



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI

RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

BABY LEAF E INNOVAZIONE: BIOFORTIFICAZIONE CON MOLIBDENO E INTEGRAZIONE LUMINOSA CON LUCI LED

Relatore: Dott. Nicoletto Carlo

Correlatore: Dott. Andrea Giro

Laureanda

Federica Pretti

Matricola n. 1183602

ANNO ACCADEMICO 2018/2019

INDICE

RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUZIONE.....	9
1.1 La fortificazione.....	11
1.2 Il miglioramento genetico	12
1.3 L'ingegneria genetica	13
1.3.1 I minerali.....	14
1.3.2 Vitamine.....	15
1.3.3 Amminoacidi e acidi grassi.....	15
1.4 La biofortificazione.....	16
1.5 Il molibdeno.....	19
1.6 La radiazione luminosa e i led.....	20
1.7 Le baby leaf.....	24
2. SCOPO DEL LAVORO.....	27
3. MATERIALI E METODI.....	29
Contesto ambientale e trattamenti	29
Analisi morfo-ponderali	32
Analisi qualitative.....	36
4. RISULTATI	41
4.1 Parametri produttivi.....	41
4.2 Efficienza d'uso dell'acqua (WUE), pH, °Brix ed EC.....	43
4.3 Contenuto dei pigmenti fotosintetici	45
4.3 Contenuto delle molecole antiossidanti.....	47
4.4 Contenuto di Molibdeno, Magnesio e Zolfo.....	51
4.5 Colorazione	54
5. DISCUSSIONE	57
6. CONCLUSIONI	63
BIBLIOGRAFIA	65

RIASSUNTO

Da sempre le Organizzazioni Mondiali richiamano l'attenzione sulla malnutrizione e la fame nel mondo, enfatizzando la scarsa quantità delle risorse nutritive a disposizione delle popolazioni più povere. Recentemente sempre più studi stanno rivalutando l'importanza della qualità e del valore nutrizionale di queste risorse, poiché la loro scarsità in termini di contenuto di minerali, vitamine ed altri composti benefici determina, associata ad altri fattori, l'insorgenza di alcune patologie. La ricerca si è quindi concentrata nello sviluppare tecniche di fortificazione delle derrate alimentari allo scopo di sopperire alle carenze nutrizionali. L'arricchimento degli alimenti può avvenire tramite miglioramento genetico, ingegneria genetica e pratiche agronomiche che questo studio approfondirà applicate alla coltivazione di baby leaf in idroponia. Comunemente vengono trattate colture alla base della dieta, come ad esempio i cereali, incrementando il contenuto di ferro, iodio, zinco e vitamina A; questa tesi prevede l'arricchimento con molibdeno della Moutarde rouge metis, una varietà di Brassica rapa var. Japonica, (famiglia Brassicaceae).

A tal proposito sono state preparate tre soluzioni nutritive distinte: C, il controllo, esente dall'aggiunta del microelemento, A caratterizzata da una concentrazione di 0,1 mg Mo l⁻¹ e B avente una concentrazione di 1 mg Mo l⁻¹. La crescita, gli aspetti qualitativi, l'accumulo di molibdeno ed altri parametri sono stati valutati sia in condizioni di sola radiazione solare che con l'integrazione di luce al led blu, con lunghezza d'onda 480 nm ed intensità pari a 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lo studio è stato condotto in una serra tunnel sita a Legnaro (PD) da febbraio a maggio per un totale di tre cicli produttivi, ognuno caratterizzato dalle tre differenti tesi replicate tre volte; queste nove tesi a loro volta sono state duplicate al fine di valutare sia il testimone che le baby leaf soggette all'integrazione luminosa.

La maggior resa in termini di biomassa commerciale è stata ottenuta nel terzo ciclo al quale corrisponde però la minor percentuale di sostanza secca ed un minor accumulo di molecole antiossidanti, polifenoli e minerali; al contrario, il primo ciclo ha presentato il maggior accumulo di molecole antiossidanti, la miglior percentuale di sostanza secca e la miglior WUE.

Il secondo ciclo si contraddistingue invece dai precedenti per aver determinato una produzione media, caratterizzata però dal maggior accumulo di Mo, S e Mg. L'applicazione delle luci al led blu ha determinato una maggior sintesi di clorofille, carotenoidi ed una maggior produzione di biomassa commerciabile a discapito del contenuto di sostanza secca; l'integrazione luminosa ha determinato anche un minor accumulo di Mo, S e Mg senza inoltre influire sulla sintesi delle antocianine.

L'applicazione delle tre differenti concimazioni con molibdeno ne ha determinato un maggior accumulo nei tessuti, in misura però non proporzionale rispetto all'apporto maggiore nella soluzione nutritiva.

L'ultimo parametro analizzato riguarda la tonalità delle foglie, un carattere importante per la commercializzazione delle baby leaf: la diversa stagionalità ha influito sui valori di a^* e L , al contrario dell'integrazione della luce a led blu che ha condizionato i parametri L e b^* .

In ultima analisi, la combinazione del sistema idroponico con la tecnica agronomica della biofortificazione si rivela essere vincente, poiché permette con relativa semplicità di arricchire qualsiasi ortaggio ed è applicabile in contesti differenti, indipendentemente dai vincoli ambientali.

ABSTRACT

Fao and other organizations have been fighting to eliminate the hungry from the world but nowadays, they are interested in micronutrients and vitamins deficiencies too. There are a lot of people spread in the world that have different problems often increased by this malnutrition as, for example, anaemia and xerophthalmia. In order to limit these diseases, there are different staple crops successfully fortified as rice, grain, maize, cassava and other else whit vitamin A, iron, zinc, selenium etc. Crops could be biofortified in three main ways: genetic improvement, genetic engineering and agronomical practices and this last technique will be employee in this paper. Molybdenum is an essential micronutrient involved in the synthesis of four main enzymes in humans, so this metal was used in order to fortify baby leaf of Moutarde rouge metis, a variety of *Brassica rapa* var. *japonica* cultivated in a hydroponic system. This study was conducted in a greenhouse located in Legnaro, close to Padua (IT) when we did three production cycles from February to May. For each cycle there were three fertilization treatments: C), the control, without molybdenum added, A) with 0,1 mg Mo l⁻¹ and B) with 1 mg l⁻¹ and every thesis was replicated three times in order to collect enough data. Moreover, the effect of blue led light integration with a 480 nm wavelength and 30 μmol m⁻² s⁻¹ intensity was evaluated: so there were nine theses under blu led and nine theses just with sun radiation for every cycles. At the end of every cycle all the biomass was collected in order to quantify the yield and biomass was stored for quality analysis such as pigments, polyphenols, antioxidant substances, sugar content, EC, pH.

Molybdenum has been successfully accumulated in baby leaf tissues without compromising both quality and quantity parameters. The blue light integration induced a greater biomass and pigment production but on the other hand it determined a lower accumulation of micronutrients in the vegetative tissues.

1. INTRODUZIONE

Attualmente, in tutto il mondo, più di 2 miliardi di persone soffrono di carenze nutrizionali di microelementi, in particolare ferro, iodio, zinco e vitamina A (Daher 2001). Le maggiori ripercussioni di questi deficit si evidenziano nelle donne in stato di gravidanza e nei bambini in via di sviluppo, in quanto comportano notevoli disturbi della crescita. Le ripercussioni delle carenze nutrizionali compromettono, inoltre, le difese immunitarie verso alcuni tipi di malattie come HIV, malaria e tubercolosi poiché spesso sono responsabili di squilibri metabolici e debilitazioni fisiologiche (Initiative 2006).

Le carenze di microelementi possono essere determinate da un singolo nutriente o da più deficit paralleli e questa condizione si verifica particolarmente nei paesi in via di sviluppo, dove la qualità e la variabilità degli alimenti non è sufficiente a soddisfarne i diversi fabbisogni (Daher 2001). Per meglio comprendere l'importanza e la diffusione di questa problematica è sufficiente consultare i molteplici report delle associazioni presenti in tutto il mondo.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità la carenza di vitamina A, da patologia endemica presente in 39 Paesi nel 1987, si è diffusa fino a coinvolgerne 167 nel 2005 (Fig. 1) coinvolgendo circa 190 milioni di bambini e 19,1 milioni di donne in gravidanza (World Health Organization 2009). Il deficit di questa vitamina si converte in sintomi più o meno evidenti in funzione della gravità della carenza, il più specifico dei quali è la xeroftalmia (impossibilità dell'occhio di lacrimare) ritenuta la prima causa prevenibile per la cecità nei bambini (Sommer and West 1996). Secondo alcune ricerche, tra cui quella condotta da West et al., (2007), questa vitamina sembra essere anche coinvolta nella rimobilizzazione e nel trasporto del ferro nel corpo umano, di conseguenza una sua carenza favorisce l'insorgenza di anemia.

Negli ultimi anni la carenza di ferro ha destato particolare interesse in quanto si rivela essere il deficit maggiormente presente sia in termini di quantità (1,62 miliardi di persone ne soffrono) che di diffusione (Fig. 2); coinvolge indistintamente Paesi sviluppati e sottosviluppati (World Health Organization 2009), anche se la maggior importanza di carenza ferrica si registra nell'Africa subsahariana e in Asia (Kassebaum et al. 2015). La carenza ferrica viene considerata la principale causa dell'anemia sideropenica: uno studio eseguito da (Kassebaum et al. 2015), ha preso in esame dati riguardanti questa patologia in 187 Paesi e, dalla loro elaborazione, è emerso che le regioni con una maggior incidenza della carenza di ferro, si rivelavano anche essere le zone maggiormente colpite da anemia sideropenica sia in termini di quantità che di gravità. Sempre dallo stesso studio risulta, però, che la combinazione di più fattori comporta un maggior rischio per la salute umana: ad esempio la presenza di altri disturbi come malaria, infezioni intestinali dovute all'*Ancylostoma duodenale* (nematode), perdite di sangue, infiammazioni, talassemie, ecc. favorisce l'insorgenza dell'anemia, anche se la carenza di ferro rimane uno dei fattori preponderanti. Un terzo ed importante deficit è

rappresentato dallo iodio, microelemento essenziale per la salute umana poiché costituente di due ormoni tiroidei, la triiodotironina e la tiroxina. L'eventuale carenza comporta, infatti, notevoli disfunzionalità della tiroide con conseguente effetto sulla crescita e sullo sviluppo di bambini e adolescenti (Signore et al. 2018). La carenza di iodio ha anche effetti deleteri in donne in stato di gravidanza poiché interferisce con lo sviluppo delle capacità cognitive e neurologiche del feto (Zimmermann 2009). (White and Broadley 2009) hanno constatato che il 30-38% della popolazione mondiale non riesce a sopperire ai fabbisogni di iodio e, di conseguenza, sia a rischio di disturbi legati alla sua carenza, tuttavia, le aree maggiormente coinvolte nella problematica (Fig. 3) non risultano essere solo paesi in via di sviluppo, ma anche Russia Norvegia e Italia (Iodine global network, 2019).

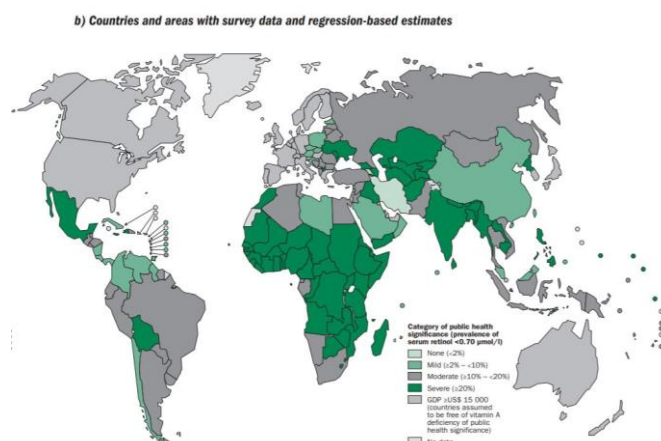


Figura 1 - Diffusione della carenza di vitamina A a livello globale dal 1995 al 2005 (WHO, 2009).

Il fabbisogno giornaliero di iodio è molto variabile poiché esso dipende dall'età, dal genere e dallo stato di gravidanza. la World Health Organization ha infatti individuato come apporto di nutriente raccomandato (Recommended Nutrient Intake) un valore compreso tra 90 e 250 μg (Initiative 2006).

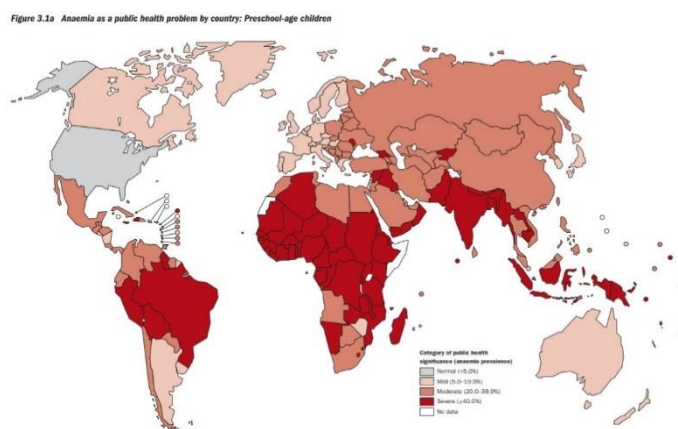


Figura 2 - Diffusione dell'anemia a livello globale dal 1993 al 2005 (WHO, 2008).

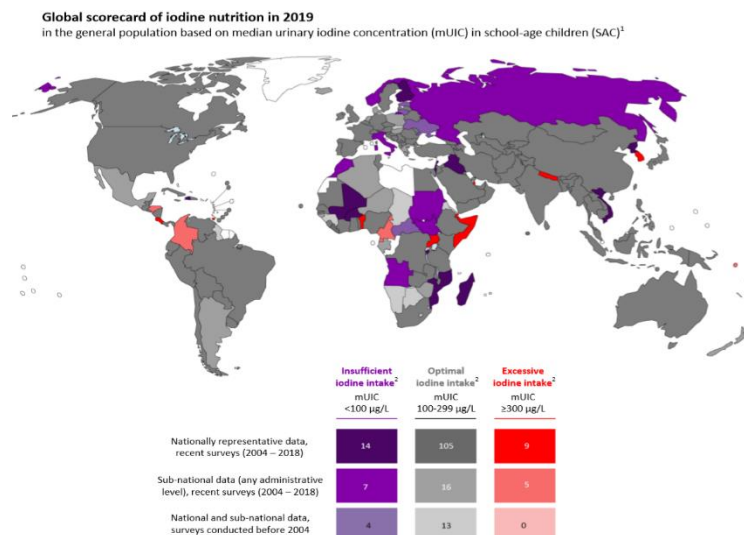


Figura 3 – Diffusione della carenza di iodio a livello globale (Iodine global network, 2019)

Con l'avvento delle moderne tecniche di trasformazione delle derrate agricole, l'industria è riuscita ad ottenere prodotti commerciabili sempre più raffinati e meglio conservabili, tuttavia ciò ha comportato un notevole impoverimento della qualità nutrizionale degli alimenti incentivando le carenze dei vari microelementi (Daher 2001). I governi di tutto il mondo hanno quindi cercato diverse soluzioni per arginare il fenomeno e sopperire alle carenze nutrizionali della popolazione individuando, ad esempio, l'impiego di integratori di vitamine e minerali. Questa tipologia di intervento, tuttavia, non si è dimostrata efficace per diversi motivi, i più importanti dei quali erano la dipendenza da finanziamenti pubblici non sempre disponibili e diverse limitazioni per la popolazione più povera (principalmente di natura economica, accesso ai mercati e la consapevolezza degli effetti negativi delle carenze nutrizionali). Una valida alternativa agli integratori è stata trovata nelle tecniche di fortificazione di diverse colture, ossia nell'incremento e/o la maggior biodisponibilità di micronutrienti all'interno dei tessuti edibili dei vegetali (Garg et al. 2018).

1.1 La fortificazione

Nelle situazioni in cui la popolazione ha normalmente accesso ad alimenti ricchi in micronutrienti e soprattutto a una buona variabilità degli stessi, (Paesi più sviluppati), le carenze micro-nutrizionali sono meno incisive, mentre nelle zone più povere del mondo, dove l'alimentazione si basa su un numero limitato di alimenti, spesso poveri, le problematiche derivanti sono molto più marcate (Prasad et al. 2015). A seguito di questa macro differenza, la fortificazione si rivela essere un mezzo estremamente allettante poiché permette di raggiungere facilmente tutti gli individui della società, dai più agiati a quelli meno fortunati, fornendo alimenti ricchi di micronutrienti senza comportare importanti modificazioni o integrazioni alla dieta tradizionale (Garg et al. 2018). Questa tecnica consente inoltre, di raggiungere in tempi brevi un risultato soddisfacente rispetto a sostenere un

incremento nella diversità della dieta che, benché sia una soluzione sostenibile, richiede un tempo sicuramente più lungo, oltre che comportare una maggior difficoltà (Prasad et al. 2015).

Dal punto di vista economico, gli alimenti fortificati offrono un approccio sostenibile a lungo termine molto valido, sostenuto anche da un rapporto costi-benefici positivo. I costi, infatti, riguardano sostanzialmente l'ottenimento iniziale di colture fortificate, sia tramite miglioramento genetico che l'ingegneria genetica, mentre quelli legati alla loro commercializzazione e diffusione non si scostano di molto dalle varietà tradizionali (Nestel et al. 2006).

La fortificazione presenta dunque diversi vantaggi: in primo luogo permette di sopperire alle micro-carenze senza apportare cambiamenti nella dieta o alle caratteristiche organolettiche degli alimenti, inoltre rappresenta un mezzo valido, sicuro e veloce per raggiungere il maggior numero di individui possibile. Essa presenta tuttavia anche una serie di limiti: carenze importanti richiedono un intervento più marcato e la presenza di potenziali malattie favorite dalle micro-carenze comporta un maggior fabbisogno di micronutrienti (Garg et al. 2018; Prasad et al. 2015).

La fortificazione con micronutrienti, quindi elementi richiesti in modesti quantitativi ma non per questo meno importanti, riguardano principalmente ferro, zinco, rame, manganese, iodio, selenio, molibdeno, cobalto, nickel e vitamina A. Le colture alla base dell'alimentazione, in particolare nei Paesi più poveri e quindi soggetti a carenze nutrizionali, sono riso, frumento, cassava e mais che spesso non contengono un livello sufficiente di micronutrienti al fine di soddisfarne i fabbisogni. Questo deficit può essere legato alla quantità di elemento stoccato oppure al sito di accumulo, il quale non sempre corrisponde alla porzione commerciabile della pianta e, di conseguenza, sorgono complicazioni sanitarie come disabilità, sviluppo mentale e fisico alterato e calo della sopravvivenza (Garg et al. 2018).

La consapevolezza degli effetti e della diffusione delle carenze dei microelementi, unita alla validità della fortificazione, ha infine portato il mondo della ricerca scientifica a sperimentare e proporre tecniche atte a incrementare il valore nutrizionale dei prodotti agricoli. Tra le soluzioni proposte, le più valide consistono nella biofortificazione, nel miglioramento genetico tradizionale e nell'ingegneria genetica (Garg et al. 2018; Prasad et al. 2015).

1.2 Il miglioramento genetico

Il miglioramento genetico tradizionale ha, fino agli ultimi decenni, incrociato e selezionato linee produttive allo scopo di incrementarne la resa, la resistenza verso diverse patologie oppure l'adattabilità a vari ambienti (Carvalho and Vasconcelos 2013). Questo tipo di miglioramento ha consentito di ottenere linee genetiche migliorate sotto molteplici aspetti, tuttavia a discapito di quello riguardante il valore nutrizionale degli alimenti determinando un calo di Cu, Zn, Fe e Ca in diverse colture (White and Broadley 2009). La stessa correlazione negativa (resa-contenuto di micronutrienti) è stata infatti evidenziata in due differenti studi, uno condotto da McDonald, Genc,

and Graham (2008) sia su *Triticum durum* che *Triticum aestivum* con zinco e il secondo eseguito da Oury et al. (2006) su *Triticum aestivum* con magnesio, zinco e ferro.

Negli ultimi anni è sempre più aumentata la consapevolezza e la sensibilità della popolazione verso una sana e corretta alimentazione, in particolare nei Paesi più sviluppati, dove si pone in evidenza il valore nutrizionale degli alimenti. La domanda dei consumatori ha dunque spinto il mondo dell'offerta e della ricerca verso la selezione di varietà con miglior valore nutritivo e non solo produttivo (Winkler 2011).

Un valido esempio è rappresentato dal Biofortification Challenge Program (BCP): nato nel 2002, ha come scopo sviluppare e distribuire colture biofortificate nei Paesi in via di sviluppo al fine di sopperire alle maggiori carenze nutrizionali di queste popolazioni. Si tratta di un progetto facente parte del CGIAR (Research Program on Agriculture for Nutrition and Health) che ad oggi presenta al suo attivo 7 colture biofortificate coltivate in più di 40 Paesi quali: fagioli e miglio perlato con ferro, mais, patata dolce e cassava con vitamina A e mais, frumento e riso con zinco (HarvestPlus).

La fortificazione tramite miglioramento genetico potrebbe essere una valida soluzione alle carenze di microelementi, in particolare perché permette una facile distribuzione delle sementi (la medesima delle varietà convenzionali). Inoltre, i maggiori costi produttivi, si verificano solo durante la fase di selezione e miglioramento dopo le quali è sufficiente mantenere la linea creata con i costi di una semplice varietà tradizionale.

L'evidente limite di questa tecnica riguarda quelle specie che presentano una bassa variabilità genotipica, in particolare per i quantitativi di micronutrienti assimilabili e stoccabili nei tessuti edibili, dove, nonostante gli incroci, non è possibile operare miglioramenti. Esempi su questo aspetto possono essere rintracciati in frumento per il selenio e in patata per calcio, zinco e magnesio (Carvalho and Vasconcelos 2013; White and Broadley 2009).

1.3 L'ingegneria genetica

Negli ultimi anni la scienza ha compiuto notevoli progressi, in particolare nel campo dell'ingegneria genetica, tecnica considerata sempre più indicata per la fortificazione delle colture. Questo tipo di tecnologia consente infatti di annullare i limiti presenti nel miglioramento genetico tradizionale quali la mancanza di sufficiente variabilità genetica e l'incompatibilità intra e interspecifica (Prasad et al. 2015). Essa prevede l'introduzione diretta all'interno del genoma della pianta da modificare di un gene esogeno appartenente ad un'altra specie oppure il licenziamento di un gene già esistente nello stesso (Zhu et al. 2007). Questa pratica si rivela dunque estremamente vantaggiosa poiché permette di esprimere caratteri non presenti naturalmente nella pianta ingegnerizzata, inoltre, contemporaneamente all'inserimento di un nuovo gene, si può agire sull'incremento del micronutriente all'interno della pianta, sulla sua biodisponibilità e sulla sua ri-mobilizzazione (Garg et al. 2018).

I limiti di questa tecnologia sono essenzialmente legati alla concentrazione dei microelementi nel suolo e al notevole costo iniziale, tuttavia i vantaggi derivati dallo sviluppo di piante ingegnerizzate sono notevoli poiché permettono di ottenere linee produttive con caratteristiche qualitative migliori, durature e stabili (Garg et al. 2018). Diversamente da quello che si potrebbe pensare, il principale ostacolo a questa tecnologia non deriva dalle difficoltà legate alla manipolazione genetica, ma dall'ostracismo dell'opinione pubblica, in particolare in Europa, e dalle normative nazionali che regolano la commercializzazione dei prodotti ingegnerizzati (Europa, Australia, Cina ad esempio richiedono specifiche etichette mentre in altri Stati non vi è alcuna distinzione tra OGM e non, come in America) (Carvalho and Vasconcelos 2013). La particolare reticenza verso gli OGM è dovuta al principio di precauzione adottato dall'UE il quale, a seguito della mancanza di garanzie legate alla salute dei consumatori nel lungo periodo. Questo principio, sommato al rischio di contaminazione tra varietà GM e tradizionali a seguito del flusso genico, ha quindi comportato la scarsa diffusione di linee ingegnerizzate (Winkler 2011).

Le tecniche di manipolazione genetica prevedono di migliorare il genoma delle specie vegetali principalmente in due modi: incrementando quella che è la capacità della pianta di rendere disponibile, assorbire, traslocare e accumulare i microelementi all'interno dei tessuti vegetali oppure riducendo la concentrazione di molecole antinutrizionali (White and Broadley 2009). L'attenzione degli ingegneri, in particolare, si è focalizzata sull'incremento dei livelli e della biodisponibilità di micronutrienti (Fe, Zn, Se, I, Mo, Cu e Mn), vitamine (in particolare A ed E), aminoacidi essenziali e acidi grassi (Garg et al. 2018).

1.3.1 I minerali

Le piante non sono in grado di sintetizzare i minerali, di conseguenza la manipolazione si è concentrata su quei geni coinvolti nell'assorbimento, nella ri-mobilizzazione e nell'accumulo degli elementi nei tessuti edibili (Zhu et al. 2007). Per meglio capire la manipolazione genetica si può utilizzare il Fe come esempio. Per il suo assorbimento vi sono due diverse strategie legate alla classe di appartenenza della specie considerata: si parla di strategia I per le dicotiledoni e di strategia II per le monocotiledoni. Le prime sono in grado di acidificare la rizosfera tramite il rilascio di essudati al fine di ridurre il Fe^{3+} a Fe^{2+} e renderlo così assimilabile, mentre le monocotiledoni riescono, tramite l'estruzione di siderofori (molecole in grado di chelare il Fe^{3+} e trasportarlo all'interno della pianta) ad assorbirlo senza modificare il pH della rizosfera. L'ingegneria genetica, agendo sull'espressione dei geni coinvolti nella sintesi di enzimi, trasportatori e altre molecole, come siderofori e trasportatori ZIP (proteine in grado di trasportare all'interno della pianta diversi metalli come Zn, Cu, Mn e Cd), può quindi incrementarne l'assorbimento e l'accumulo di microelementi nei tessuti edibili della pianta (Carvalho and Vasconcelos 2013). Notevoli progressi di fortificazione sono stati fatti in fagiolo, patata, riso, frumento e miglio perlato incrementandone il contenuto di Fe e Zn (Prasad et al.

2015; Winkler 2011). Il riso, in particolare, si rivela essere un esempio interessante di fortificazione con il Fe poiché il maggior valore nutrizionale non è dovuto ad elevate concentrazioni del minerale nei tessuti, ma alla riduzione del contenuto di fattori antinutrizionali, come l'acido fitico, che lo rende maggiormente biodisponibile per l'essere umano (Garg et al. 2018).

1.3.2 Vitamine

Come accennato in precedenza, la carenza di vitamina A rappresenta una delle maggiori patologie a livello globale, diffusa in modo particolare in Asia ed Africa, dove l'alimentazione si basa su pochissime varietà. Allo scopo di ridurre questo tipo di deficit sono state ingegnerizzate diverse colture con notevole successo e attualmente è disponibile una vera e propria linea di varietà "Gold" quali riso, mais, cassava, banana, patata, cavolfiore, patata dolce e senape. Il valore di queste colture è legato generalmente all'incremento di β -carotene, precursore della vitamina A, grazie alla maggior espressione di carotene desaturasi e della fitoene sintasi (il fitoene è un precursore del β -carotene) (Garg et al. 2018): il Golden Rice II, ad esempio, contenente fino a 37 μg di β -carotene per g di peso secco (Zhu et al. 2007). Anche il frumento è stato oggetto di molteplici miglioramenti al fine di incrementarne l'espressione di carotene desaturasi e fitoene sintasi e quindi i livelli di vitamina A, mentre il mais ha subito con successo diverse manipolazioni al fine di aumentare il contenuto di molecole con potere antiossidante come la vitamina E e C (Garg et al. 2018).

Negli ultimi anni, l'ingegneria genetica è entrata in una nuova fase di sviluppo dove si parla di trasferimento multigenico: si tratta di un sistema che prevede la realizzazione di linee genetiche caratterizzate da un elevato valore nutrizionale grazie alla maggior concentrazione di più elementi contemporaneamente. Ad indicare la nuova direzione di ricerca vi sono diversi importanti progetti sostenuti da diversi enti come il Gates Foundation's Grand Challenge e il Christou group (Winkler 2011).

1.3.3 Amminoacidi e acidi grassi

Notevoli sviluppi nell'ambito della concentrazione degli aminoacidi essenziali sono stati raggiunti nel frumento dove, grazie all'attività di ingegneria genetica, sono stati aumentati i livelli di lisina, metionina, cisteina e tirosina (Tamás et al. 2009). Diverse specie oleoproteaginose, come lino, colza e senape, sono state invece migliorate al fine di migliorare il loro valore nutrizionale agendo sulle composizione degli acidi grassi: è stato incrementato, per esempio, il contenuto di acido arachidonico, eicosapentaenoico e docosaesaenoico (agenti coinvolti nell'abbassamento del colesterolo), l'attività dell'enzima delta-6-desaturasi (per la trasformazione dell'acido linoleico in gammalinolenico) e dell'enzima fitasi (degrada l'acido fitico rendendo biodisponibile il fosfato) (Garg et al. 2018).

1.4 La biofortificazione

Come terza possibile tecnica per la fortificazione vi è la biofortificazione, ovvero l'incremento del contenuto di microelementi all'interno dei tessuti edibili dei vegetali tramite una serie di tecniche agronomiche (Prasad et al. 2015). Tale tecnica è stata finora applicata su diverse colture cercando di migliorarne il profilo nutrizionale (Tab. 1). I minerali presenti nel suolo e necessari al sostentamento della pianta possono trovarsi in diverse forme: ioni liberi disciolti nella soluzione circolante, adsorbiti ai colloidi, chelati ad altre molecole oppure in forma insolubile (White and Broadley 2009). Le piante sono in grado, tramite l'apparato radicale, di assorbire i nutrienti presenti disciolti nella soluzione circolante, la loro disponibilità tuttavia, è dipendente dalle caratteristiche pedologiche del terreno quali pH, potenziale di ossidoriduzione, capacità di scambio cationico (legata alla tessitura del suolo), contenuto di acqua e sostanza organica e l'attività microbica (Frossard et al. 2000). La tipologia di suolo influisce dunque sulla fito-disponibilità degli elementi: suoli alcalini e calcarei limitano la disponibilità di Fe e, in ambienti semiaridi ed aridi, anche la disponibilità di Zn e Cu. Suoli umidi, tipici delle zone tropicali, limitano la disponibilità di Ca, elemento che subisce, inoltre, la competizione di Al nei suoli particolarmente acidi e del Na in quelli salini. Nei suoli acidi, inoltre, si può incorrere in carenze di Mg, particolarmente importanti per diverse specie orticole (White and Broadley 2009). In queste situazioni risulta necessario intervenire per migliorare le condizioni pedologiche del suolo e, parallelamente a questi interventi, si può prevedere la biofortificazione delle colture con interventi agronomici di concimazione tramite concime granulare, fogliare, oppure tramite fertirrigazione (Prasad et al. 2015).

Tabella 1- Elenco di colture biofortificate.

SPECIE	MICRO	SUB. COLT.	TECNICA	BIBLIOGRAFIA
cassava	ferro	pieno campo	ingegneria	USDA, BioCassava plus (2005)
carota	calcio	pieno campo in serra		Park et al., (2004)
carota	calcio	idroponia NFT		Morris et al., (2008)
riso	ferro	serra, idroponia, pieno campo		Masuda et al., (2013)
lattuga	ferro	pieno campo in serra		Goto et al., (2000)
lattuga	Silicio	idroponia floating system	agronomica	D'Imperio et al., (2016)
patata	zinco	pieno campo		White et al., (2017)
patata	selenio	pieno campo		Poggi et al., (2000)
patata	selenio	fuori suolo in vaso		Cuderman et al., (2008)
carota	iodio e selenio	pieno campo		Smolen et al., (2016)
lattuga	iodio e selenio	idroponia NFT		Smolen et al., (2014)
lattuga	selenio	fuori suolo in vaso		Carvalho et al., (2003)
pomodoro	iodio	idroponia NFT e fuori		Landini et al., (2011)

		suolo in vaso		
asparago	selenio	pieno campo		Conversa et al., (2010)
riso	ferro	idroponia floating system		Chen et al., (2017)
lattuga	iodio	idroponia floating system		Voogt et al., (2010)
baby leaf	calcio	idroponia floating system		D'Imperio et al., (2016)
fragola	iodio	pieno campo		Daum et al., (2016)
spinacio	selenio	idroponia floating system		Ferrarese et al., (2012)
fragola	selenio	idroponia floating system		Mimmo et al., (2017)
lenticchia	ferro e zinco	pieno campo		HarvestPlus and ICARDA
fagiolo	alto ferro e zinco	pieno campo		HarvestPlus and ICARDA
fagiolo	ferro e zinco	pieno campo		Blair et al., (2009)
fagiolo	ferro e zinco	pieno campo		Gelin et al., (2006)
fagiolo	ferro e zinco	pieno campo		Beebe et al., (2000)
patata	ferro e zinco	pieno campo	miglioramento	Burgos et al., (2007)
patata	ferro e zinco	pieno campo		Brown et al., (2010)
patata	Cu, Fe, Zn, Mn	pieno campo		Haynes et al., (2012)
cassava	ferro	pieno campo		Maziya-Dixon et al., (2000)
cassava	ferro	pieno campo		Chavez et al., (2005)

La concimazione granulare va valutata elemento per elemento, poiché la notevole influenza delle condizioni pedologiche sulla fito-disponibilità dei minerali determina l'efficienza del trattamento stesso: Se, I, Zn e gli elementi mobili in genere, si prestano a questa tecnica con risultati soddisfacenti, mentre elementi meno mobili, o comunque resi velocemente indisponibili, ad esempio il Fe, richiedono accorgimenti particolari come il ricorso a chelati (Carvalho and Vasconcelos 2013). Uno studio condotto da Rengel, Batten, and Crowley (1999) ha analizzato diverse modalità di applicazione di concimi dal quale sembrerebbe migliore la concimazione granulare con ZnSO_4 in termini di efficacia ed economicità mentre, a seguito dell'elevato costo dei chelati, viene ritenuta migliore la concimazione fogliare con FeSO_4 . Rimane comunque fondamentale valutare a monte dell'intervento le condizioni pedologiche del suolo in esame, al fine di optare per la soluzione più adatta alla situazione. L'applicazione di un concime granulare ferrico in un suolo alcalino, ad esempio, risulta assolutamente inadatta poiché le condizioni di basicità comporterebbero una rapida ossidazione a Fe^{3+} e quindi alla sua fito-indisponibilità.

Generalmente, le applicazioni dei micronutrienti avvengono nelle seguenti forme: tramite ZnSO_4 o chelato di Zn, CuSO_4 (facendo molta attenzione a non eccedere con le dosi per problemi legati alla sua fitotossicità), MgO oppure, in alternativa MgSO_4 e MgCO_3 , Na_2SeO_4 e K_2SeO_4 . Le applicazioni di fertilizzanti comportano un costo non indifferente per la loro estrazione e trasporto, ma ciò che ad oggi preoccupa maggiormente sono il numero e le dimensioni dei giacimenti: si stima che le riserve di Zn e Cu siano sufficienti per i prossimi 60 anni, quelle di Se per i prossimi 40, mentre Fe, Ca, Mg e I per più di 100 anni. La quantità di micronutriente richiesta per la biofortificazione è tuttavia

limitata, di conseguenza si stima che i giacimenti siano sufficienti a soddisfare i fabbisogni per molti secoli per quanto riguarda questa tecnica (White and Broadley 2009).

L'assorbimento degli elementi nel suolo non è influenzato solo dalle condizioni pedologiche, ma anche dalla tipologia di apparato radicale e dalla presenza di funghi in grado di stringere simbiosi con le piante (micorrize): questa relazione può infatti agire positivamente sia per quanto riguarda la disponibilità che l'assorbimento degli elementi. Le ife fungine aumentano quella che è la superficie esplorabile dalle radici, possono inoltre acidificare il suolo mediante essudati e rendere maggiormente disponibili elementi altrimenti insolubili come P e Zn (Frossard et al. 2000). Anche la presenza di diversi batteri dei generi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter* e altri possono influire positivamente sulla fitodisponibilità e assorbimento dei micronutrienti, sempre tramite un'azione di acidificazione della rizosfera, oppure tramite simbiosi (Garg et al. 2018).

L'impiego di fertilizzanti granulari per la biofortificazione con micronutrienti presenta tuttavia come maggior problematica la necessità di fare periodiche concimazioni, con conseguenti importanti costi ambientali (Carvalho and Vasconcelos 2013), inoltre, spesso le condizioni pedologiche rendono velocemente indisponibili gli elementi distribuiti e di conseguenza risulta molto più efficace l'applicazione di concimazioni fogliari (White and Broadley 2009).

Rengel, Batten, and Crowley (1999) ha esaminato diversi studi eseguiti nel corso degli anni riguardanti diverse modalità di concimazione: da questi risultano valide le applicazioni di concimi fogliari a base di Zn e Fe (sia in forma chelata che minerale) e Mn sia su fruttiferi che orticole. Un ulteriore microelemento particolarmente impiegato nella biofortificazione è il Se, applicabile sia in forma più o meno solubile (al fine di frazionare la sua disponibilità) al suolo, che in forma solubile tramite la concimazione fogliare (White and Broadley 2009). La biofortificazione con selenio ha trovato largo impiego soprattutto in Finlandia e Nuova Zelanda: la maggior parte dei fertilizzanti impiegati in Finlandia, infatti, sono arricchiti con selenato di sodio già dal 1984 e ciò rende tutti i prodotti agricoli particolarmente ricchi di questo micronutriente. Risultati più che soddisfacenti sono stati raggiunti nel caso delle crucifere come cavoli (0,35 mg/kg di sostanza secca), broccoli (0,75 mg/kg ss) e rapa (0,18 mg/kg ss) (Eurola et al. 1989).

La fertirrigazione con micronutrienti trova particolare riscontro nel caso dello iodio: in alcuni suoli, in particolare nei Paesi in via di sviluppo, vi è infatti una bassa concentrazione di questo microelemento. Uno studio eseguito da Cao et al. (1994) ha preso in esame la distribuzione di iodio in forma di iodato di potassio, in pieno campo grazie ai canali di irrigazione: questo trattamento ha comportato un sensibile incremento del livello di iodio sia nel suolo che nei tessuti edibili delle colture irrigate, inoltre l'arricchimento dei suoli è persistito anche nel corso dell'anno successivo.

Parallelamente alla biofortificazione delle colture tramite l'irrigazione, si è sempre più diffuso e consolidato l'arricchimento delle orticole coltivate con la tecnica dell'idroponia. Questa è una tecnica di coltivazione che si è diffusa soprattutto per la sua economicità e relativa semplicità: essa prevede

sostanzialmente la presenza, più o meno costante, di una soluzione nutritiva (eventualmente fortificata con microelementi) e l'impiego di un substrato di coltivazione inerte allo scopo di fornire un sostegno fisico alla pianta. All'interno dell'idroponia possiamo differenziare tre modalità principali di coltivazione: il flusso e riflusso, l'NFT e il floating system (Tyson, Treadwell, and Simonne 2011).

1.5 Il molibdeno

Il molibdeno è un microelemento il cui fabbisogno per le piante in condizioni ottimali di crescita viene stimato tra 0.5 e 1 mg kg⁻¹ (Benton, 2005). I sintomi di carenza di questo metallo possono essere difficili da determinare poiché, in alcuni casi, presentano forti analogie con la carenza di N, ossia inducono ingiallimenti. In altri casi, invece, si può verificare una sintomatologia molto specifica, soprattutto nel caso delle Brassicacee, piante molto più sensibili alle carenze di questo micronutriente rispetto ad altre famiglie e quindi la determinazione della carenza risulta molto più semplice (Benton, 2005).

Il molibdeno si rivela essere di notevole importanza all'interno della pianta poiché, essendo un costituente di quattro enzimi essenziali, è coinvolto in diversi processi metabolici vitali (Mendel and Schwarz, 2002). Nelle piante il Mo non è presente in forma libera, ma è complessato in un'unica molecola chiamata "cofattore molibdeno", questo complesso viene identificato anche con la dicitura Moco e normalmente si lega ad altri elementi allo scopo di costituire i Mo-enzimi (Hille 1996).

Come sopra riportato, il Mo è un microelemento il cui fabbisogno è molto basso, tuttavia la sua presenza risulta fondamentale per la vita della pianta poiché è costituente di alcuni enzimi coinvolti in diversi processi metabolici di primaria importanza tra cui:

- nitrato reduttasi: l'enzima nitrato reduttasi presenta tre domini funzionali che permettono il trasferimento di elettroni e quindi la riduzione da nitrato a nitrito e ciò rappresenta il primo passaggio per l'organizzazione dell'azoto minerale. Uno di questi tre domini è rappresentato dal Moco, di conseguenza, in assenza del Mo la riduzione del nitrato e quindi l'assimilazione dell'azoto sarebbe impossibile (Campbell 1999);
- aldeide ossidasi: si tratta di un enzima citoplasmatico avente FAD, ferro e il Moco come gruppi prostetici (Koshiba et al. 1996). Esso è coinvolto nella biosintesi dell'acido abscissico (Seo et al. 2000) e dell'acido indol-3-acetico (Seo et al. 1998), fitormoni essenziali per la regolazione della crescita e dello sviluppo della pianta.

L'importanza del Mo è legata inoltre al suo ruolo nella pathway biosintetica della clorofilla *a* e *b*: l'assenza o la carenza di questo elemento interferisce con la sintesi delle molecole intermedie a livello dei cloroplasti, riducendone la quantità di clorofilla all'interno delle foglie. L'inefficienza di questa pathway e, di conseguenza il basso livello di clorofilla, comporta sensibili effetti negativi sull'attività fotosintetica e, di riflesso, su resa e qualità del prodotto (Yu, Hu, and Wang 2006).

La carenza di molibdeno quindi agisce su diversi aspetti come morfologia delle foglie, qualità dei frutti, crescita e sviluppo delle piante interferendo anche con la formazione di fiori completi e fertili (Sabatino et al. 2019). Il cofattore molibdeno svolge importanti funzioni anche a livello della salute umana, poiché coinvolto nei siti di attivazione di quattro molibdo-enzimi: la solfito ossidasi, l'aldeide ossidasi, la xantina ossidasi e la componente mitocondriale amidoxime riducente (mARC, anche se di questo enzima ancora non si ha sufficiente chiarezza del funzionamento). La solfito ossidasi svolge un importante ruolo di protezione poiché catalizza l'ossidazione dei solfiti presenti negli amminoacidi in solfati, evitandone così un eccessivo accumulo con conseguente intossicazione. L'Aldeide e la xantina ossidasi, invece, catalizzano reazioni di idrossilazione di diverse molecole tossiche per il corpo come gli aldeidi (Coughlan 1983). L'European Food Safety Authority ha svolto una serie di studi al fine di individuare i DVR (valori dietetici di riferimento) quali i requisiti medi, l'assunzione di riferimento per la popolazione e i livelli massimi e minimi assunti tollerabili. Per il molibdeno è stato individuato un ADI di $65 \mu\text{g giorno}^{-1}$ per adulti e donne in stato di gravidanza e allattamento, invece, per lattanti, bambini e adolescenti viene individuato un intervallo tra i 10 e $65 \mu\text{g giorno}^{-1}$ (EFSA, 2013). La carenza di Mo comporta l'insorgenza di patologie legate al normale sviluppo dell'apparato neurologico nonché una maggior incidenza di tumori all'esofago. Uno studio medico condotto da Mudd, Irreverre, and Laster (1967) sul decesso di un bambino colpito da anomalie neurologiche e ritardi mentali, ha infatti evidenziato carenze nell'attività della solfito ossidasi a livello di fegato, reni e cervello, carenza normalmente non presente negli individui sani. Burrell, Roach, and Shadwell (1966) sono giunti alla conclusione che l'utilizzo nella dieta di piante coltivate in alcune aree, erano potenzialmente correlabili alla maggior incidenza di tumori alla trachea. Dal loro studio emerge infatti che le piante coltivate nelle zone maggiormente colpite da questo tipo di tumore presentavano carenze sensibili di molibdeno e, in parte, anche di altri elementi, carenze che determinavano l'insorgenza di tumore esofageo nei ratti. La Scientific Committee on Food, invece, ha individuato come NOAEL $0,9 \text{ mg kg}^{-1}$ di peso al giorno, abbassato a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ di peso al giorno tramite un fattore di incertezza pari a 100 (Louis Bresson et al. 2015). L'eccessiva presenza di molibdeno, come qualsiasi altro metallo, può infatti indurre effetti di tossicità sia per gli organismi vegetali che animali: le cellule infatti presentano un complesso sistema di regolazione che li permette di accumulare una certa quota di metallo senza subirne la tossicità (Luk, Jensen, and Culotta 2003).

1.6 La radiazione luminosa e i led

La radiazione solare che giunge sulla superficie terrestre è composta da diverse lunghezze d'onda con caratteristiche specifiche e questa composizione permette di regolare molteplici processi biologici di moltissimi organismi tra cui le piante (Grant 1997). Tra i processi foto-dipendenti di maggior rilievo

spiccano la fotosintesi, la sintesi della clorofilla, il fototropismo, modificazioni foto-morfogeniche (dovute all'attività del fitocromo R/FR) e il fotoperiodo (Mpelkas 1980).

Esiste una relazione per la quale le radiazioni con lunghezza d'onda maggiore siano quelle meno energetiche mentre le lunghezze d'onda più corte si prestano ad essere quelle più biologicamente attive, poiché forniscono un quantitativo di energia nettamente superiore.

La radiazione solare può essere grossolanamente suddivisa in:

- UV, spettro costituito dalle lunghezze d'onda tra 280 e 400 nm, può essere ulteriormente suddiviso in UVB (280-320 nm) e UVA/B (350-500 nm);
- radiazione fotosinteticamente utile (PAR);
- infrarosso per lunghezze d'onda tra i 700 e 1100 nm, o, più specificatamente, rosso lontano (700-800 nm) e infrarosso vicino (800-1100 nm).

Il rapporto rosso/rosso lontano (R/RF), è indispensabile alle piante per percepire la presenza, e in che quantità, di individui a loro vicini, ossia il grado di competizione. Entrambe le radiazioni agiscono su un unico fitocromo, di conseguenza in base alla radiazione percepita dallo stesso, si attiva una diversa risposta della pianta. Un elevato quantitativo di R e quindi un elevato rapporto R/RF, per esempio, equivale a indicare una bassa competizione, viceversa, se vi è un basso rapporto R/RF, significa elevato grado di competizione e si assiste ad un allungamento dei tessuti (Grant 1997).

La luce fotosinteticamente attiva (PAR) è compresa tra i 400 nm e 700 nm e, come tutte le lunghezze d'onda, viene comunemente espressa in flusso di fotoni in micromoli al m² al secondo ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Wang and Folta 2013). La luce è essenziale per le piante poiché nel processo di fotosintesi l'energia luminosa viene convertita in molecole chimiche energetiche impiegate successivamente nella sintesi di tutti i composti necessari alla sopravvivenza della pianta (Mpelkas 1980). Essa viene assorbita a livello di due fotosistemi, il PSI e il PSII.

Lo spettro della PAR è costituito da una serie di lunghezze d'onda individuabili come colori diversi: 400-500 nm, luce blu; 500-600 nm, luce verde; 600-700 nm luce rossa (Grant 1997). Le diverse lunghezze d'onda hanno effetti più o meno marcati sul metabolismo primario e secondario delle piante: per esempio, dal punto di vista fotosintetico, la radiazione del blu e del rosso permettono alle piante di effettuare la maggior assimilazione di CO₂, con la radiazione del rosso che si rivela essere la più efficiente (McCree 1971).

Da quando è stata scoperta l'importanza della radiazione solare per tutti i processi legati alla crescita delle colture e quindi alla produzione, si è cercato di sviluppare una tecnologia in grado di replicare le risposte morfologiche delle piante indotte dal sole, senza necessariamente fornirne la stessa intensità o l'intero spettro solare. La luce, così come l'acqua, la CO₂ e la temperatura, è un fattore limitante se le condizioni ambientali non ne garantiscono un apporto sufficiente: basti pensare alle differenti condizioni di crescita e produzione delle colture nelle stagioni meno favorevoli (autunno e primavera) oppure al calo dei processi metabolici nel caso di giornate nuvolose e buie. Gli studiosi,

di conseguenza, hanno nel corso degli anni sviluppato una serie di fonti luminose in grado di sostenere e/o incrementare la resa delle produzioni tramite l'integrazione di luce artificiale a quella naturale (Mpelkas 1980).

Lo scopo principale di questa ricerca è stato individuare una sorgente luminosa efficiente, in grado di fornire una distribuzione uniforme, economica e di lunga durata. Tra le tipologie sviluppate vi sono:

- lampade a fluorescenza: più efficienti delle precedenti lampade a incandescenza (80-85 lumen/watt invece di 20-22 lm/W), miglior uniformità di distribuzione e durata. Se presente un buon sistema di raffreddamento non comportano importanti danni da scottature nonostante la vicinanza ai tessuti fogliari. Le più diffuse sono state le Gro-Lux, Plant Light e le lampade a fluorescenza Agrolite;
- lampade a scarica ad alta densità (HID): succedono alle lampade a fluorescenza e presentano una maggior efficienza. Le più comuni sono le lampade ai vapori di mercurio (efficienza di conversione 120-125 lm/W) e di sodio ad alta pressione di ioduri metallici (efficienza 135-140 lm/W). Rispetto alle precedenti occupano minor spazio (e quindi comportano minor ombreggiamento), possono essere appese a un'altezza tale da non interferire con le operazioni quotidiane e sono più efficienti (Mpelkas 1980). Le soluzioni adottate finora, tuttavia, presentano anche una serie di limiti poiché le lampade a fluorescenza presentano un limitato flusso di fotoni in uscita e durata, le HID richiedono un alto voltaggio e, a seguito della sensibile emissione di calore, richiedono una barriera termica con la vegetazione o una distanza sufficiente da non causare danni (Mitchell et al. 2012).

Le prime sperimentazioni di integrazione luminosa con luci a LED (Light Emitting Diode) in orticoltura sono avvenute negli Stati Uniti tra gli anni 80 e 90. L'innegabile utilità di queste apparecchiature consiste nella possibilità di regolare e controllare totalmente la composizione dello spettro emesso, ossia delle radiazioni luminose, fornite alle piante durante la loro crescita. Oltre a questo notevole vantaggio vi è il basso consumo energetico, l'immediata accensione e spegnimento, la totale automatizzazione, la lunga durata e il limitato sviluppo di calore a seguito delle radiazioni, come invece non accade nel caso di altre lampade. Inizialmente, l'utilizzo di questa tecnologia, prevedeva la radiazione rossa come unica lunghezza d'onda e gli studi erano circoscritti a poche realtà di ricerca a seguito degli elevati costi di investimento. Ultimamente, invece, grazie ai progressi tecnologici e industriali, l'impiego dei led in orticoltura è diventato economicamente accessibile anche a realtà produttive medie ed è possibile controllare e modificare la qualità dello spettro luminoso tramite la combinazione di numero, tipo ed intensità delle diverse radiazioni luminose (Morrow 2008). I led ad oggi presentano un'altissima variabilità di lunghezze d'onda, dall'UVC (280 nm) alla zona dell'infrarosso vicino (1000 nm) e possono emettere anche luce bianca (Mitchell et al. 2012).

Ormai è appurato che per ottenere una buona resa associata ad una buona qualità delle colture, sono necessarie combinazioni di più radiazioni luminose, in particolare quella blu e quella rossa: uno studio condotto da (Mickens et al. 2019) su red pak choi (cavolo cinese) ha infatti evidenziato come la

radiazione combinata blu+rossa abbia comportato una maggior resa, una maggior espansione fogliare e un discreto accumulo di antocianine rispetto ad altre soluzioni luminose (luce bianca, luce rossa+blu, luce solare artificiale, luce bianca+rossa, luce bianca+verde, luce bianca+rosso lontano). La luce blu ha effetti su diversi processi che avvengono all'interno della pianta come la fotosintesi e l'apertura stomatica (Whitelam and Halliday 2007), essa agisce inoltre riducendo l'inibizione della crescita dovuta ad un eccesso di UVB e stimola l'accumulo di flavonoidi (Adamse, Britz, and Caldwell 1994) oltre a favorire la distensione fogliare e stimolare il fototropismo (Hart, 1988).

La biosintesi della clorofilla viene regolata a livello della formazione dell'acido 5-aminolevulinico (ALA, precursore della sintesi della clorofilla) mediante due sistemi: il Pchl (protoclorofilla) e il fitocromo. Nel caso del Pchl, si assiste ad un suo accumulo in assenza di radiazione luminosa con conseguente inibizione dell'accumulo di ALA, mentre si osserva come, a seguito della radiazione, avvenga la fotoconversione del Pchl in chl con conseguente accumulo di ALA. Nel caso del fitocromo, invece, si può osservare che lo stimolo da parte della radiazione luminosa, in particolare quella rossa, potenzia l'attività sintetizzante dell'acido 5-aminolevulinico (Ford and Kasemir 1980). A sostegno di questa tesi altri studi hanno evidenziato come la luce blu possa esaltare la formazione della clorofilla grazie al potenziamento dell'attività sintetizzante dell'ALA, mentre intensità eccessive di radiazione rossa comportano la degradazione del Pchl (Kamiya, Ikegami, and Hase 1984).

La radiazione luminosa blu ha un importante ruolo nella biosintesi dei composti fenolici, tra cui le antocianine, composti appartenenti alla famiglia dei flavonoidi la cui produzione è totalmente luce-dipendente (Drumm-Herrel 1984). Alcuni studi, tra cui quello condotto da (Rivero, Ruiz, and Romero 2003), hanno evidenziato che l'incremento della sintesi di sostanze antiossidanti, come antocianine e l'acido clorogenico, favorisce una buona crescita delle piante: si può quindi supporre che trattando baby leaf o altri vegetali con luci a led blu si possa favorire sia la crescita che l'accumulo di composti fenolici (Johkan et al. 2010).

Studi eseguiti da Li (2012) su Brassica hanno evidenziato che la sola luce blu rispetto alla rossa e alla fluorescenza abbiano comportato una maggior crescita delle piante oltre ad una maggiore concentrazione di clorofilla *a*, *b*, carotenoidi e solidi solubili. Confrontandosi con altri studi, tuttavia, gli stessi autori ritengono che la luce led blu abbia principalmente effetto sui pigmenti, in particolare sulla clorofilla, oltre che sulla vitamina C e proteine solubili, mentre la luce rossa stimola maggiormente la crescita delle piante. A seguito dell'integrazione con luce a led, si assiste a una maggior concentrazione di metaboliti secondari, Hopkins e Hüner (1999) responsabili della texture e del flavour. Questo fenomeno avviene molto probabilmente in seguito all'up-regulation dell'enzima PAL (fenilalanina ammonio liasi) coinvolto nella pathway di diversi composti fenolici. L'up-regulation si verifica in particolare sotto trattamento a led con luce rossa e blu (Heo Jeong et al. 2006).

1.7 Le baby leaf

Le baby leaf rappresentano quel gruppo di specie orticole normalmente coltivate e consumate allo stadio di giovani plantule ovvero 3-4 foglie vere (Martínez-Sánchez et al. 2012) e che di norma si aggirano attorno ai 12 cm di altezza.

Secondo l'IFPA (International Fresh-cut Produce Association) le baby leaf possono essere annoverate tra i prodotti fresh-cut poiché rientrano nella loro definizione: “qualunque frutto o vegetale o combinazione di questi che è stato fisicamente alterato dalla sua forma originale ma che rimane comunque in uno stato fresco” (Lamikanra 2002).

In Italia la coltivazione di baby leaf si è diffusa negli ultimi anni e si estende su circa 6500 ha ed il 70% dell'intera produzione avviene in ambiente protetto (Castoldi, Bechini, and Ferrante 2011). Secondo (Rico et al. 2007) l'industria impegnata nella produzione e commercializzazione di prodotti orticoli e frutta “ready to use”, ha subito una forte crescita grazie allo stile di vita sempre più frenetico dei consumatori, oltre che al riconoscimento delle qualità intrinseche di questi alimenti quali l'elevato contenuto di antiossidanti, acido ascorbico, β -carotene ed altre vitamine e minerali.

Lo stile di vita del consumatore negli ultimi anni ha subito una notevole accelerazione, di conseguenza, egli tende a ricercare prodotti con elevato contenuto di servizio, come la baby leaf e i prodotti ready to use, in quanto non ha sufficiente tempo per la preparazione di frutta e verdura.

Negli ultimi anni Fresh Plaza ha riportato numerosi articoli aventi come soggetto la diffusione e l'innovazione del comparto agricolo legato alla 4 gamma, oltre che alla realizzazione di prodotti ready to use. Le aziende infatti, in particolare quelle aventi rapporti con il mercato estero, sono caratterizzate da una serie di investimenti atti a ricercare varietà in grado di garantire una shelf life dei prodotti più lunga e nuovi miscugli, al fine di affermarsi sul mercato e stringere partnership con il mercato della ristorazione e delle GDO (Fresh Plaza, freschplaza.it).

Dal momento della raccolta di ortaggi a foglia in fase matura, si innescano una serie di cambiamenti biochimici e deterioramenti fisiologici che si tramutano in modificazioni del colore, della texture e del sapore, soprattutto a causa dell'ossidazione. La trasformazione minima alla quale vengono normalmente sottoposti i prodotti di IV gamma invece, limita queste modificazioni, anche se per ottenere un buon risultato è necessario adottare particolari accorgimenti in fase di pulizia, packaging in atmosfera controllata e la garanzia della catena del freddo (Rico et al. 2007).

A conferma dell'evolversi di questo mercato, dal 2000 al 2010, si è assistito ad un incremento di produzione e scambi di prodotti di IV gamma a livello Europeo e si stima un trend crescente nei prossimi anni. In Italia si è registrato un rallentamento nel 2008, molto probabilmente imputabile alla crisi economica del Paese, tuttavia a partire dal 2009, si è verificata una significativa ripresa degli scambi con un incremento del 5.8% in valore del mercato (700 milioni di fatturato) e del 11% rispetto al 2008 della quantità (146'000 tonnellate) (Baselice et al. 2014).

L'incremento di mercato di questi prodotti è sostanzialmente dovuto alla maggior domanda da parte dei consumatori di materiale subito pronto all'uso, all'elevato valore estetico e nutrizionale e alla notevole variabilità in termini di colore, consistenza e aromi (Martínez-Sánchez et al. 2012). A indirizzare il mercato dell'offerta verso la ricerca e la commercializzazione delle baby leaf non è tuttavia la sola domanda, ma vi sono anche altre valide ragioni quali la maggior efficienza di produzione grazie al miglior harvest index; il processo di raccolta, lavorazione e packaging più facile e veloce e la minor ossidazione del prodotto rispetto a un prodotto convenzionale per il minor diametro dello stelo (ad esempio un cespo di lattuga) (Martínez-Sánchez et al. 2012).

Come anticipato l'incremento nell'utilizzo delle baby leaf è dovuto sia al trend culinario degli ultimi anni, sia, e soprattutto, per il loro alto valore nutrizionale (Lee et al. 2004). Nei tessuti edibili di questi vegetali, infatti, vi risiedono diversi composti benefici quali vitamine antiossidanti come acido ascorbico (vitamina C), β -carotene e alfa-tocoferolo e composti polifenolici come antocianine, flavonoidi, isoflavoni e flavoni aventi importanti proprietà di ossidoriduzione (Kaur and Kapoor 2002).

L'elevato valore nutrizionale e la ricchezza in termini di elementi benefici delle baby leaf, hanno assicurato a queste tipologie di ortaggio l'appellativo di “alimenti funzionali”: tali metaboliti sono infatti particolarmente attivi nel promuovere la salute umana favorendo le difese immunitarie (Janovská, Štočková, and Stehno 2010; Xiao et al. 2015).

Interessante è lo studio condotto da Kaur and Kapoor (2002) su ortaggi appartenenti a diverse famiglie botaniche in India: analizzandone il contenuto di polifenoli totali hanno individuato tre classi con alto (>200 mg catecolo/100 g FM) medio (100-200 g catecolo/100 g FM) e basso (<100 g catecolo/100 g FM) contenuto di polifenoli. Tranne che per alcuni ortaggi, veniva rispettata la dislocazione nelle classi analizzando la capacità antiossidante degli stessi, mentre, per le eccezioni degli ortaggi appartenenti alle classi con basso o medio contenuto di polifenoli ma alta capacità antiossidante, si ritiene imputabile alla maggior capacità antiossidante di alcuni polifenoli rispetto ad altre forme. Risulta dunque chiaro che le proprietà benefiche dei singoli ortaggi variano in base alla quantità, ma anche alla qualità dei composti antiossidanti contenuti, considerando tuttavia che la capacità antiossidante è dipendente dalla specie e dal metodo utilizzato nell'estrazione dei composti polifenolici (Martínez-Sánchez et al. 2008). Gli stessi autori si sono concentrati nella comparazione di specie innovative appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae quali mizuna, rucola e crescione d'acqua rispetto a varietà più tradizionali come broccoli, cavoli e cappucci. Queste specie presentano interessanti valori in termini di polifenoli totali e vitamina C e, di conseguenza, dell'attività antiossidante, in particolare comparandoli ad altri tipi di baby leaf, come quelle appartenenti alla specie *Lactuca sativa*.

La variabilità dei composti fenolici e il loro accumulo, in particolare per le antocianine, viene fortemente influenzato dalle condizioni climatiche quali temperatura e radiazione solare. In generale

basse temperature e intensa radiazione luminosa, in particolare i raggi UV, inducono un maggior accumulo di acidi fenolici, flavonoidi e antocianine, tuttavia va considerato che vi è anche un sensibile peso della componente genotipica nella regolazione di questi processi (Marin et al. 2015).

Le antocianine non sono importanti solo per le loro proprietà antiossidanti, ma per le specie orticole caratterizzate da pigmentazione risulta fondamentale garantire una buona colorazione delle stesse affinché trovino collocazione sul mercato. Le antocianine sono pigmenti idrosolubili appartenenti alla famiglia dei flavonoidi ottenute mediante biosintesi dei fenilpropanoidi. Essendo i flavonoidi e i composti polifenolici in generale sintetizzati tramite la stessa via, risulta palese che la maggior attività dell'enzima PAL coinvolto nella suddetta biosintesi, determina una maggior sintesi di composti fenolici e antocianine anche se i primi vengono maggiormente indotti (Boo et al. 2011).

2. SCOPO DEL LAVORO

Nel passato gli sforzi del mondo scientifico, si sono concentrati sull'ottenimento di colture in grado di fornire un'elevata rendita produttiva, allo scopo di sopperire alla domanda dei consumatori e garantire cibo sufficiente alla popolazione mondiale. Negli ultimi anni, tuttavia, parallelamente alla necessità di disporre di derrate alimentari sufficienti, è aumentata la consapevolezza dell'importanza del valore nutritivo degli alimenti stessi: varietà ad alto potenziale produttivo, infatti, presentano un profilo nutrizionale impoverito rispetto a varietà non migliorate, di conseguenza sono diventati sempre più frequenti casi di carenze nutrizionali di microelementi. Le maggiori problematiche sono state riscontrate per deficit di ferro, iodio e vitamina A, seguiti da altri minerali e vitamine: le carenze di micronutrienti, difatti, comportano ripercussioni più o meno importanti sulla salute umana con conseguente aggravio del quadro patologico della salute pubblica, sia in Paesi in via di sviluppo che già industrializzati. A seguito di questi disagi, il mondo scientifico ha indirizzato i suoi sforzi verso la ricerca di più soluzioni adatte ad arginare ed mitigare il più possibile questi deficit. Inizialmente si è provveduto alla realizzazione di integratori della dieta ricchi di vitamine e minerali, tuttavia questa soluzione si è rivelata poco pratica in quanto la maggior parte della popolazione affetta da queste problematiche non dispone delle risorse necessarie al consumo di questi prodotti, sia in termini economici che culturali. La svolta alla lotta contro le carenze nutrizionali di microelementi, si è concretizzata con la creazione di varietà di cereali e altri vegetali fortificati, ossia arricchiti grazie a tecniche di miglioramento genetico, ingegneria genetica e/o l'applicazione di tecniche agronomiche. Con questo lavoro, si è valutata l'efficacia nella fortificazione con molibdeno di una Brassicacea coltivata con il sistema del floating system, confrontando l'aggiunta del metallo direttamente nella soluzione nutritiva rispetto ad un controllo ove non è stato introdotto il micronutriente. Durante la prova sperimentale, è stato inoltre valutato l'effetto di un'integrazione luminosa di $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di luce a led blu, sia sulla produzione e colorazione delle foglie, che sull'assorbimento e accumulo del molibdeno all'interno dei tessuti vegetali.

3. MATERIALI E METODI

Contesto ambientale e trattamenti

La tesi sperimentale in esame è stata condotta presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Padova, situata a Legnaro, 8 m s.l.m..

Lo studio è stato condotto in una serra tunnel dotata di copertura in materiale plastico, un'altezza al colmo di 6 m e di 4 m alla gronda; le sue pareti, mobili, erano controllate da una centralina che, in base alla temperatura interna alla serra e alla velocità del vento, determina la chiusura e l'apertura delle stesse in modo da garantire una temperatura minima ed evitare un eccessivo surriscaldamento. Per quanto riguarda la scelta della baby leaf, si è optato per una Brassicacea, la Moutarde Rouge Metis (*Brassica rapa* varietà Japonica), una varietà molto simile alla rucola, prodotta dalla ditta sementiera Sativa. Si tratta di una specie ad accrescimento veloce con foglie inizialmente lobate che verso l'apice si dividono diventando finemente frastagliate. Il colore della pagina fogliare è violaceo scuro con striature verdi che richiamano il verde dello stelo.

Durante la sperimentazione la specie coltivata è stata sottoposta a diversi trattamenti: la soluzione nutritiva è stata caratterizzata da 3 concentrazioni di molibdeno (0, 0.1 e 1.0 mg L⁻¹); due modalità di integrazione della luce naturale (controllo e led blu); l'intera sperimentazione è stata replicata per 3 cicli consecutivi: il primo a febbraio, il secondo a marzo e il terzo a maggio 2019 e ciascun trattamento ripetuto tre volte. Le differenti tesi sono state disposte secondo lo schema sperimentale del quadrato latino (Fig. 4).

	+ LUCE LED						
10	13	16		1	4	7	C - CONTROLLO
11	14	17		2	5	8	A - 0,1 mg/l
12	15	18		3	6	9	B - 1 mg/l

Figura 4 – Schema distributivo delle 18 vasche con relative tesi.

Per quanto riguarda la soluzione nutritiva, sono state preparate due distinte miscele, una denominata A, contenente ferro, calcio, nitrato e ammonio, e una identificata con la lettera B, contenente il resto dei nutrienti necessari. I diversi nutrienti sono stati pesati, tramite bilancia analitica, in quantità sufficiente per la preparazione di 10 L di soluzione al fine di disporre, per tutti e tre i cicli, della medesima soluzione madre concentrata 100X. Le 18 vasche sono state riempite con 35 L totali di soluzione, di conseguenza, considerando la proporzione di porre 10 mL di soluzione concentrata A e B per ogni litro di acqua, sono stati misurati 350 mL di A e 350 mL di B e poi addizionati a 34.3 L di acqua in ogni vasca (Fig. 5).



Figura 5 – Preparazione della soluzione nutritiva tramite l’aggiunta in acqua delle soluzioni A e B.

La composizione della soluzione madre A e B è riportata in tabella 2.

Tabella 2 – Composizione della soluzione concentrata.

ELEMENTO	SOLUZIONE A (g/10 l)
Ferro EDTA	30,769
Nitrato di calcio	1148,11
Nitrato d’ammonio	417,468
ELEMENTO	SOLUZIONE B (g /10 l)
Solfato di magnesio	456,389
Molibdato di sodio	0,126
Solfato di zinco	0,302
Acido borico	2,86
Solfato di rame	0,393
Cloruro di manganese	1,802
Solfato di potassio	327,313
Fosfato monobasico di potassio	219,703

In riferimento alla biofortificazione con molibdeno, dopo essersi confrontati con studi precedenti, si è deciso di arricchire la soluzione madre con due diverse concentrazioni del microelemento al fine di saggiare il comportamento delle piante e valutare la miglior strategia per la biofortificazione.

Sono state così realizzate tre soluzioni differenti finali corrispondenti alle tre tesi sopra citate per tutti e tre i cicli:

- C: tesi di controllo, la soluzione è composta da una miscela d’acqua e dalla soluzione nutritiva in proporzione di 34.3 L di acqua, 350 mL soluzione A e 350 mL soluzione B.
- A: tesi C arricchita con 0,1 mg L⁻¹ di molibdeno, per un totale di 0,0035 g/vasca
- B: tesi C arricchita con 1 mg L⁻¹ di molibdeno, per un totale di 0,035 g/vasca.

Per quanto riguarda la radiazione luminosa, invece, lo studio è stato così organizzato: 9 vasche, (portanti le tesi C, A e B replicate per 3 volte) con sola luce naturale e 9 con luce naturale sommata all’integrazione di luci a led. Quest’ultima è stata realizzata con lampade led posizionate sopra le

vasche (Fig. 6) individuando l'altezza idonea a garantire un'intensità luminosa pari a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nella radiazione del blu (460 nm) a livello pianta tramite l'impiego di uno spettrofotoradiometro (Delta OHM). Per evitare un eccessivo effetto dell'integrazione luminosa, è stato previsto un temporizzatore collegato all'impianto elettrico che garantiva l'accensione dei led mezzora dopo l'alba e lo spegnimento mezzora dopo il tramonto.

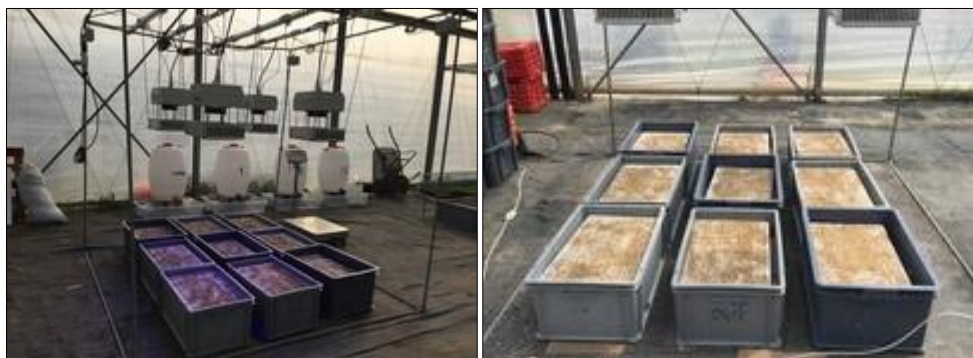


Figura 6 - Disposizione delle tesi con e senza LED all'interno della serra

La densità di semina adottata per le baby leaf è stata pari a 2000 piante m^{-2} coltivate su contenitori alveolati in polistirolo, di 228 alveoli, ciascuno caratterizzato da una superficie di $0,15 \text{ m}^2$.



Figura 7 – Semina di Moutarde Rouge Metis su plateau.

Ognuno dei 18 contenitori è stato pulito mediante idropulitrice e lasciato 24h in candeggina al fine di garantire una sufficiente condizione igienico-sanitaria. Successivamente, previa nuova pulitura con sola acqua, ogni plateau è stato riempito con perlite fino a creare una superficie omogenea e continua; per garantire un corretto assestamento del substrato colturale e favorire la germinazione delle sementi, prima di ogni semina, i plateau sono stati irrigati e gentilmente scossi in modo da limitare l'eventuale disformità tra le piantine in fase di crescita.

La semina della Moutarde è stata eseguita manualmente e, una volta terminata, ha previsto la copertura delle sementi con vermiculite seguita da una leggera irrigazione al fine di garantire una germinazione uniforme. Una volta terminata la preparazione dei plateau questi sono stati pesati e posti a galleggiare nelle vasche dove sono rimasti per tutto il ciclo colturale ad eccezione delle fasi

di raccolta dati settimanali. Tutte le fasi di pulitura, disinfezione, irrigazione della sola perlite, semina, posa della vermiculite, nuova irrigazione e pesata finale sono state ripetute per tutti e tre i cicli.

Il sistema di coltivazione scelto è quindi stato il floating system: sistema che garantisce la costante disponibilità di soluzione nutritiva, una buona manovrabilità per la raccolta dei dati ed una facile determinazione del quantitativo d'acqua traspirato da reintegrare nel sistema. La problematica dell'ossigenazione del sistema è stata risolta mediante l'utilizzo di aeratori e canalette che garantivano un flusso costante di ossigeno all'interno della soluzione di ogni vasca, in modo da evitare condizioni di asfissia radicale. In tabella 3 sono riportate le principali informazioni colturali dei diversi cicli.

Tabella 3 – Schema riportante le date di semina e raccolta dei diversi cicli.

	SEMINA	RACCOLTA	DURATA CICLO	N° TESI C		N° TESI A		N° TESI B	
				LED	SOLARE	LED	SOLARE	LED	SOLARE
1 CICLO	26/02/19	22/03/19	25 giorni	3	3	3	3	3	3
2 CICLO	28/03/19	19/04/19	20 giorni	3	3	3	3	3	3
3 CICLO	09/05/19	30/05/19	21 giorni	3	3	3	3	3	3

Analisi morfo-ponderali

Dal momento della semina, per ogni ciclo ed ogni cinque giorni, si è provveduto a raccogliere e registrare una serie di dati quali peso del plateau al fine di valutare l'incremento della biomassa, peso delle vasche al fine di valutare la traspirazione e la temperatura della soluzione.

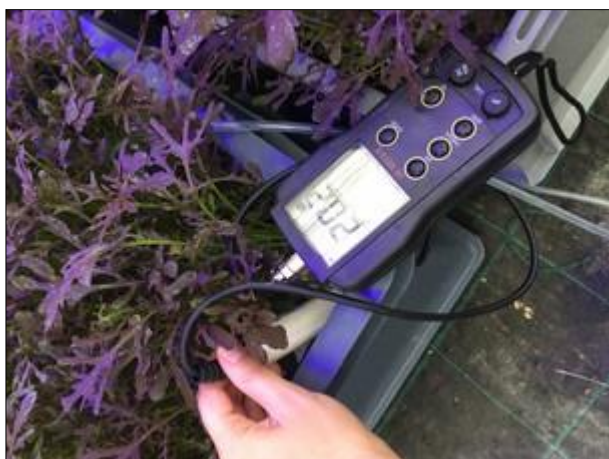


Figura 8 – Rilevamento della temperatura



Figura 9 – Preparazione alla pesatura

La temperatura è stata misurata grazie ad uno strumento portatile multi-parametro (Hanna Instrument), con il quale era possibile controllare anche pH ed EC; il peso delle vasche e dei plateau, invece, è stato misurato grazie ad una bilancia digitale. Prima di ogni pesata si è provveduto ad asportare il sistema di aerazione delle vasche ed a lasciare per circa mezzora i plateau sospesi sopra

le rispettive vasche in modo da lasciar percolare e raccogliere gran parte della soluzione presente nel polistirolo e negli alveoli. Successivamente alla pesatura del plateau e della rispettiva vasca, il pannello veniva rimesso in posizione all'interno della vasca al fine di limitare lo stress alle piantine in accrescimento.



Figura 10 – Pesata del plateau tramite bilancia



Figura 11 – Rilevamento pH della soluzione

Al termine delle operazioni di pesata, i dati registrati hanno permesso di determinare, per differenza, la quota d'acqua traspirata da reintegrare alla soluzione nutritiva al fine di riportare il livello d'acqua nelle vasche a 35 L. Le dimensioni dei plateau erano tali da ricoprire totalmente la superficie della soluzione nutritiva, quindi l'eventuale quota d'acqua persa per evaporazione può essere considerata nulla. Per reintegrare la giusta quota d'acqua in ogni vasca, è stato sottratto al volume totale 35 L, il peso della vasca sommato alla propria tara, il risultato è stato quindi convertito in kg d'acqua, pesato e aggiunto. Al termine delle operazioni si provvedeva a controllare e ripristinare il sistema di aerazione oltre a verificare lo stato di accrescimento delle piante.



Figura 12 e 13 – Moutarde Rouge Metis in accrescimento.

Per ogni ciclo sono stati effettuati quattro rilievi e, con l'ultimo, si procedeva alla raccolta delle tesi, poiché le piante presentavano 3-4 foglie vere. Dopo aver misurato il peso dei plateau, sono stati prelevati 5 campioni per tutte e 18 le tesi al fine di sottoporli ad un'analisi colorimetrica mediante un

colorimetro Minolta in grado di determinare i parametri L, a e b della pagina fogliare. Sono state inoltre scattate delle foto alla tesi A, B e C, con e senza luci a led, in modo da disporre di un'immagine visiva delle piante al momento della raccolta.

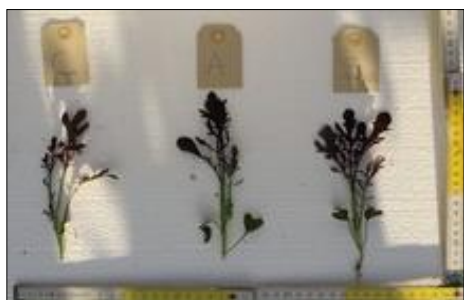


Figura 14 – campioni raccolta 22/03/2019



Figura 15 – campioni raccolta 19/04/2019



Figura 16 – Campioni raccolta 30/05/2019



Figura 17 – Campioni led raccolta 22/03/2018



Figura 18 – Campioni led raccolta 19/04/2019



Figura 19 – Campioni led raccolta 30/05/2019

Terminate queste prime misurazioni si è proceduto alla raccolta manuale dell'intera biomassa epigea per ogni plateau che, successivamente alla sua pesatura, è stata divisa in modo da ottenere tre sub-campioni: il primo congelato (-20°C) e destinato alle analisi in laboratorio, il secondo destinato

all'essiccazione (65° C per 48 h) per determinarne il peso secco e il terzo, invece, per essere posto a -80° C e conservato.

Al termine della raccolta della parte epigea, si è provveduto a recuperare, e successivamente ad essiccare, anche gli apparati radicali rimasti ancorati ai plateau in modo da poter disporre delle radici per le analisi di laboratorio. Terminata la raccolta del materiale vegetale, si è provveduto a pesare le vasche e, dopo aver reintegrato la quota d'acqua traspirata, a prelevare dei campioni di soluzione nutritiva dalle 18 vasche al fine di conservarle in congelatore per le analisi di laboratorio.

I plateau sono stati infine liberati dalla perlite, puliti e disinfettati per poter sostenere il ciclo successivo, lo stesso processo è stato riservato alle vasche al fine di garantire un'adeguata sicurezza igienico-sanitaria. Al momento del nuovo ciclo i plateau sono stati riempiti con nuova perlite mentre la soluzione nutritiva impiegata per le vasche è stata ottenuta a partire dalla soluzione madre di partenza. Terminati i cicli colturali in serra, si è provveduto a trasferire tutto il materiale raccolto nei congelatori appositi siti nel laboratorio in modo da poter procedere con le analisi del contenuto di clorofille, sostanze antiossidanti, polifenoli e molibdeno.



Figura 20



Figura 21



Figura 22



Figura 23

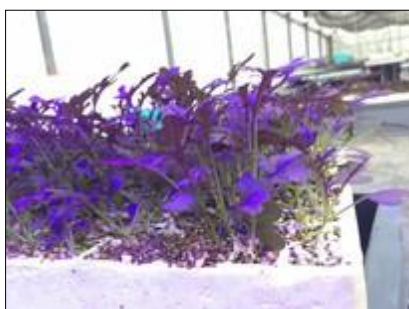


Figura 24



Figura 25

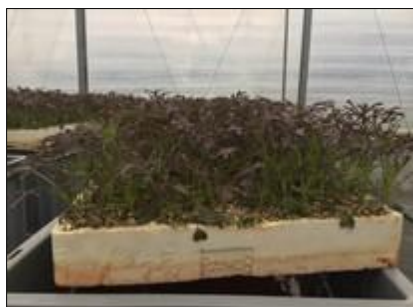


Figura 26



Figura 27



Figura 28

Figure 24 - 32 – Sequenza fotografica delle diverse fasi del ciclo culturale.

Analisi qualitative

Il contenuto delle clorofille è stato determinato tramite spettrofotometricamente prelevando 1g di biomassa fresca e posto in falcon nella quale sono stati aggiunti 20 mL di etanolo sotto cappa. Al fine di consentire la massima estrazione di clorofilla, i campioni sono stati lasciati a riposare per 24 ore al buio in cella frigorifera a $+4^{\circ}\text{C}$. Terminata la fase di estrazione, è stato possibile osservare come la soluzione di etanolo abbia assunto una colorazione verde intensa grazie alle clorofille presenti, mentre i tessuti fogliari si presentavano totalmente depigmentati.

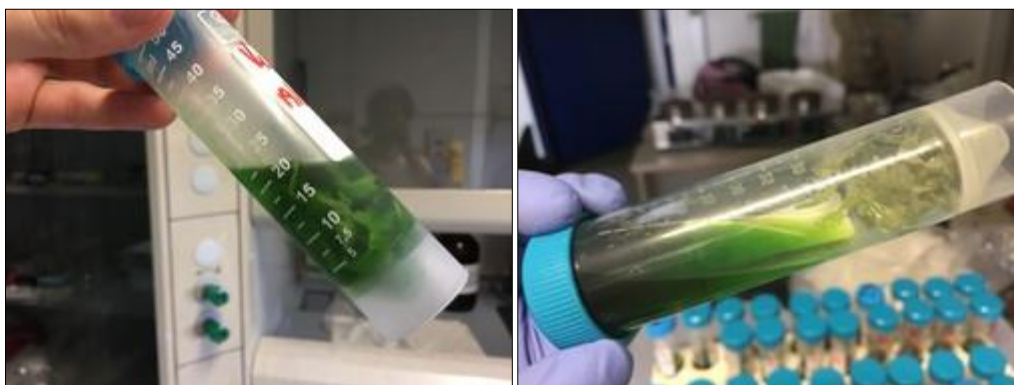


Figura 29 – Depigmentazione in etanolo dei campioni di Moutarde Rouge Metis.

Prelevate le falcon dalla cella frigorifera si è provveduto, tramite l'impiego di carta filtrante, a purificare l'estratto dai residui vegetali ottenendo una soluzione impiegabile per la successiva analisi allo spettrofotometro. Il risultato dell'operazione, tuttavia, è risultato particolarmente concentrato a seguito dell'elevato contenuto di pigmenti e si è deciso, quindi, d'effettuare una diluizione 1:10 per garantire una lettura il più accurata possibile. Sono stati preparati 5 ml di soluzione per tutti i 54 campioni da analizzare aggiungendo a 4.5 mL di etanolo e 0.5 mL di estratto. Terminata la preparazione delle provette, si è proceduto con la lettura dei campioni: ognuno è stato letto per tre volte a tre lunghezze d'onda diverse in modo da poter determinare il contenuto di clorofilla a, b e dei carotenoidi. Per la loro determinazione sono state adottate le seguenti lunghezze d'onda: 665 nm per

la lettura della clorofilla a; 649 nm per la lettura della clorofilla b; 470 nm per la lettura dei carotenoidi.

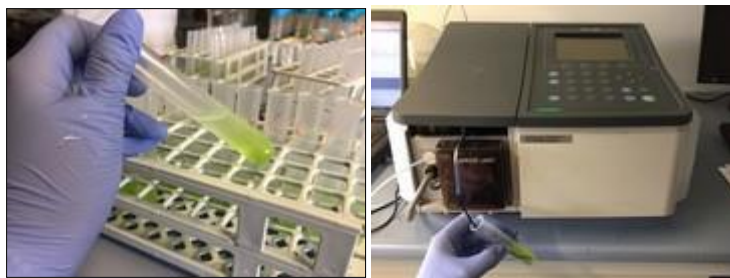


Figura 30 Provette con l'estratto di clorofille in etanolo e lettura spettrofotometrica.

Le analisi e la quantificazione di polifenoli, molecole antiossidanti ed antocianine, si differenziano per i solventi e i composti chimici impiegati per la loro lettura, tuttavia, tutti e tre hanno in comune il preparato di partenza. Sono stati prelevati e posti in falcon numerate circa 2 g di biomassa per tutti i 54 campioni conservati nel congelatore, ai quali sono stati aggiunti 20 mL di metanolo puro. La sospensione ottenuta è stata sottoposta ad un processo di omogenizzazione sotto cappa tramite Ultra Turrax al fine di favorire la rottura delle cellule vegetali e la fuoriuscita dei composti in esse contenuti. Al termine del processo, grazie a della carta filtrante, sono state ottenute 54 provette contenenti un estratto purificato limpido, di colore verde, punto di partenza per la determinazione di polifenoli, molecole antiossidanti ed antocianine.

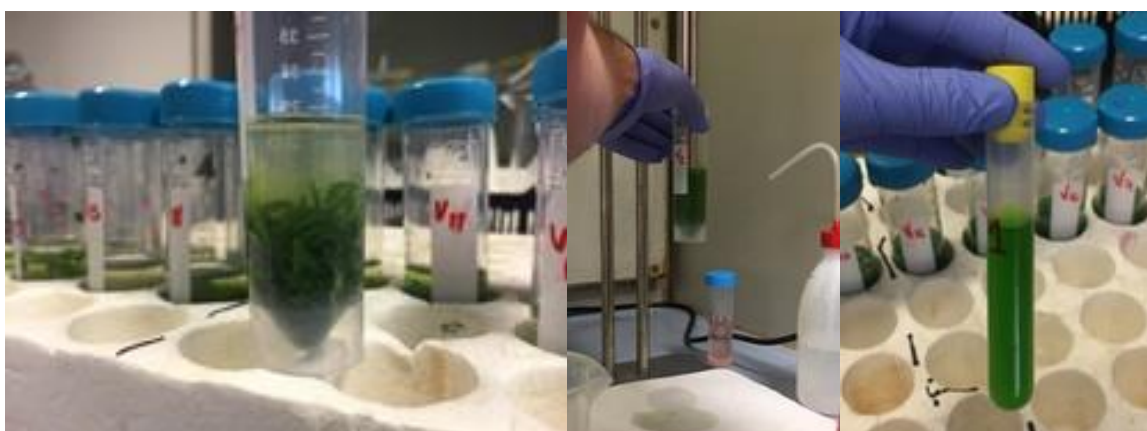


Figura 31 – Preparazione dell'estratto necessario alla lettura di Frap, Folin e antocianine

La determinazione dell'attività antiossidante e dei fenoli totali ha previsto l'impiego delle metodiche indicate da Kang et al. (2002) che riprendono quelle di Ke e Saltveit (1989), Singleton e Rossi (1965) e Benzie e Strain (1996) con opportuni aggiustamenti per adattare le metodiche alla matrice da analizzare. La determinazione dell'attività antiossidante e dei fenoli totali ha previsto per entrambi la pesata di 5 g di campione congelato ai quali sono stati aggiunti 20 mL di metanolo (per HPLC); il campione è stato omogeneizzato per 30'' con l'ausilio dell'ultra turrax a velocità di 17000 rpm e quindi filtrato con carta da filtro (589 Schleicher diametro 125 mm). L'attività antiossidante è stata determinata con il metodo FRAP (FerricReducingAbility of Plasma). Il reagente FRAP (soluzione 1

mM di 2,4,6-tripiridil-2 triazina [TPTZ], 2 mM cloruro ferrico e 250 mM di acetato di sodio a pH 3.6) è stato preparato giornalmente a partire da soluzioni madri di 300 mM di buffer acetato, 12 mM di TPTZ (in acido cloridrico 48 mM) e 24 mM di cloruro ferrico in rapporto 10:1:1. A 100 μ L di estratto sono stati aggiunti 1900 μ L di reagente FRAP e si è omogeneizzato con l'ausilio di un vortex; dopo 4' a 20 °C è stata letta l'assorbanza a 593 nm (Shimadzu UV-1800). La lettura è stata confrontata con una curva di calibrazione costituita da soluzioni di solfato di ammonio ferroso con concentrazione da 0 a 1200 μ g mL⁻¹ di ione ferroso. L'attività antiossidante è stata quindi successivamente espressa come mg di Fe²⁺ equivalenti (Fe²⁺+E) per kg di campione secco o fresco.

Per la determinazione dei fenoli, invece, si sono prelevati 200 μ L dell'estratto, si sono aggiunti 1000 μ L di reattivo di Folin-Ciocalteu e 800 μ L di carbonato di sodio anidro al 7.5%. Si è quindi proceduto con 15'' di agitazione e successivo riposo per 30' a temperatura ambiente prima di leggere allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 765 nm (Shimadzu UV-1800). L'assorbanza è stata confrontata con quella letta per soluzioni a concentrazione nota di acido gallico (da 0 a 300 μ g mL⁻¹) che hanno subito lo stesso procedimento dei campioni. Il contenuto totale di fenoli è stato espresso come mg di ac. gallico equivalenti (GAE) per kg di campione fresco o secco.

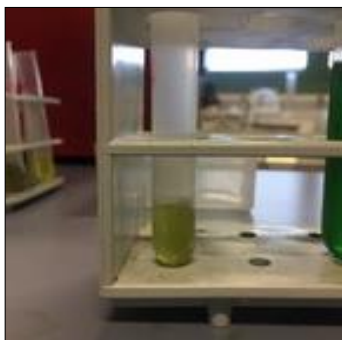


Figura 32 – Estratto per Frap



Figura 33 – Estratto per Folin

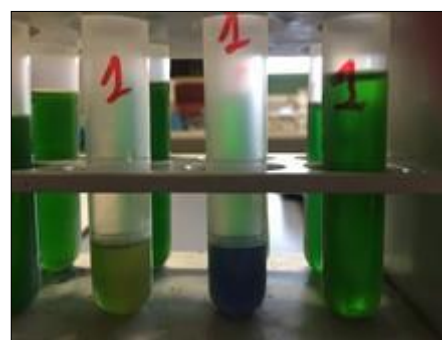


Figura 34 – Estratto per antocianine

Nel caso delle antocianine, la loro quantificazione è stata molto simile alla determinazione della concentrazione dei pigmenti poiché si tratta di un metodo di determinazione diretto. A partire dal campione iniziale, ossia quello in soluzione di metanolo ottenuto a seguito della filtrazione del preparato iniziale, è stato sufficiente tarare lo spettrofotometro con lunghezza d'onda pari a 530 nm e procedere alla lettura dei campioni. Maggiore è il valore di assorbanza del fluido, maggiore è il contenuto di antocianine.

Con la restante parte dei campioni conservati nel congelatore, stato determinato il grado Brix per la dolcezza, il pH per l'acidità e la conducibilità elettrica per il contenuto di minerali.

Ciascun campione è stato estratto dal congelatore e lasciato a temperatura ambiente per 24 ore al fine di favorire la fuoriuscita dei succhi citoplasmatici grazie alla fratturazione delle pareti cellulari dove alle basse temperature. Successivamente è stato asportato un angolo del sacchetto in plastica contenente la biomassa di foglie e steli e, tramite un filtro, collezionato il succo cellulare fuoriuscente.



Figura 35 - Raccolta dei succhi cellulari.

Da ogni provetta è stato aspirato qualche mL di liquido per eseguire la lettura dei gradi Brix tramite rifrattometro digitale, mentre, per quanto riguarda il pH e la conducibilità elettrica, è stata impiegata una sonda Hanna ad immersione in grado di misurare entrambe le variabili.

Il contenuto di molibdeno all'interno dei tessuti vegetali è stato determinato impiegando campioni finemente macinati, precedentemente essiccati in stufa. In un secondo tempo questi sono stati trasferiti in un laboratorio apposito che ha provveduto all'analisi del contenuto in molibdeno.

Gli apparati radicali raccolti alla fine di ogni ciclo sono stati essiccati e pesati, sia freschi che secchi, tramite bilancia analitica. A seguito dei minimi quantitativi di biomassa finale, tuttavia, è stato deciso di unire in un unico campione l'apparato radicale delle tre repliche di ogni tesi in modo da ottenere per ogni ciclo un'unica tesi A, B e C solare e un'unica tesi A, B e C con integrazione luminosa. I mega-campioni sono stati successivamente polverizzati tramite un frullatore e consegnati ad un laboratorio di analisi per valutare la composizione della biomassa. La soluzione nutritiva campionata e conservata per ogni ciclo nel congelatore è stata preparata e inviata ad un ulteriore laboratorio per determinarne la composizione e quindi valutare il quantitativo di macro e micronutrienti presenti in essa.

4. RISULTATI

4.1 Parametri produttivi

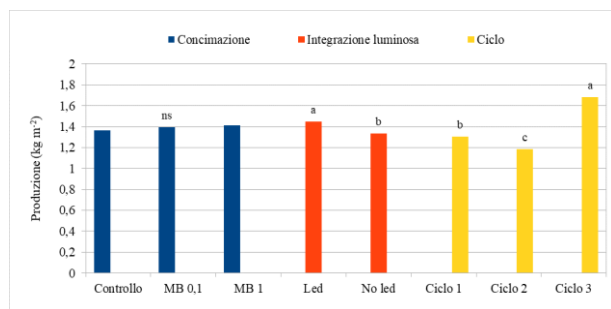
La produzione di biomassa commerciabile è risultata essere influenzata dal trattamento luminoso e dalla stagionalità (Fig. 36 A). L'integrazione luminosa ha indotto un aumento di prodotto del 8,46%, facendo registrare una produzione media di $1,45 \text{ kg m}^{-2}$ nelle tesi trattate con luce led e una di $1,33 \text{ kg m}^{-2}$ nelle tesi non illuminate. La stagionalità dei cicli ha consentito all'estivo di esprimere la massima produzione che ha raggiunto $1,68 \text{ kg m}^{-2}$, il 28,96% in più rispetto al primo ($1,30 \text{ kg m}^{-2}$) e il 41,72% in più rispetto al secondo ($1,19 \text{ kg m}^{-2}$). È stato riscontrato, inoltre, un effetto significativo dall'interazione tra luce e ciclo rispetto alla produzione (Fig. 36 B): nel terzo ciclo si è registrato un sensibile aumento della produzione nelle tesi trattate con luci a led facendo registrare $1,85 \text{ kg m}^{-2}$ rispetto a $1,51 \text{ kg m}^{-2}$; lo stesso effetto non si è verificato nei precedenti due cicli dove la differenza di produzione tra le tesi trattate e il testimone è stata di 40 g m^{-2} nel primo e 45 g m^{-2} nel secondo. Il trattamento con molibdeno, invece, non ha evidenziato aver effetti statisticamente significativi consentendo una produzione media di $1,39 \text{ kg m}^{-2}$.

La percentuale di sostanza secca della frazione aerea (Fig. 37), con il progredire della stagione ha subito una contrazione: il contenuto di ss è calato dal 7,78% del primo ciclo al 7,54% del secondo e al 6,89% del terzo con un decremento del 3,15% e del 9,27% rispettivamente. Le differenti concimazioni con molibdeno non hanno influito in maniera statisticamente significativa sul contenuto di ss che mediamente si è attestato al 7,41%. Il trattamento con led, invece, ha comportato un minor accumulo di sostanza secca facendo registrare una media del 7,29% rispetto al trattamento senza integrazione luminosa che ha accumulato il 3,15 % di ss in più.

La produzione di biomassa radicale è risultata essere influenzata dal trattamento luminoso e dalla stagionalità (Fig. 38 A). La sola radiazione solare ha indotto un aumento del 38,74%, facendo registrare una produzione media di 2,44 g pf. mentre nelle tesi non illuminate sono stati misurati 1,76 g pf. Il ciclo estivo ha espresso la massima produzione che ha raggiunto 4,25 g pf, il 356,98% in più rispetto al primo (0,93 g pf) e il 279,46% in più rispetto al secondo (1,12 g pf) risultati non significativamente differenti.

La percentuale di sostanza secca dell'apparato radicale (Fig. 38 B), presenta il massimo accumulo nel secondo ciclo, pari al 21,63%, sceso al 14,48% nel primo ciclo e al 10,71 % nel terzo con un decremento del 33,05% e del 50,48% rispettivamente. Le differenti concimazioni con molibdeno non hanno influito in maniera statisticamente significativa sul contenuto di ss che mediamente si è attestato al 15,60%.

A



B

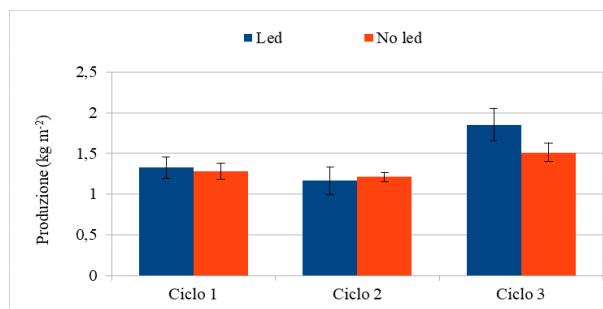


Fig. 36 – (A) Produzione di biomassa fogliare, espressa in kg m⁻², di Moutarde rouge metis coltivata in floating system in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo. (B) Effetto dell'interazione tra la differente stagionalità e l'impiego o meno di lampade a led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a livello della produzione fogliare di Moutarde rouge metis.

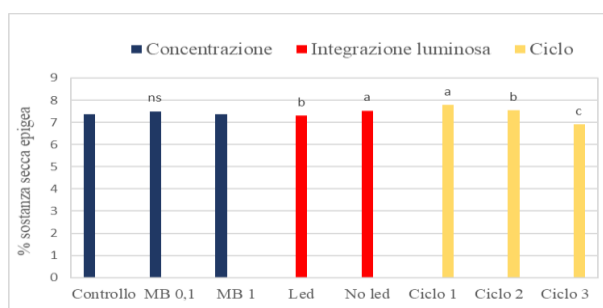
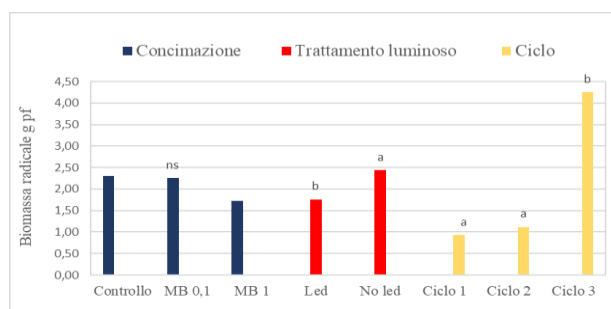


Fig. 37 – Percentuale di sostanza secca riscontrata nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivata in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo.

A



B

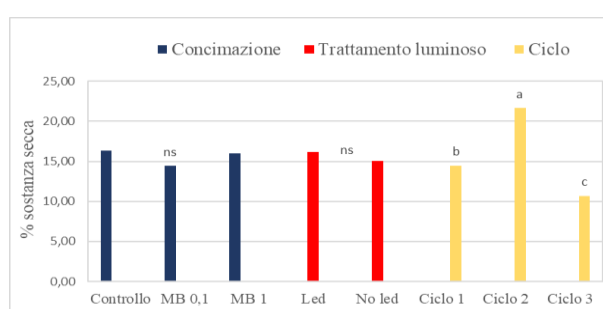


Fig. 38 – (A) Produzione di biomassa radicale, espressa in g pf, di Moutarde rouge metis coltivata in floating system in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo. (B) Percentuale di sostanza secca dell'apparato radicale nelle medesime condizioni precedentemente riportate.

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative con il test di Turkey ($p < 0.05$), ns indica differenza non statisticamente significativa, nei grafici delle interazioni è riportata come barra dell'errore la deviazione standard.

4.2 Efficienza d'uso dell'acqua (WUE), pH, °Brix ed EC

L'efficienza d'uso dell'acqua (WUE) (Fig. 39) delle differenti tesi è variata in maniera statisticamente significativi solo tra i cicli di coltivazione, mentre nel caso dei trattamenti luminosi e di fortificazione non sono stati riscontrati effetti. Il valore maggiore è stato ottenuto nel primo ciclo dove la WUE è stata di $0,17 \text{ kg l}^{-1}$ mentre nel secondo e terzo è stata di $0,013 \text{ kg l}^{-1}$ e $0,018 \text{ kg l}^{-1}$ rispettivamente.

Il pH (Fig. 40) è stato influenzato dalla sola stagionalità mentre i differenti trattamenti con molibdeno e l'integrazione luminosa non hanno restituito differenze significative facendo misurare una media di 5,6. Nel primo ciclo i succhi cellulari presentano un pH pari a 5,7 mentre nel secondo e terzo è sceso leggermente fino a 5,6.

Il grado zuccherino delle baby leaf (Fig. 41) risulta variare a seguito dei differenti trattamenti luminosi e alla stagionalità. Le tesi sottoposte ad integrazione con luce blu sono caratterizzate da $3,71^\circ \text{ Brix}$, il 2,70% in meno dei testimoni pari a $3,81^\circ \text{ Brix}$. Il ciclo estivo presenta un contenuto zuccherino sensibilmente inferiore pari a $3,15^\circ \text{ Brix}$, il 13,17% in meno rispetto ai cicli precedenti risultati non differenti e pari a $4,1^\circ \text{ Brix}$.

La conducibilità elettrica EC (Fig. 42) evidenzia differenze solo a livello della stagionalità mentre non subisce variazioni sensibili a seguito dei trattamenti luminosi e della concimazione con molibdeno. Il ciclo invernale (feb-mar) è caratterizzato da un EC leggermente superiore, $7,4 \text{ mS cm}^{-1}$, ma sufficiente a determinare una differenza significativa con il secondo ciclo pari a $7,2 \text{ mS cm}^{-1}$.

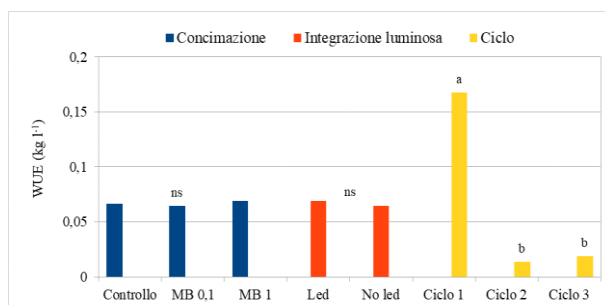


Fig. 39 – Water Use Efficiency espressa in kg l^{-1} di Moutarde rouge metis coltivata in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e ciclo produttivo.

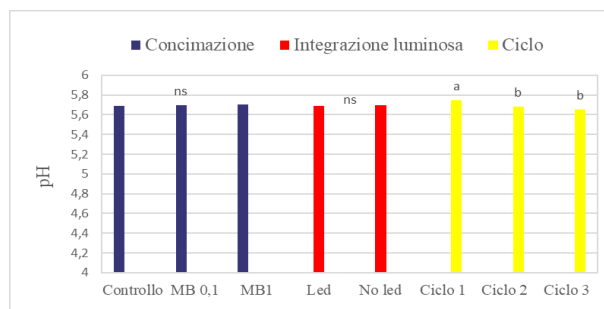


Fig. 40 – pH dei succhi vacuolari di Moutarde rouge metis coltivata in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo.

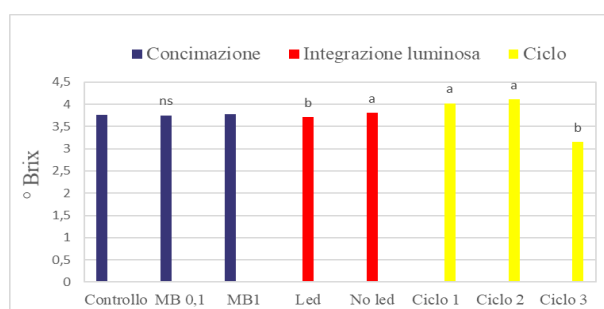


Fig. 41 – Grado zuccherino dei succhi vacuolari espresso in ° Brix di Moutarde rouge metis coltivata in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo

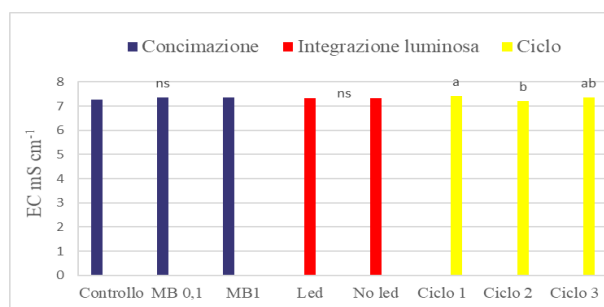


Fig. 42 – Conducibilità elettrica specifica dei succhi vacuolari espresso in mS cm^{-1} di Moutarde rouge metis coltivata in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo.

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative con il test di Turkey ($p < 0.05$), ns indica differenza non statisticamente significativa, nei grafici delle interazioni è riportata come barra dell'errore la deviazione standard.

4.3 Contenuto dei pigmenti fotosintetici

Le analisi qualitative effettuate su pigmenti, contenuto di polifenoli, sostanze antiossidanti e minerali, sono risultate essere molto variabili. I contenuti di clorofilla a (Fig. 43) si sono differenziati in maniera statisticamente significativa tra le tesi trattate con luci a led: la concentrazione di questo pigmento è stata di $795,81 \mu\text{g g}^{-1}$, l'11,58% in più rispetto alle tesi senza integrazione luminosa dove, invece, la concentrazione di clorofilla a è risultata essere $713,20 \mu\text{g g}^{-1}$. Non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra le diverse concimazioni e tra i differenti cicli per i quali il contenuto medio di clorofilla a è stato di $754,51 \mu\text{g g}^{-1}$. Lo stesso comportamento è stato riscontrato nel caso della clorofilla b (Fig. 44): le tesi senza integrazione luminosa hanno raggiunto in media $275,35 \mu\text{g Chl b g}^{-1}$, il 14,08% in meno dei tessuti illuminati con luce a led dove, invece, la media di clorofilla b contenuta nei tessuti edibili è stata di $314,13 \mu\text{g g}^{-1}$. Le analisi hanno inoltre evidenziato una differenza statisticamente significativa tra il primo e il terzo ciclo dove l'accumulo di clorofilla b è stato rispettivamente di $314,48 \mu\text{g g}^{-1}$ e $278,26 \mu\text{g g}^{-1}$, con una differenza del 13,02%. L'applicazione di differenti concentrazioni di molibdeno non ha influenzato l'accumulo di clorofilla b che si è attestato a $294,74 \mu\text{g g}^{-1}$. Per quanto riguarda il contenuto di carotenoidi, questo ha evidenziato un comportamento simile alla clorofilla (Fig. 45): si è riscontrata una differenza significativa tra le tesi trattate con luci a led e quelle non trattate che hanno registrato rispettivamente un livello di $217,48 \mu\text{g g}^{-1}$ e $202,31 \mu\text{g g}^{-1}$, ossia un accumulo di carotenoidi superiore del 7,46%. La stagionalità ha un effetto principale statisticamente significativo: primo e secondo ciclo non hanno rivelato alcuna differenza significativa mentre il terzo si discosta dai precedenti. Infatti, la concentrazione di carotenoidi nel primo ciclo, corrispondente a $212,35 \mu\text{g g}^{-1}$ e del secondo, di $224,19 \mu\text{g g}^{-1}$, sono risultate superiori a quelle del terzo ciclo, $193,15 \mu\text{g g}^{-1}$, rispettivamente il 9,94% e il 13,85% in meno. Per quanto riguarda le differenti concentrazioni con molibdeno, invece, i trattamenti non hanno restituito effetti significativi ed il contenuto di carotenoidi è stato in media di $209,90 \mu\text{g g}^{-1}$.

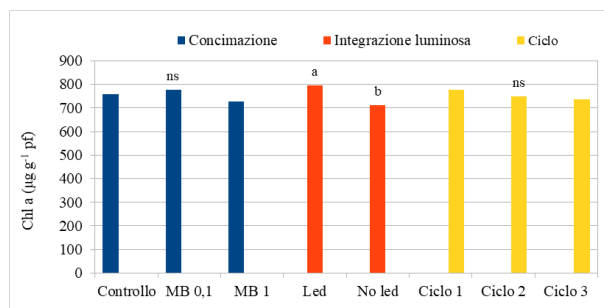


Fig. 43 – Contenuto di clorofilla a espresso in $\mu\text{g g}^{-1}$ pf nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo.

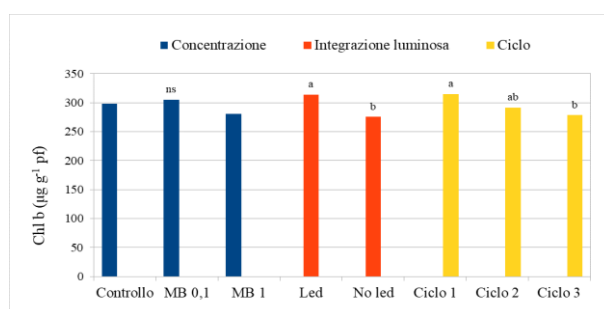


Fig. 44 – Contenuto di clorofilla b espresso in $\mu\text{g g}^{-1}$ pf nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo.

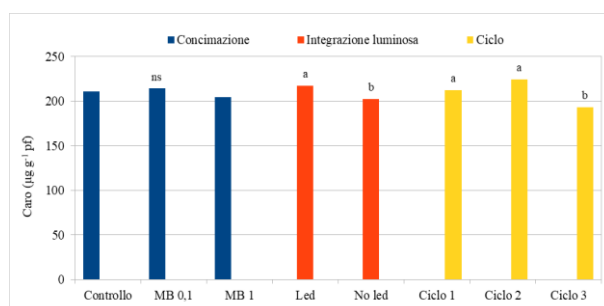


Fig. 45 – Contenuto di carotenoidi espresso in $\mu\text{g g}^{-1}$ pf nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system in funzione della concimazione con Mo, con e senza integrazione luminosa al led blu e del ciclo produttivo.

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative con il test di Tukey ($p < 0.05$), ns indica differenza non statisticamente significativa.

4.3 Contenuto delle molecole antiossidanti

Considerando l'importanza del contenuto in sostanze antiossidanti e polifenoli all'interno delle baby leaf, sono stati valutati gli effetti dei fattori allo studio su queste sostanze e delle loro interazioni. Nella determinazione del contenuto di sostanze antiossidanti (FRAP) su peso fresco (Fig. 46 A), i differenti trattamenti con molibdeno e integrazione luminosa hanno restituito variazioni non statisticamente significative presentando in media $13,66 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$. La stagionalità, invece, ha determinato un calo progressivo del contenuto di sostanze antiossidanti significativamente rilevante: queste si sono ridotte da $16,34 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ del primo ciclo a $13,68 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ del secondo e $10,96 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ del terzo, ossia, in termini percentuali, del 19,39% tra primo e secondo ciclo e del 24,87% tra secondo e terzo ciclo. L'analisi statistica ha inoltre evidenziato un'interazione significativa tra integrazione luminosa e stagionalità (Fig. 46 B): durante il primo ciclo l'illuminazione con led ha permesso alla biomassa aerea di accumulare un quantitativo di sostanze antiossidanti maggiore rispetto alle tesi non trattate, rispettivamente di $3,09 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ e $2,01 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$, il 53,57% in più. Durante il secondo e terzo ciclo, invece, il comportamento è stato opposto con le tesi non trattate riportanti un livello superiore di sostanze antiossidanti, rispettivamente del 13,46% e del 10%. L'analisi del Frap è stata eseguita anche sulla sostanza secca ottenendo risultati comparabili alla analisi svolta su fresco (Fig. 47 A): i trattamenti con molibdeno e l'integrazione luminosa non hanno statisticamente influito sul contenuto degli antiossidanti che si è attestato in media a $183,06 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ al contrario della stagionalità che ha influenzato il contenuto in maniera significativa. Il primo ciclo ha accumulato il livello di sostanze antiossidanti maggiore, ossia $36,57 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ mentre il secondo e il terzo, non statisticamente differenti, sono risultati essere rispettivamente a $22,06 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ (- 39,67%) e $27,30 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ (- 25,34%). Due interazioni, ciclo*concimazione con molibdeno e ciclo*trattamento luminoso, sono risultate significative rispetto all'accumulo di molecole antiossidanti (Fig. 47 B). Dalla prima interazione la concimazione MB1 determina un accumulo di sostanze antiossidanti, ossia $23,02 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$, maggiore rispetto alle altre due concimazioni che si arrestano a $20,44 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ nella tesi MB 0,1 e $195,22 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$ nel controllo. Nel secondo ciclo, il trattamento con MB 1 ha fatto registrare una concentrazione di antiossidanti minore del 6,1342% rispetto alla tesi MB 0,1 che invece si è rivelata presentare la maggior concentrazione di antiossidanti ($187,88 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$). Nel terzo ciclo si assiste a un ulteriore cambiamento poiché il controllo si rivela essere la miglior tesi in termini di contenuto di antiossidanti, $172,11 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$, maggiori del 3,838% rispetto al trattamento MB 0,1 ($165,74 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$) e del 22,64% rispetto a MB 1 ($140,34 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$).

L'interazione trattamento luminoso*ciclo (Fig. 47 C) ha evidenziato l'effetto positivo del led durante il primo ciclo, dove l'accumulo di antiossidanti è risultato superiore del 18,741% rispetto alle tesi non trattate aventi $191,97 \text{ g Fe}^{2+}\text{E kg}^{-1}$. Nel secondo e terzo ciclo, invece, l'illuminazione con led ha determinato un minor accumulo di sostanze antiossidanti rispetto ai non trattati, rispettivamente di

167,72 g Fe²⁺E kg⁻¹ e 191,96 g Fe²⁺E kg⁻¹ per il secondo ciclo (-12,627 %) e di 156,87 g Fe²⁺E kg⁻¹ e 161,92 g Fe²⁺E kg⁻¹ nel terzo ciclo (-3,114%).

Successivamente è stato preso in esame il contenuto di polifenoli sia sulla biomassa fresca che sulla sostanza secca. Nel primo caso (Fig. 48 A) le concimazioni con molibdeno e la stagionalità non hanno evidenziato effetti significativi con un accumulo medio di 1,65g kg⁻¹ sf di acido gallico (GAE). L'illuminazione con lampade a led ha determinato invece un calo significativo del contenuto totale di polifenoli: è stato infatti misurato il 9,74% in meno delle tesi non trattate che hanno accumulato un quantitativo di 1,73 g kg⁻¹ pf. È stata riscontrata l'interazione fra integrazione luminosa e trattamento (Fig. 48 B): mentre nel caso di MB 0,1 e 1 il contenuto di polifenoli è risultato simile in entrambe le condizioni di illuminazione. Un maggior accumulo di polifenoli è stato riscontrato nella biomassa del campione controllo non sottoposta a integrazione luminosa, la quale presenta 1,91 g kg⁻¹ pf, il 28,70% in più rispetto alle tesi trattate con i led che si arrestano a 1,48 kg⁻¹ pf. L'analisi del contenuto di polifenoli sulla sostanza secca (Fig. 49), non ha evidenziato alcun effetto statisticamente significativo per tutti i fattori allo studio raggiungendo, mediamente, 22,32 g kg⁻¹ ps.

Il contenuto di antocianine, espresse come mg cianidina su kg di biomassa fresca (Fig. 50 A) e peso secco (Fig. 50 B), non hanno evidenziato effetti significativi dei dei fattori allo studio accumulando, rispettivamente, una media di 0.71 g Cya kg⁻¹ ps e 0.052 g Cya kg⁻¹ pf.

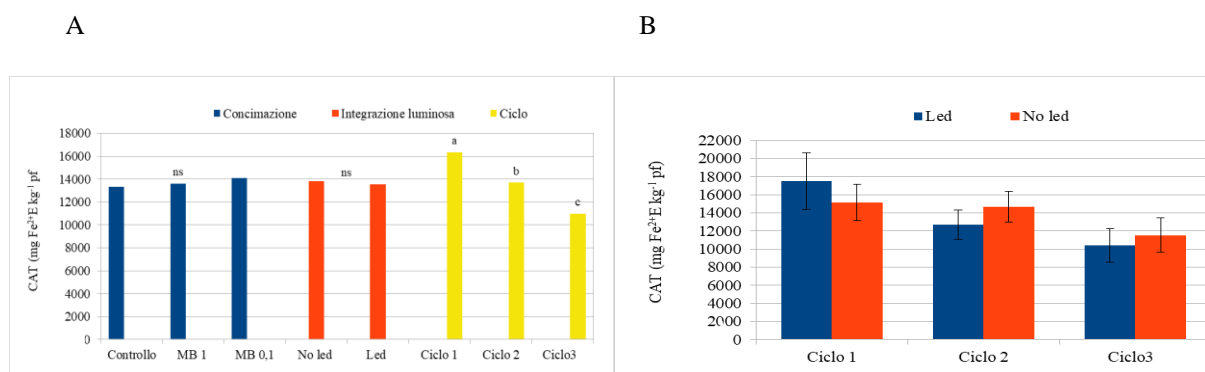


Fig. 46 – (A) Capacità antiossidante totale (CAT) espressa in mg Fe²⁺E kg⁻¹ pf riscontrata nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivata in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo. (B) Effetto dell'interazione tra la differente stagionalità e l'impiego o meno delle lampade a led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a livello della produzione fogliare di Moutarde rouge metis.

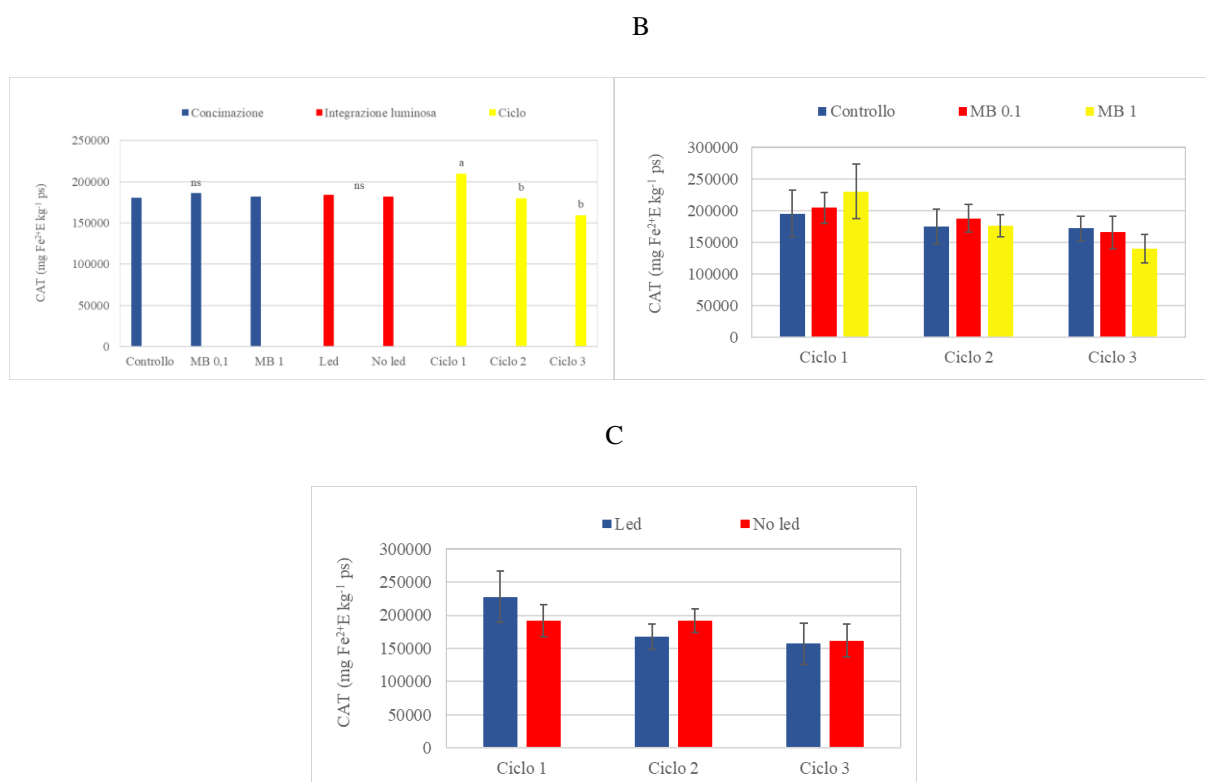


Fig. 47 – (A) Capacità antiossidante totale (CAT) espressa in mg Fe²⁺E kg⁻¹ ps riscontrata nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo. (B) Effetto dell'interazione tra il ciclo produttivo e l'applicazione di diverse dosi di Mo sulla CAT. (C) Effetto dell'interazione tra la differente stagionalità e l'impiego o meno delle lampade a led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a livello della CAT

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative con il test di Turkey ($p < 0.05$), ns indica differenza non statisticamente significativa, nei grafici delle interazioni è riportata come barra dell'errore la deviazione standard.

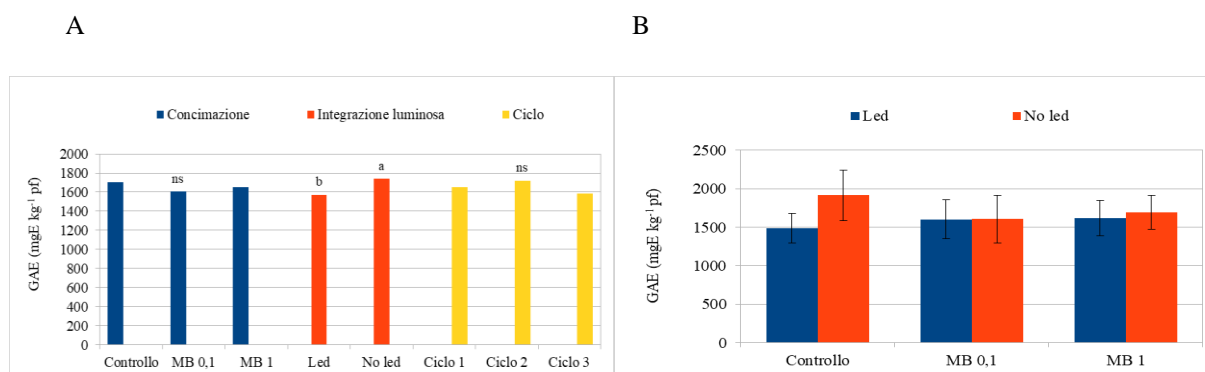


Fig. 48 – (A) Contenuto di polifenoli espresso in mg equivalenti di acido gallico (GAE) per kg pf riscontrato nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo. (B) Effetto dell'interazione tra la concimazione con molibdeno e l'impiego o meno delle lampade a led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sul contenuto di polifenoli espresso in mg equivalenti di acido gallico (GAE) per kg pf.

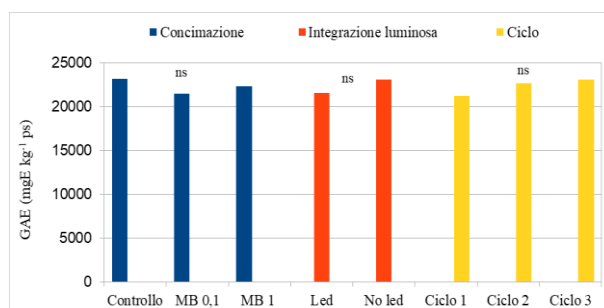


Fig. 49 – Contenuto di polifenoli espresso in mg equivalenti di acido gallico (GAE) per kg ps riscontrato nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo.

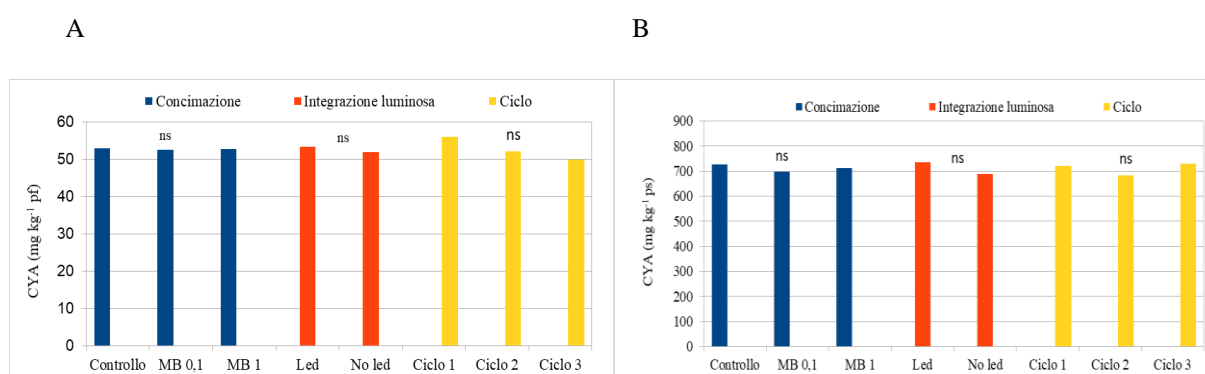


Fig. 50 – (A) Contenuto di antocianine espresso in mg di cianidina (CYA) per kg pf riscontrato nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo. (B) Contenuto di antocianine espresso in mg di cianidina (CYA) per kg ps riscontrato nelle medesime condizioni del precedente.

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative con il test di Tukey ($p < 0.05$), ns indica differenza non statisticamente significativa, nei grafici delle interazioni è riportata come barra dell'errore la deviazione standard.

4.4 Contenuto di Molibdeno, Magnesio e Zolfo

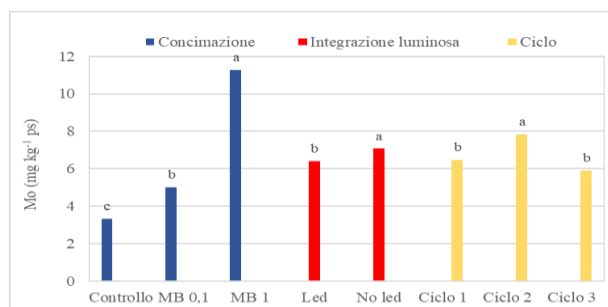
In termini di composizione minerale è stato valutato l'accumulo di molibdeno, magnesio e zolfo; tra questi, in particolare, il molibdeno ha restituito differenze significative per tutti i fattori principali allo studio (Fig. 51 A). La tesi che ha permesso il maggior accumulo nei tessuti edibili di molibdeno è la MB 1 con $11,28 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$, seguita dalla MB 0,1 con $4,74 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ e il controllo con $3,31 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$ ossia, in termini, il calo è stato del 55,60% tra MB 1 e MB 0,1 e del 33,82% tra MB 0,1 e il controllo. L'integrazione luminosa ha influito sull'accumulo di Mo favorendo le tesi non sottoposte alla luce a led: queste, infatti, hanno presentato una media di $7,07 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$, il 10,15% in più delle tesi trattate rimaste a $6,42 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$. La stagionalità ha restituito valori statisticamente significativi solo nel secondo ciclo permettendo alle piante di accumulare $7,85 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$, l'accumulo di molibdeno nel secondo e terzo ciclo invece, risultati non statisticamente differenti, è stato inferiore del 17,63% nel primo ciclo ($6,47 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$) e del 24,78% nel terzo ($5,91 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ps}$); è risultata inoltre un'interazione stagionalità*trattamenti con Mo (Fig. 51 B). Le piante trattate con MB 1 evidenziano un maggior accumulo di Mo in tutti e tre i cicli, mentre MB 0,1 e il controllo presentano un accumulo minore e dipendente dal ciclo stesso. Le baby leaf non trattate presentano una maggior concentrazione del metallo nel terzo ciclo rispetto al primo, invece, MB 1 ha determinato una miglior risposta in termini di accumulo nel ciclo 1 rispetto al terzo. La tesi MB 1 evidenzia inoltre una maggior intensità di risposta in assimilazione di Mo nei diversi cicli, mentre la differenza nell'intensità d'accumulo nelle tesi MB 0,1 e controllo è minore.

Il contenuto in magnesio (Mg) è risultato statisticamente significativo per i fattori "integrazione luminosa" e "stagionalità", mentre i diversi trattamenti con molibdeno non hanno influito sul suo accumulo pari a $5,56 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$ (Fig. 52 A). Le tesi sottoposte ad integrazione luminosa con luci a led hanno presentato una concentrazione di magnesio di $5,35 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$, il 7,29% in meno rispetto alle tesi non illuminate che hanno invece accumulato $5,77 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$. I differenti cicli hanno influito sull'accumulo di Mg facendone registrare il massimo accumulo nel secondo ciclo, pari a $6,93 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$, il 27,19% in più del primo ($5,45 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$) e il 61,07% in più rispetto al terzo ($4,30 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$). Risulta inoltre un'interazione integrazione luminosa*stagionalità (Fig. 52 B): in tutti i cicli si verifica ad un maggior accumulo di Mg nelle tesi non sottoposte alla luce a led, anche se non con la stessa intensità. Nel secondo ciclo infatti è possibile notare un'evidente differenza d'accumulo di Mg pari a $0,94 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$, essendo stati accumulati $7,40 \text{ g Mg kg}^{-1} \text{ ps}$ in assenza di led e $6,46 \text{ g Mg kg}^{-1} \text{ ps}$ nelle tesi coltivate con intensificazione luminosa. Nel primo e terzo ciclo invece la differenza tra le piante coltivate con integrazione luminosa e le piante controllo, non risulta essere significativa con valori rispettivamente di $0,15 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$ e di $0,16 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$.

lo zolfo come il Mg ha mostrato differenze significative influenzate all'illuminazione con luci a led e alla stagionalità mentre il trattamento con molibdeno non ha influito sul suo accumulo, in media di $8,53 \text{ g kg}^{-1} \text{ ps}$ (Fig. 53 A). L'assenza dell'integrazione luminosa ha permesso alle piante di

accumulare un quantitativo di zolfo maggiore rispetto a quelle coltivate con l'integrazione led: l'accumulo è stato rispettivamente di 8,84 g S kg⁻¹ e 8,22 S kg⁻¹ ps, ossia il 7,64% in più. La stagionalità ha comportato un maggior accumulo di S nel secondo ciclo, differenziandosi dagli altri due che invece risultano differenti. Il suo contenuto è stato di 9,32 g kg⁻¹ ps rispetto al primo ciclo (8,19 g kg⁻¹ ps, - 12,10%), e al terzo (8,08 g S kg⁻¹ ps, - 13,30%). Un'interazione significativa fra stagionalità e integrazione luminosa ha determinato un differente accumulo di S nei tessuti fogliari (Fig. 53 B). L'assenza dell'integrazione delle luci al led ha determinato un maggior accumulo di S in tutti i tre cicli, tuttavia, la differenza tra tesi con e senza integrazioni luminose, è stata maggiore nel secondo ciclo, mentre nel primo e terzo, la differenza è stata minore: 43,17 mg kg⁻¹ ps, 1169.94 mg kg⁻¹ ps e 671.26 mg kg⁻¹ ps.

A



B

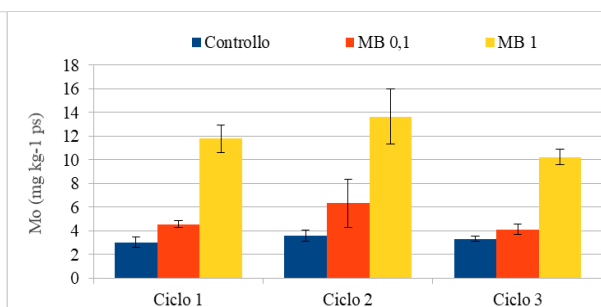
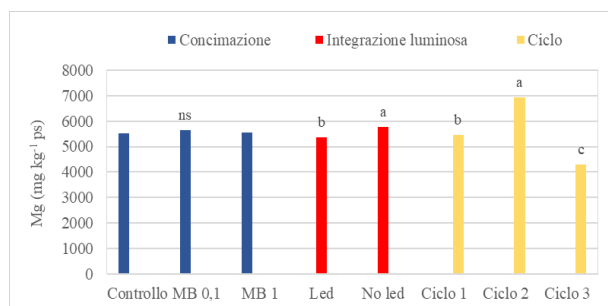


Fig. 51 – (A) Contenuto di molibdeno espresso in mg di Mo kg⁻¹ ps riscontrato nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo. (B) Effetto dell'interazione tra differenti dosi di Mo e la stagionalità (ciclo) espressa in mg Mo kg⁻¹ ps.

A



B

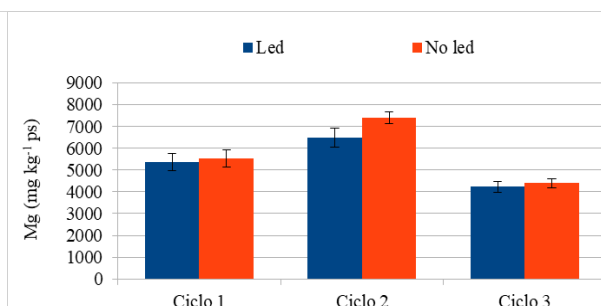
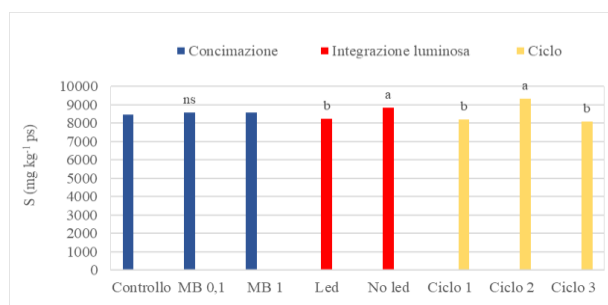


Fig. 52 – (A) Contenuto di magnesio espresso in mg di Mg kg⁻¹ ps riscontrato nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system, in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo. (B) Effetto dell'interazione tra i differenti cicli produttivi e l'impiego o meno di led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) espresso in mg Mg kg⁻¹ ps

A



B

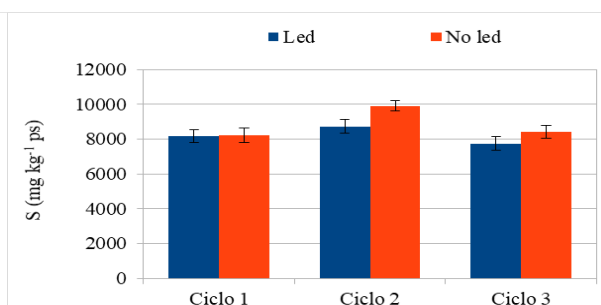
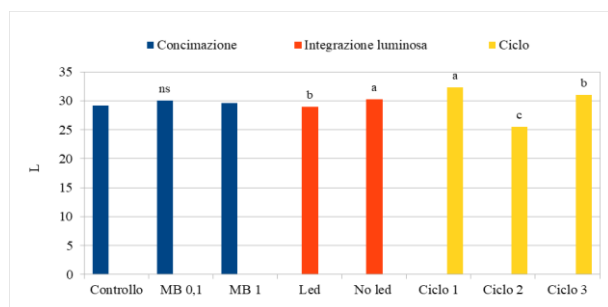


Fig. 53 – (A) Contenuto di zolfo espresso in mg di S kg⁻¹ ps riscontrato nelle foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system in funzione della concimazione con Mo, trattamento luminoso con led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo produttivo. (B) Effetto dell'interazione tra la stagionalità e l'impiego o meno di led blu (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) espresso in mg S kg⁻¹ ps.

4.5 Colorazione

Considerando che la Moutarde rouge metis è una varietà commerciale appartenente alla famiglia delle Brassicacee, la colorazione risulta quindi un carattere importante ai fini commerciali, sono stati quindi misurati i parametri colorimetrici L, a, b e croma. L'analisi dell'indice L (Fig. 54 A) ha restituito differenze significative legate all'illuminazione con led e alla stagionalità mentre il molibdeno ha restituito valori di L non significativi, in media pari a 29,61. L'illuminazione ha determinato una minor luminosità delle foglie con L pari a 28,99, rispetto alle tesi non trattate risultate con un L di 30,22, il 4,27% in più. Per quanto riguarda la stagionalità, invece, il primo ciclo è stato caratterizzato dalle foglie più luminose con L pari a 32,35, seguite da quelle del terzo ciclo con L 30,99 e infine dal secondo con foglie aventi un L di 25,47. In termini relativi il calo è stato rispettivamente di 4,36% e del 21,68%. Nel caso della luminosità è risultata esserci un'interazione statisticamente significativa stagionalità*integrazione luminosa (Fig. 54 B): durante il primo ciclo, l'impiego dei led ha determinato un valore di L superiore rispetto alle tesi non trattate, mentre nel secondo e terzo ciclo le foglie non illuminate artificialmente hanno presentato un L maggiore di quelle trattate. Nello specifico L del primo ciclo è stato pari a 33 per le foglie con integrazione luminosa, mentre le non trattate hanno presentato un L di 31,70, nel secondo e terzo ciclo, invece, la situazione è inversa: L dei trattati è stato rispettivamente pari a 24,12 e a 29,85 mentre le tesi non illuminate hanno presentato un L rispettivamente di 26,83 e 32,14. Il parametro colorimetrico a* (Fig. 55) ha presentato differenze statisticamente significative solo a seguito della stagionalità: questo è risultato maggiore nel secondo ciclo, raggiungendo una media di 6,94, a seguire vi è il primo ciclo, con un valore di a pari a 5,98 e infine il terzo arrestatosi a un valore di 4,99. Per quanto riguarda i trattamenti con molibdeno e l'integrazione luminosa, invece, a* è stato in media 5,97. Il parametro b* (Fig. 56 A), a differenza di a*, ha evidenziato differenze a seguito dell'integrazione luminosa: i led hanno determinato valori di b* pari a -1,83, il 77,94% in più delle tesi non sottoposte a led dove in media si è registrato un b* pari a -1,03. Dall'analisi statistica dei dati raccolti è risultata un'interazione statisticamente significativa trattamento*integrazione luminosa (Fig. 56 B): a differenza del controllo e del trattamento MB 0,1, dove il led ha fatto registrare rispetto alle tesi non illuminate valori di b* più bassi, rispettivamente di -1,74 e -2,31, nella tesi MB 1 i led hanno determinato un valore di b* più alto, rispettivamente di -1,43 e -1,54. L'ultimo parametro colorimetrico analizzato è croma: questo presenta differenze statisticamente significative solo a seguito della stagionalità mentre la concimazione con Mo e l'integrazione con led non hanno influito significativamente sul valore di croma, rimasto a 6,39. Il secondo ciclo presenta croma maggiore, pari a 7,29, segue il primo con un livello croma di 6,34, il 12,99% in meno e infine il terzo con croma pari a 5,55, il 23,80% in meno rispetto al secondo ciclo.

A



B

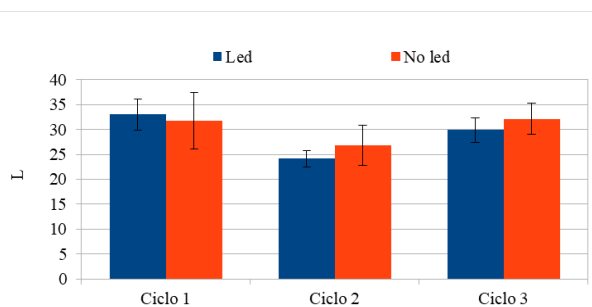


Fig. 54 – (A) Valore di L misurato tramite un colorimetro Minolta prendendo in esame 5 campioni di foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system per ogni tesi (controllo, MB 0,1 MB 1), sia trattate con luci a led blu che non sottoposte all'integrazione luminosa. (B) Effetto dell'interazione tra i differenti cicli produttivi e l'impiego o meno di led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sul valore L.

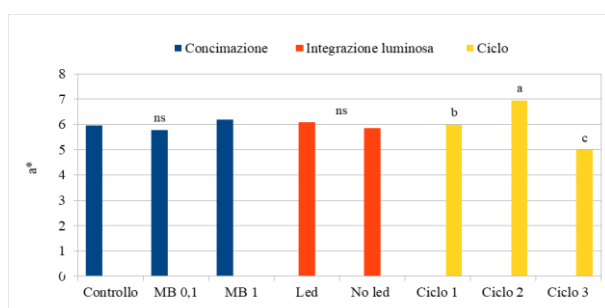
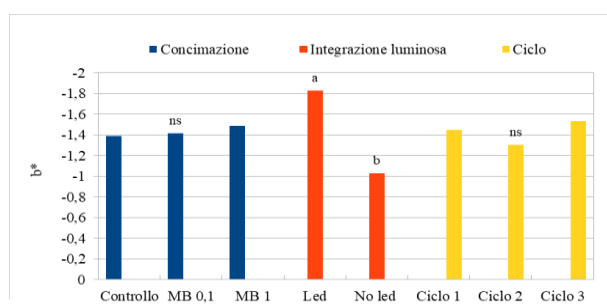


Fig. 55 – Valore di a* misurato tramite un colorimetro Minolta prendendo in esame 5 campioni di foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system per ogni tesi (controllo, MB 0,1 MB 1), sia trattate con luci a led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) che non sottoposte all'integrazione luminosa.

A



B

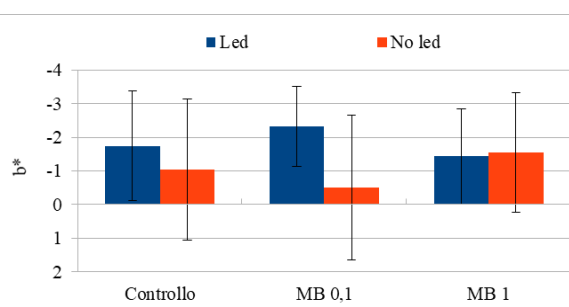


Fig. 56 – (A) Valore di b* misurato tramite un colorimetro Minolta prendendo in esame 5 campioni di foglie di Moutarde rouge metis coltivate in floating system per ogni tesi (controllo, MB 0,1 MB 1), sia trattate con luci a led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) che non sottoposte all'integrazione luminosa. (B) Effetto dell'interazione tra le differenti concimazioni con Mo e l'impiego o meno di led blu ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sul valore b*.

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative con il test di Turkey ($p < 0.05$), ns indica differenza non statisticamente significativa, nei grafici delle interazioni è riportata come barra dell'errore la deviazione standard.

5. DISCUSSIONE

La resa in biomassa potenzialmente commerciabile è un parametro che spesso ricopre un ruolo predominante nella scelta delle varietà da coltivare poiché viene tradotto, da parte dell'agricoltore, in reddito. Dall'elaborazione dei dati raccolti emerge uno scenario concorde con Marin et al., (2015) secondo il quale le baby leaf raccolte in tarda primavera (maggio) risultano avere un maggior peso in biomassa fresca caratterizzato però da un minor contenuto in sostanza secca. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nelle condizioni climatiche più favorevoli quali intensità luminosa e fotoperiodo più lungo, essendo fattori che inducono una crescita più rapida durante il terzo ciclo. A parità di durata di ciclo produttivo, infatti, la biomassa sviluppata nei mesi più freddi è inferiore rispetto a quella prodotta nei mesi con temperature più miti, mentre il contenuto di sostanza secca è maggiore nelle condizioni di crescita più lenta, ossia nei periodi più freddi, come inoltre è stato osservato da Kang et al., (2013). La discrepanza emersa dall'elaborazione dei dati tra primo e secondo ciclo è presumibilmente imputabile alla minor durata del ciclo stesso, rispettivamente di 20 e 28 giorni, che ha determinato una minor resa. L'analisi statistica ha evidenziato inoltre una maggior produzione di biomassa epigea ed un incremento del contenuto di sostanza secca nelle tesi coltivate con integrazione a led, risultato analogo riscontrato nello studio di Li et al. (2019). Secondo Muneer et al., (2014), le luci a led blu inducono un maggior tasso di fotosintesi rispetto a lunghezze d'onda del rosso e del verde, data la miglior predisposizione dei fotosistemi a fissare la CO₂ se stimolati dalla questa radiazione. Ulteriore conferma giunge da Ouzounis et al., (2015) secondo i quali hanno la luce blu aumenta sensibilmente la conduttanza stomatica delle foglie e, di conseguenza, la quantità di CO₂ assorbita necessaria per lo svolgimento della fotosintesi netta. La miglior conduttanza stomatica e l'elevato tasso di fotosintesi possono, dunque, essere tradotti in un maggior accumulo di biomassa e resa.

Per quanto riguarda l'apparato radicale il ciclo estivo è stato caratterizzato da un sensibile aumento della biomassa, incremento osservato anche da Fallovo et al. (2009), associato ad una riduzione della sostanza secca. Molto probabilmente questo fenomeno è legato alle condizioni termiche e fotoperiodiche che inducono una maggior ritmo di accrescimento a discapito dell'accumulo di sostanza secca. Interessante è l'effetto dell'integrazione luminosa sul rapporto shoot/root poiché il supplemento ne determina incremento: ciò si traduce in un maggior sviluppo della parte aerea rispetto all'apparato radicale, quindi in un vantaggio per il produttore. La luce blu, come riscontrato da Chen et al. (2016), sembra quindi incentivare l'accrescimento epigeo rispetto all'ipogeo.

Fattore	shoot/root ratio
Controllo	1,39
MB 0,1	1,56
MB 1	1,09
Led	1,55
No led	1,14
Ciclo 1	1,83
Ciclo 2	1,73
Ciclo 3	0,49

Tabella 4 – Shoot/root ratio delle baby leaf di Moutarde rouge metis contivate in condizioni di idroponica in floating system.

La miglior WUE registrata è stata ottenuta nel primo ciclo mentre, nel secondo e terzo, non sono state riscontrate differenze significative. La spiegazione è da ricercare nelle temperature più basse verificatesi durante la prima semina che hanno determinato un minor tasso di evapotraspirazione e quindi una miglior efficienza d'uso dell'acqua.

Passando dal ciclo invernale all'estivo si assiste ad un calo del contenuto di solidi solubili (° Brix), comportamento osservato anche da Aubert et al. (1999). Si ipotizza infatti che la maggior produzione di biomassa determini un consumo di saccarosio ed altri zuccheri più importante e ciò spiegherebbe il minor livello di °Brix del terzo ciclo.

Dall'elaborazione dei dati raccolti durante la prova sperimentale, si osserva come le baby leaf del primo ciclo di coltivazione sono caratterizzate da un contenuto di sostanze antiossidanti maggiore mentre, con il proseguire della stagione, la capacità antiossidante totale presente nelle foglie cala progressivamente. Condizioni di temperatura minore inducono una maggior attività della PAL, enzima chiave coinvolto nella pathway della biosintesi di polifenoli e di molecole antiossidanti, come verificato da Boo et al., (2011). Considerando tuttavia che l'analisi sperimentale è stata condotta in ambiente protetto, caratterizzato da un sistema automatico di apertura e chiusura dipendente dalla temperatura, si può presupporre che l'effetto di questo fattore sia relativamente limitato. Al contrario può risultare molto più valida l'ipotesi secondo la quale un periodo di coltivazione più lungo determini una maggior concentrazione dei composti secondari nei tessuti vegetali. Va inoltre considerato che un elevato contenuto di polifenoli non corrisponde ad una maggior capacità antiossidante totale; non vi sono, infatti, differenze statisticamente significative tra i diversi cicli di coltivazione, nonostante di norma la capacità antiossidante sia correlata al contenuto di polifenoli (Hasan et al., 2017). In questo lavoro di tesi, si può ipotizzare che l'elevata capacità antiossidante totale riscontrata nel primo ciclo dipenda dall'accumulo di altri composti con tali proprietà come, ad esempio, β -carotene, glucosinolati, vitamina C e molecole in grado di detossificare le specie reattive

dell'ossigeno (ROS). Dalle analisi statistiche, risulta un'interazione significativa ciclo*integrazione luminosa: Li et al., (2012) e successivamente Li et al., (2019), hanno riscontrato che l'illuminazione con luci blu favorisce l'accumulo di vitamina C e, in misura minore, di altri composti antiossidanti, influenza individuata anche da Chen et al., (2016). Questa interazione potrebbe quindi spiegare la maggior capacità antiossidante totale risultata nel primo ciclo, nonostante la bassa concentrazione di polifenoli; mentre il calo di potere antiossidante del secondo e terzo ciclo può essere dovuto in parte alla minor attività dell'enzima PAL e, in misura maggiore, alla contrazione del ciclo colturale, ridotto dai 28 giorni del primo ai 20 e 21 giorni durante il secondo e terzo ciclo.

Se dalla letteratura emerge una correlazione positiva tra l'impiego della radiazione led blu e l'aumento del contenuto di polifenoli (Johkan et al., 2010), in questo studio, invece, il maggior accumulo di polifenoli è stato rilevato nelle baby leaf non soggette all'integrazione luminosa. Le cause di tale discrepanza potrebbero essere imputabili al genotipo e all'intensità luminosa: Taulavuori et al., (2016) hanno riscontrato una dipendenza specie-specifica nell'accumulo di polifenoli mentre nello studio eseguito da Li et al., (2019) l'accumulo di queste molecole è risultato non significativo fino al raggiungimento di un'intensità della radiazione blu pari a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. L'applicazione di $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e l'impiego della varietà Moutarde rouge metis potrebbero determinare quindi la sintesi di composti antiossidanti diversi dai polifenoli come, ad esempio, l'acido ascorbico (vit. C).

In termini di pigmentazione, le baby leaf sottoposte a integrazione luminosa presentano un accumulo di carotenoidi superiore rispetto a quelle non trattate, come riporta lo studio eseguito da Johkan et al. (2010). I carotenoidi sono pigmenti con funzione antiossidante, in particolare proteggono tutto il sistema fotosintetico dall'eccessiva esposizione alla radiazione solare dissipando l'energia luminosa in eccesso. Queste molecole, inoltre, ricoprono un ruolo fondamentale all'interno del fotosistema: fungono da carrier trasferendo l'energia luminosa dalle clorofille (Li et al., 2019; Ouzounis et al., 2015). L'incremento dei carotenoidi all'interno dei tessuti vegetali può quindi essere imputato all'utilizzo di integrazione luminosa, inoltre Li et al., (2012) e Johkan et al. (2010) hanno verificato come il maggior livello di carotenoidi migliori l'assorbimento luminoso e, di conseguenza, la fotosintesi.

Il tenore di clorofilla a e b all'interno dei tessuti vegetali misurato durante la coltivazione, è stato maggiore nelle tesi sottoposte ad integrazione luminosa, in accordo con il trend misurato da Li et al. (2012), Ouzounis et al., (2015) e Li et al. (2019). La clorofilla a e b sono pigmenti che assorbono nella lunghezza d'onda del blu con picco rispettivamente di 450 nm e 470 nm e la loro importanza risiede nell'assorbimento e successivo trasferimento dell'energia luminosa ai centri di reazione dei fotosistemi (Ouzounis et al., 2015). L'adozione di lampade a led blu per l'integrazione luminosa delle baby leaf potrebbe contribuire a garantire un maggior reddito per il produttore in termini di produzione, tuttavia in questo caso l'incremento di produzione è imputabile alla maggior disponibilità di radiazione solare tipica dei cicli estivi. L'effetto della stagionalità ha avuto ripercussioni più

marcate sul contenuto di clorofilla b e carotenoidi, risultati infatti statisticamente differenti tra primo e terzo ciclo. Kleinhenz et al., (2003), sostengono che temperature generalmente più basse favoriscono l'accumulo di clorofilla a, b e carotenoidi all'interno dei tessuti vegetali, tuttavia, essendo stata condotta questa prova in ambiente protetto, il calo del contenuto dei pigmenti è probabilmente dovuto in buona parte all'incremento della radiazione solare.

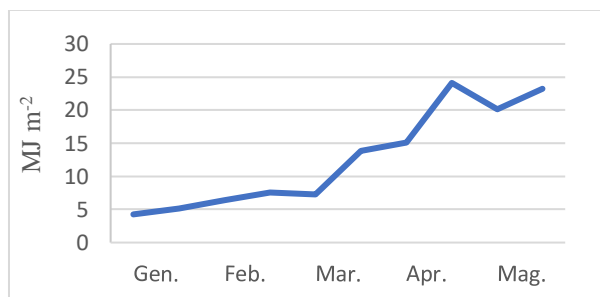


Figura 57 – radiazione solare globale, Legnaro (ARPAV).

Analizzando i dati inerenti all'accumulo dei minerali, emerge un legame tra la differente stagionalità del periodo di coltivazione e il loro accumulo. Nel caso di molibdeno e zolfo, infatti, il secondo ciclo presenta un quantitativo di elementi accumulati nei tessuti vegetali superiore al primo e al terzo, risultati invece tra loro non statisticamente significativi. Un trend simile è stato osservato da Tachibana (1987), il quale ha posto a confronto varietà più o meno tolleranti a basse temperature di melone: temperature più basse limitavano il contenuto di elementi per le varietà più sensibili alle basse temperature, mentre, prendendo in esame varietà più tolleranti, è emerso come a temperature più alte il contenuto di elementi assorbiti diminuisse. Grazie a questo studio si può dunque ipotizzare che, nel caso di Mo e S, la varietà Moutarde ruoge metis prediliga temperature medio-basse.

Il Mg è un elemento particolarmente importante poiché coinvolto nella biosintesi delle molecole di clorofilla. A differenza degli altri elementi analizzati presenta una differenza statisticamente significativa in termini di accumulo passando, in ordine decrescente, dal secondo al primo e al terzo ciclo: si può dunque supporre che l'assorbimento di questo elemento sia meno sensibile alle basse temperature. L'importanza nell'accumulo di questo minerale è facilmente comprensibile grazie all'influenza positiva tra il suo accumulo e il contenuto di clorofille: nel terzo ciclo infatti sono stati riscontrati i valori più bassi sia in termini di clorofille che di Mg. Una correlazione tra temperatura e contenuto di Mg è stata riscontrata anche da Chong e Ito (1982), i quali hanno osservato come in pomodoro a temperature medie (20-25 °C) il contenuto di Mg sia maggiore, rispetto a temperature più basse (15°C) e più alte (30°C). È quindi verosimile che il maggior assorbimento di Mo, Mg e S nel secondo ciclo sia legato al maggior contenuto di ossigeno disciolto nella soluzione oltre alle temperature più favorevoli: stress termici possono infatti agire negativamente sulla crescita e sull'accumulo di minerali. Le vasche impiegate nella sperimentazione erano provviste di un sistema di ossigenatori che garantiva l'adeguata concentrazione di ossigeno disciolto nella soluzione al fine

di evitare l'asfissia dell'apparato radicale in quanto l'incremento della temperatura, come appurato da Chong e Ito (1982), determina un calo del contenuto di ossigeno disciolto in acqua. Dalle nostre sperimentazioni risulta un maggior accumulo di Mo, Mg e S nei tessuti delle baby leaf non sottoposte ad integrazione luminosa tuttavia la spiegazione di tale comportamento deve essere oggetto di ulteriori studi e verifiche.

Durante le analisi di laboratorio si è deciso di verificare eventuali correlazioni nell'assorbimento di S e Mg in presenza di molibdeno. Secondo una ricerca condotta da Abdin et al., (2003) la presenza di Mo e S determina un incremento dei parametri di crescita grazie al loro ruolo nel ciclo dell'azoto; inoltre, sembrerebbero migliorare la resa e la qualità di cavolo in termini di proteine e acido ascorbico. L'interazione tra Mo e S ad alti livelli di concentrazione, a causa della loro competizione nell'assorbimento, essendo entrambi anioni, potrebbe determinare effetti negativi. Dall'elaborazione statistica dei dati però, all'aumentare della concentrazione di Mo non risultano effetti sull'accumulo di S nei tessuti fogliari: la concentrazione di 1 mg L^{-1} potrebbe dunque non essere sufficiente per indurre effetti d'antagonismo. Uno studio condotto da Purakayastha e Nad (1998) ha evidenziato come l'aumento di Mo, sia in presenza che assenza di S, determina un incremento del contenuto di Mg in frumento. La maggior concentrazione di Mo, S e Mg nel secondo ciclo, è verosimilmente imputabile quindi sia alle miglior condizioni ambientali che all'effetto positivo di Mo sull'assorbimento di Mg, oltre al rapporto di collaborazione tra Mo e S che richiama, all'aumentare della concentrazione di Mo, un maggior assorbimento di S.

La presenza di molibdeno a livello del controllo, ossia delle baby leaf coltivate con la soluzione nutritiva esente dall'aggiunta del metallo dipende dalla naturale presenza di questo microelemento nell'acqua e nei composti minerali utilizzati nella preparazione delle soluzioni nutritive.

La tesi B della nostra sperimentazione ha previsto l'aggiunta di 1 mg Mo l^{-1} alla soluzione, rispetto alla tesi A dove invece è stato apportato $0,1 \text{ mg l}^{-1}$, l'incremento del metallo accumulato nei tessuti delle baby leaf, tuttavia, non è stato proporzionale all'aumentare della sua concentrazione. Lo stesso comportamento è stato riscontrato in uno studio eseguito da Sabatino et al., (2019) su pomodoro, dove, all'aumentare della concentrazione di Mo presente nella soluzione nutritiva, corrisponde un aumento del contenuto del minerale nei tessuti vegetali ma in modo non proporzionale.

La Moutarde rouge metis è una varietà di senape caratterizzata da foglie con colorazione violacea, il cui valore commerciale risiede nella sapidità e nell'appetibilità del colore. L'effetto della radiazione solare sulla pigmentazione, e quindi sul colore, diventa così un fattore di particolare importanza. Un ampio studio eseguito da Owen e Lopez (2015) ha confermato i risultati riscontrati, in cui si evidenzia come il trattamento di integrazione luminosa determini un progressivo abbassamento di L ed un valore b^* più negativo ossia tendente maggiormente al blu, al contrario del valore a^* che non ne viene influenzato. Risulta esserci un'interazione significativa tra trattamento luminoso e stagionalità: nel primo ciclo i led hanno determinato una L più alta, nel secondo e terzo ciclo, invece, si assiste a

un'inversione di tendenza, con le tesi non trattate caratterizzate da un valore di L più alto. Questo risultato è confermato anche da un valore di a^* più basso ($>$ verde), giustificato inoltre da una differenza statisticamente significativa del contenuto di clorofille tra primo e terzo ciclo.

La pigmentazione delle antocianine varia in funzione del pH: virano da rosso a pH molto acido (< 4), a blu-viola in condizioni intermedie (4-7) a giallo-verde a pH basico (> 7). In questo studio non sono stati riscontrati valori statisticamente significativi di antocianine, ma va sottolineato il basso tenore di polifenoli presenti, categoria a cui appartengono i flavoni che sono diretti precursori delle antocianine. Il metodo impiegato per la loro determinazione, inoltre, si è basato sulla valutazione del contenuto totale espresso come concentrazione di cianidina, mentre vi sono moltissime altre molecole appartenenti a questo gruppo. Un'interessante lavoro presentato da Hale et al., (2001) ha valutato l'accumulo di molibdeno nei tessuti vegetali in funzione al contenuto di antocianine: tramite l'utilizzo di mutanti incapaci di sintetizzare questi pigmenti, gli autori hanno infatti individuato uno stretto rapporto tra il loro contenuto e il Mo. I ricercatori hanno osservato come la senape indiana accumulasse pigmento blu (antocianine), nelle cellule degli strati periferici con intensità maggiore all'aumentare della concentrazione di molibdeno. Le stesse cellule presentavano inoltre un maggior accumulo di molibdeno e la colorazione si verificava solo nelle piante non mutate e quindi caratterizzate dalla presenza di antocianine. Questa relazione potrebbe quindi spiegare la minima variazione del valore di b^* all'interno della tesi MB 1, molto più marcata invece nelle tesi MB 0,1 e controllo e ben visibile in funzione dell'integrazione luminosa impiegata nella tesi.

6. CONCLUSIONI

La carenza di micronutrienti e vitamine nella dieta umana rappresenta una nuova sfida per il mondo scientifico, poiché agendo su tali mancanze è possibile attenuare la gravità di alcune malattie come ad esempio l'anemia e la xeroftalmia. Le maggiori carenze a livello mondiale sono determinate dalla scarsa assunzione di ferro, zinco, iodio e vitamina A, problematiche non solo circoscritte ai Paesi più poveri ma che ad oggi coinvolgono anche diverse Nazioni dell'emisfero boreale. La “fame nascosta”, ossia la malnutrizione dipendente dalla scarsa assunzione di micronutrienti, comporta un indebolimento del sistema immunitario colpendo anche lo sviluppo fisico e mentale: da qui nasce la necessità di fortificare gli alimenti. Questo studio si è posto come obiettivo la fortificazione di una baby leaf con molibdeno al fine di incrementarne la concentrazione nei tessuti edibili fornendo un alimento appetibile al mercato. L'aumento di concentrazione di molibdeno nelle foglie (+259.52% nel trattamento MB 1 rispetto al controllo) non ha determinato effetti negativi sulla produzione e sulla sintesi dei principali metaboliti come clorofille, sostanze antiossidanti e polifenoli: è stato quindi ottenuto un prodotto con valore aggiunto senza particolari modifiche rispetto una baby leaf di Moutarde rounge metis tradizionale. La differente stagionalità dei cicli produttivi ha comportato sensibili variazioni in termini di produzione (+41.18% nel terzo ciclo rispetto al secondo) e colore; tuttavia sono soggette a queste fluttuazioni quali-quantitative tutte le baby leaf, indipendentemente dalla biofortificazione.

L'applicazione delle lampade a led blu ha determinato un leggero incremento (+9%) della produzione a discapito dell'accumulo di sostanza secca, determinando inoltre, come previsto, una maggior sintesi delle clorofille a, b e dei carotenoidi. L'assenza di un effetto sull'accumulo di antocianine derivato dall'utilizzo della radiazione blu è risultato essere alquanto insolito e necessita di ulteriori studi; tuttavia è ipotizzabile che la differenza non significativa tra l'integrazione luminosa e la sola luce solare sia dovuta alla bassa intensità impostata, pari a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Interessante risulta l'effetto dell'integrazione luminosa sul parametro colorimetrico b^* poiché, nonostante la minor luminosità delle foglie, aumenta la componente blu, agendo positivamente sulle caratteristiche fenologiche delle baby leaf. L'adozione delle lampade a led ha tuttavia determinato un minor accumulo di Mo (-10.12%), S (-9.19%), e Mg (-7.29%) nelle foglie, quindi l'applicazione di questa tecnologia in un processo di biofortificazione va valutata ponderando vantaggi e svantaggi. La concentrazione MB 0,1 determina infatti un accumulo di $33 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ pf}$ con i led e di $41 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ pf}$ senza led, come alla dose MB 1 dove vi è un accumulo rispettivo di $82 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ pf}$ e $93 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ pf}$. La fortificazione tramite coltivazione in idroponia si rivela essere una tecnica applicabile con successo e, l'adozione dell'integrazione luminosa, favorisce la produzione oltre che incentivare la colorazione e stimolare la fotosintesi. La sinergia di queste tre tecniche, oppure della sola tecnica idroponica associata alla fortificazione, potrebbe potenzialmente sopperire alla fame “nascosta” arricchendo con successo

ortaggi e baby leaf consumati quotidianamente. La coltivazione in idroponica consente infatti di distribuire facilmente forme solubili e assimilabili di vari minerali e vitamine, oltre che recuperare la soluzione nutritiva non utilizzata dalle piante. Questo sistema di coltivazione è facilmente adottabile e flessibile poiché richiede un basso consumo idrico e permette di riutilizzare, previa correzione, la soluzione nutritiva, determinando un calo dei consumi idrici e dei fertilizzanti. Tutte queste caratteristiche rendono la fortificazione in idroponia la miglior tecnica applicabile ubiquitariamente nel mondo, in particolare nei paesi sottosviluppati dove vi è anche la maggior incidenza di carenze nutrizionali.

BIBLIOGRAFIA

- Adamse, Paulien, Steven J. Britz, and Charles R. Caldwell. 1994. "AMELIORATION OF UV-B DAMAGE UNDER HIGH IRRADIANCE. II: ROLE OF BLUE LIGHT PHOTORECEPTORS." *Photochemistry and Photobiology* 60(2): 110–15.
- Aubert, S., Assard, N., Boutin, J. P., Frenot, Y., & Dorne, A. J. (1999). Carbon metabolism in the subantarctic Kerguelen cabbage *Pringlea antiscorbutica* R. Br.: Environmental controls over carbohydrates and proline contents and relation to phenology. *Plant, Cell and Environment*, 22(3), 243–254. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00417.x>
- Baselice, Antonio et al. 2014. "Growth in the Consumption of Fresh-Cut Produce. An Application of AIDS Model to the Italian Demand for Fruit and Vegetables." *Economia Agro-Alimentare* 16(2): 11–30.
- Boo, Hee Ock, Buk Gu Heo, Shela Gorinstein, and Sang Uk Chon. 2011. "Positive Effects of Temperature and Growth Conditions on Enzymatic and Antioxidant Status in Lettuce Plants." *Plant Science* 181(4): 479–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.07.013>.
- Burrell, R. J W, W. A. Roach, and A. Shadwell. 1966. "Esophageal Cancer in the Bantu of the Transkei Associated with Mineral Deficiency in Garden Plants." *Journal of the National Cancer Institute* 36(2): 201–9.
- Campbell, Wilbur H. 1999. "NITRATE REDUCTASE STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1): 277–303.
- Cao, X. Y. et al. 1994. "Iodination of Irrigation Water as a Method of Supplying Iodine to a Severely Iodine-Deficient Population in XinJiang, China." *The Lancet* 344(8915): 107–10.
- Carvalho, Susana M.P., and Marta W. Vasconcelos. 2013. "Producing More with Less: Strategies and Novel Technologies for Plant-Based Food Biofortification." *Food Research International* 54(1): 961–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.021>.
- Castoldi, Nicola, Luca Bechini, and Antonio Ferrante. 2011. "Fossil Energy Usage for the Production of Baby Leaves." *Energy* 36(1): 86–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2010.11.004>.
- Conversa, G. ; Lazzizzera, C. ; Bonasia, A. ; Rotonda, P. la ; Elia, A., 2009. Selenium biofortification of green asparagus (*Asparagus officinalis* L.): preliminary trials in Capitanata area. *Italius Hortus* 17, 115-117
- Coughlan, M. P. 1983. "The Role of Molybdenum in Human Biology." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 6(1 Supplement): 70–77.
- Daher, Michel. 2001. "Overview of The World Health Report 2000 Health Systems: Improving Performance." *Journal Medical Libanais* 49(1): 22–24.
- Daum, D., Meinecke, C., Budke, C., Faby, R., Wijaya, K. A., 2016. Biofortification of strawberries with iodine by soil and foliar application. *Julius Kühn Institute*, 183, 86-87.
- Drumm-Herrel, H. 1984. "Blue/UV Light Effects on Anthocyanin Synthesis." In , 375–83.
- EFSA, 2013. L'EFSA propone livelli di assunzione adeguata per fluoro e molibdeno. <https://www.efsa.europa.eu/it/press/news/130808>
- Eurola, Merja et al. 1989. "Effects of Selenium Fertilization on the Selenium Content of Selected Finnish Fruits and Vegetables." *Acta Agriculturae Scandinavica* 39(3): 345–50.

- Falovo, C., Roupael, Y., Rea, E., Battistelli, A., & Colla, G. (2009). Nutrient solution concentration and growing season affect yield and quality of *Lactuca sativa* L. var. *acephala* in floating raft culture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(10), 1682–1689. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3641>
- Ford, Michael J, and Helga Kasemir. 1980. "Correlation between 5-Aminolaevulinate Accumulation." 210: 206–10.
- Fresh plaza. <https://www.freshplaza.it/>
- Frossard, Emmanuel et al. 2000. "Potential for Increasing the Content and Bioavailability of Fe, Zn and Ca in Plants for Human Nutrition." 879(December 1999): 206.
- Garg, Monika et al. 2018. "Biofortified Crops Generated by Breeding, Agronomy, and Transgenic Approaches Are Improving Lives of Millions of People around the World." *Frontiers in Nutrition* 5(February).
- Grant, Richard H. 1997. "Partitioning of Biologically Active Radiation in Plant Canopies." *International Journal of Biometeorology* 40(1): 26–40.
- Hart, J.W., 1988. Light and plant growth. Unwin Hyman Ltd, London.
- HarvestPlus and ICARDA. <https://www.harvestplus.org/biofortification-nutrition-revolution-now>
- HarvestPlus, Our History. <https://www.harvestplus.org/about/our-history>
- Heo Jeong, Wook, Sik Shin Kong, Kyu Kim Seon, and Yoeup Paek Kee. 2006. "Light Quality Affects in Vitro Growth of Grape 'Teleki 5BB.'" *Journal of Plant Biology* 49(4): 276–80.
- Hille, Russ. 1996. "The Mononuclear Molybdenum Enzymes." *Chemical Reviews* 96(7): 2757–2816. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr950061t> (October 13, 2019).
- Hopkins, W.G. and Hüner N.P.A., 1999. Introduction to plant physiology, fourth ed. Hoboken, New York.
- Initiative, Food Fortification. 2006. "Global Progress - Food Fortification." *Unscn.Org*: 341. http://www.unscn.org/layout/modules/resources/files/fortification_eng.pdf.
- Iodine global network, 2019. https://www.ign.org/cm_data/Global_Scorecard_MAP_2019_SAC.pdf
- Janovská, Dagmar, Lenka Štočková, and Zdeněk Stehno. "Evaluation of Buckwheat Sprouts as Microgreens."
- Johkan, Masahumi et al. 2010. "Blue Light-Emitting Diode Light Irradiation of Seedlings Improves Seedling Quality and Growth after Transplanting in Red Leaf Lettuce." 45(12): 1809–14.
- Kamiya, A., I. Ikegami, and E. Hase. 1984. "Effects of Blue Light on the Formation of 5-Aminolevulinic Acid and Chlorophyll in Cultured Tobacco Cells." In , 335–43.
- Kassebaum, Nicholas J et al. 2015. "Plenary Paper RED CELLS , IRON , AND ERYTHROPOIESIS A Systematic Analysis of Global Anemia Burden from 1990 to 2010." *Blood Journal* 123(5): 615–25.
- Kaur, Charanjit, and Harish C. Kapoor. 2002. "Anti-Oxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Asian Vegetables." *International Journal of Food Science and Technology* 37(2): 153–61.
- Koshiba, Tomokazu et al. 1996. "Purification and Properties of Flavin- and Molybdenum-Containing Aldehyde Oxidase from Coleoptiles of Maize." *Plant Physiology* 110(3): 781–89.

- Lamikanra, Olusola. 2002. *Fresh-Cut Fruits and Vegetables : Science, Technology, and Market*. CRC Press.
- Lee, J. S., W. G. Pill, B. B. Cobb, and M. Olszewski. 2004. "Seed Treatments to Advance Greenhouse Establishment of Beet and Chard Microgreens." *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79(4): 565–70.
- Li, Huimin. 2012. "Effects of Different Light Sources on the Growth of Non-Heading Chinese Cabbage (*Brassica Campestris* L .)." 4(4): 262–73.
- Louis Bresson, Jean et al. 2015. "Scientific Opinion on Dietary Reference Values for Iron." *EFSA Journal* 13(10): 4254–56.
- Luk, Edward, Æ Laran T Jensen, and Æ Valeria C Culotta. 2003. "The Many Highways for Intracellular Trafficking of Metals." : 803–9.
- Marin, Alicia, Federico Ferreres, Gonzalo G. Barberá, and María I. Gil. 2015. "Weather Variability Influences Color and Phenolic Content of Pigmented Baby Leaf Lettuces throughout the Season." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(6): 1673–81.
- Martínez-Sánchez, Ascensión et al. 2012. "Baby-Leaf and Multi-Leaf of Green and Red Lettuces Are Suitable Raw Materials for the Fresh-Cut Industry." *Postharvest Biology and Technology* 63(1): 1–10.
- Martínez-Sánchez, Ascensión, Angel Gil-Izquierdo, María I. Gil, and Federico Ferreres. 2008. "A Comparative Study of Flavonoid Compounds, Vitamin C, and Antioxidant Properties of Baby Leaf Brassicaceae Species." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(7): 2330–40.
- McCree, K. J. 1971. "The Action Spectrum, Absorptance and Quantum Yield of Photosynthesis in Crop Plants." *Agricultural Meteorology* 9(C): 191–216.
- Mcdonald, G K, Y Genc, and R D Graham. 2008. "A Simple Method to Evaluate Genetic Variation in Grain Zinc Concentration by Correcting for Differences in Grain Yield." : 49–55.
- Mendel R. R. and Schwarz G., 2002. Biosynthesis and molecular biology of the molybdenum cofactor (Moco), in: Singel A. and Singel H. (Eds.), Metal ions in biological system, vol. 39: Molybdenum and Tungsten: their roles in biological processes. CRC Press, New York, pp. 317-359
- Mickens, M A et al. 2019. "Scientia Horticulturae Growth of Red Pak Choi under Red and Blue , Supplemented White , and Artificial Sunlight Provided by LEDs." *Scientia Horticulturae* 245(August 2018): 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.023>.
- Mitchell, C A et al. 2012. "Horticultural Science Focus-LEDs: The Future of Greenhouse Lighting!" 52(1).
http://scholar.google.com/scholar?q=related:Aobd6hV0LGwJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as_sdt=0,5.
- Morrow, Robert C. 2008. "LED Lighting in Horticulture." 43(7): 1947–50.
- Mpelkas, Christos C. 1980. "Light Sources for Horticultural Lighting." I(4): 557–65.
- Mudd, S. Harvey, Filadelfo Irreverre, and Leonard Laster. 1967. "Sulfite Oxidase Deficiency in Man: Demonstration of the Enzymatic Defect." *Science* 156(3782): 1599–1602.
- Nestel, Penelope, Howarth E Bouis, J V Meenakshi, and Wolfgang Pfeiffer. 2006. "Symposium: Food Fortification in Developing Countries Biofortification of Staple Food Crops." *J. Nutr* 136: 1064–67.

- Oury, F. X. et al. 2006. "Genetic Variability and Stability of Grain Magnesium, Zinc and Iron Concentrations in Bread Wheat." *European Journal of Agronomy* 25(2): 177–85.
- Prasad, B V G, Smaranika Mohanta, S Rahaman, and Prerna Bareilly. 2015. "Bio-Fortification in Horticultural Crops." *Journal of Agricultural Engineering and Food Technology* 2(2): 95–99.
- Rengel, Z., G. D. Batten, and D. E. Crowley. 1999. "Agronomic Approaches for Improving the Micronutrient Density in Edible Portions of Field Crops." *Field Crops Research* 60(1–2): 27–40.
- Rico, D., A. B. Martín-Diana, J. M. Barat, and C. Barry-Ryan. 2007. "Extending and Measuring the Quality of Fresh-Cut Fruit and Vegetables: A Review." *Trends in Food Science and Technology* 18(7): 373–86.
- Rivero, Rosa M., Juan M. Ruiz, and Luis Romero. 2003. "Can Grafting in Tomato Plants Strengthen Resistance to Thermal Stress?" *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(13): 1315–19.
- Sabatino, Leo et al. 2019. "Interactive Effects of Genotype and Molybdenum Supply on Yield and Overall Fruit Quality of Tomato." *Frontiers in Plant Science* 9(January).
- Seo, Mitsunori et al. 1998. "Higher Activity of an Aldehyde Oxidase in the Auxin-Overproducing Superroot1 Mutant of Arabidopsis Thaliana." *Plant Physiology* 116(2): 687–93.
- Seo, Mitsunori et al., 2000. "The Arabidopsis Aldehyde Oxidase 3 (AAO3) Gene Product Catalyzes the Final Step in Absciscic Acid Biosynthesis in Leaves." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(23): 12908–13.
- Signore, Angelo et al. 2018. "Preliminary Evidences of Biofortification with Iodine of 'Carota Di Polignano', an Italian Carrot Landrace." *Frontiers in Plant Science* 9(February): 1–8.
- Sommer, Alfred., and Keith P. West. 1996. *Vitamin A Deficiency: Health, Survival, and Vision*. Oxford University Press.
- Tamás, Cecília et al. 2009. "Transgenic Approach to Improve Wheat (Triticum Aestivum L.) Nutritional Quality." *Plant Cell Reports* 28(7): 1085–94.
- Tyson, Richard V, Danielle D Treadwell, and Eric H Simonne. 2011. "Opportunities and Challenges to Sustainability in Aquaponic Systems." 21(February).
- USDA, 2005. Biocassava plus project. <https://portal.nifa.usda.gov/web/crisprojectpages/0409910-biocassava-plus.html>
- Wang, Yihai, and Kevin M. Folta. 2013. "Contributions of Green Light to Plant Growth and Development." *American Journal of Botany* 100(1): 70–78.
- West K.P. Jr., Gernand A., and Sommer A., 2007. Vitamin A in nutritional anemia, in: Kraemer K., Zimmermann M.B. (Eds), Nutritional anemia. Sight and Life Press, Basel, pp. 133–153.
- White, Philip J., and Martin R. Broadley. 2009. "Biofortification of Crops with Seven Mineral Elements Often Lacking in Human Diets - Iron, Zinc, Copper, Calcium, Magnesium, Selenium and Iodine." *New Phytologist* 182(1): 49–84.
- Whitelam, Garry C, and Karen J Halliday. *Light and Plant Development*.
- Winkler, J. T. 2011. "Biotech for Nutritional Quality." : 100–112. <http://r4d.dfid.gov.uk/Output/191949/Default.aspx%5Cnhttp://r4d.dfid.gov.uk/Output/191949/>

- World Health Organization. 2009. "Global Prevalence of Vitamin A Deficiency in Populations at Risk 1995-2005." *WHO Global Database on Vitamin A Deficiency*: 55. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44110>.
- Xiao, Zhenlei et al. 2015. "Evaluation and Correlation of Sensory Attributes and Chemical Compositions of Emerging Fresh Produce: Microgreens." *Postharvest Biology and Technology* 110: 140–48.
- Yu, Min, Cheng xiao Hu, and Yun hua Wang. 2006. "Effects of Molybdenum on the Intermediates of Chlorophyll Biosynthesis in Winter Wheat Cultivars Under Low Temperature." *Agricultural Sciences in China*.
- Zhu, Changfu et al. 2007. "Transgenic Strategies for the Nutritional Enhancement of Plants." *Trends in Plant Science* 12(12): 548–55.
- Zimmermann, Michael B. 2009. "Iodine Deficiency in Pregnancy and the Effects of Maternal Iodine Supplementation on the Offspring : A Review 1 – 4." 89: 668–72.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare il Dott. Carlo Nicoletto e il Dott. Andrea Giro per avermi guidato e affiancato, sostenendomi e spronandomi nei momenti più difficili e senza i quali questo progetto non sarebbe stato più lo stesso.

Un sincero ringraziamento è dedicato al Dott. Paolo Sambo che in questi cinque anni di studi è stato un ottimo presidente di corso, sempre disponibile e in grado di far esprimere il proprio meglio ad ogni studente.

Un sincero apprezzamento lo rivolgo a tutto il gruppo di ricerca ortofloricola dell'Università di Padova e ai collaboratori aziendali che si sono rivelati essere essenziali per la buona riuscita di questo lavoro.

Ringrazio inoltre tutti i professori del corso di Scienze e Tecnologie Agrarie di Padova che in questi cinque anni mi hanno trasmesso passioni e conoscenze, facendomi capire che non bisogna mai fermarsi ma continuare a cercare e scoprire.

Un caloroso grazie lo dedico a tutti i miei compagni di corso e a coloro che ho incontrato in questi anni; assieme abbiamo affrontato ogni sfida e superato ogni ostacolo, siamo maturati insieme e il nostro legame è diventato ogni giorno più forte.

Il ringraziamento più grande va a tutta mia famiglia il cui amore non mi è mai mancato. Senza di voi non avrei mai raggiunto questo traguardo e se è così speciale è anche merito vostro. Sono fiera di noi.

Grazie