Ecosystem Service
R	Red, luce rossa
R:FR	Rapporto luce rossa-rosso lontano
RB	Red-Blue, miscela di luce rossa-blu
ROS	Specie Reattive dell'Ossigeno

Bibliografia
