



**VFARM**

# Vertical farming Sostenibile

## **D2.4. PROTOCOLLI COLTURALI PER LA COLTIVAZIONE DI SPEZIE IN VERTICAL FARMS**



|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Acronimo:</b>            | <b>VFARM</b>                               |
| <b>Titolo completo:</b>     | <b><i>Vertical farming sostenibile</i></b> |
| <b>Codice progetto:</b>     | <b>2020ELWM82</b>                          |
| <b>Finanziamento</b>        | <b>PRIN</b>                                |
| <b>Coordinatore:</b>        | <b>Università di Bologna</b>               |
| <b>Inizio del progetto:</b> | <b>8 Maggio, 2022</b>                      |
| <b>Durata del progetto:</b> | <b>36 mesi</b>                             |

|                              |  |
|------------------------------|--|
|                              | <b>Caratteristiche documento</b>   |
| <b>Titolo del documento</b>  | <b>D2.4. PROTOCOLLI COLTURALI PER LA COLTIVAZIONE DI SPEZIE IN VERTICAL FARMS</b>  |
| <b>Work Package:</b>         | <b>WP2</b>   |
| <b>Partner responsabile:</b> | <b>University of Turin, University of Naples Federico II, University of Bologna</b>  |
| <b>Autori principali:</b>    | <b>Giuseppe Carlo Modarelli, Christophe El-Nakhel, Chiara Cirillo, Stefania De Pascale, Cosimo Matteo Profico, Fabiana Marino, Silvana Nicola, Ilaria Zauli, Agata Morelli, , Francesco Orsini, Giuseppina Pennisi</b> |
| <b>Altri autori:</b>         |  |
| <b>Numero di pagine:</b>     | <b>28</b>  |



## Indice dei contenuti

|  |    |
|--|----|
| 1. Introduzione .....  | 4  |
| 1.1 Obiettivi del progetto .....   | 4  |
| 1.2 Obiettivi del Deliverable .....  | 5  |
| 2. Introduzione alla coltivazione di spezie (2.4a e 2.4b) .....  | 6  |
| 2.1 Coltivazione di zafferano fuori suolo: comparazione fra substrati - UNINA .....  | 8  |
| 2.2 Impiego di trattamenti luminosi e regolatori di crescita nella coltivazione di zafferano in vertical farms - UNITO .....                                   | 13 |
| 3. Introduzione all'uso di insetti impollinatori nei sistemi di vertical farming per migliorare la quantità e la qualità della produzione (2.4c) - UNIBO ..... | 17 |
| 2.1 Esperimento pilota .....   | 19 |
| 3.2 Test di scelta .....   | 22 |
| 3.3 Implementazione all'interno di AlmaVFarm .....   | 23 |
| 3.5 Osservazioni dal test pilota .....   | 24 |
| 4. Bibliografia .....  | 26 |



# 1. Introduzione

## 1.1 Obiettivi del progetto

Il progetto VFarm – Vertical Farming sostenibile (CUP: J33C20002350001) è un progetto PRIN (progetti di ricerca di rilevante interesse nazionale) finanziato nell’ambito della call 2020. Il progetto mira all’identificazione di strategie innovative per il *vertical farming* (VF), implementando un approccio interdisciplinare che integra orticoltura e fisiologia vegetale con applicazioni negli ambiti dell’ingegneria e delle scienze economiche ed ambientali. Il progetto mira a definire le caratteristiche ottimali di sistemi di coltivazione e controllo climatico, adattando le tecnologie alle diverse specie coltivate e consentendo di progettare unità di coltivazione modulari ed adattabili a diversi contesti in città italiane. Inoltre, promuove collaborazioni tra le università partner e aziende operanti nel settore per consentire un rapido trasferimento delle conoscenze generate, permettendo infine l’identificazione e la validazione delle soluzioni tecnologiche ottimali per l’implementazione del *vertical farming* in Italia. VFarm è coordinato dall’Università di Bologna Alma Mater Studiorum, e ha come partner l’Università di Napoli Federico II, l’Università degli Studi di Torino e l’Università degli Studi di Padova.

Gli obiettivi specifici del progetto sono:

- Studiare l’adattabilità di 7 tipologie di prodotti al *vertical farming* (WP2)
- Progettare soluzioni tecnologiche ottimali in termini di sistemi di coltivazione, gestione della luce e controllo del clima (WP3)
- Valutare la sostenibilità, sociale, ambientale ed economica delle *vertical farm* (VF) tramite analisi del ciclo di vita (LCA, eLCC e S-LCA) e con riferimento all’uso delle risorse (energia, acqua e nutrienti) (WP4)
- Definire le tecnologie ottimali, integrandole sia a VF di piccola scala realizzate all’interno di container sia a quelle a grande scala realizzate all’interno di magazzini industriali (WP5).



## 1.2 Obiettivi del Deliverable

Il WP2 ha lo scopo di studiare l'adattabilità di 7 tipologie di prodotti al *vertical farming*, focalizzandosi in particolare su:

1. Orticole e aromatiche;
2. Microgreens;
3. Fiori edibili;
4. Spezie;
5. Piccoli frutti;
6. Funghi;
7. Produzione acquaponica.

Nello specifico, l'obiettivo di questa deliverable (2.4) è di valutare:

- a) la possibilità di coltivare spezie (quali zafferano) in sistemi fuori suolo da poter integrare all'interno di *vertical farm*
- b) l'impiego di trattamenti luminosi idonei per la coltivazione di zafferano all'interno di *vertical farm*.
- c) l'uso di insetti impollinatori nei sistemi di *vertical farming* per migliorare la quantità e la qualità della produzione.



## 2. Introduzione alla coltivazione di spezie (2.4a e 2.4b)

Come è ben noto, il settore del *vertical farming* favorisce l'ottimizzazione di risorse come l'acqua e la luce, fornendo le condizioni microclimatiche ideali per lo sviluppo delle colture. Tuttavia, le *vertical farms* necessitano di ingenti quantità di energia per operare e, con l'aumento dei costi, è sempre più necessario puntare sulla coltivazione di colture ad alto reddito per una maggiore redditività e sicurezza dell'investimento. Diverse specie rientrano in questa categoria, tra cui le spezie, generalmente coltivate in pieno campo come lo zafferano o in areali di coltivazione diversi dai nostri. La coltivazione di spezie in *vertical farm* garantirebbe la produzione locale al contempo favorendo una maggiore tracciabilità e sicurezza del prodotto finale. Inoltre, permetterebbe ai coltivatori di aumentare le rese per m<sup>2</sup> e di destagionalizzare i cicli di produzione, essendo in grado di ricreare indoor le condizioni idonee per lo sviluppo e la produzione di queste colture. Tuttavia, sono diversi gli aspetti ancora da studiare e ottimizzare per lo sviluppo di una filiera.

Lo zafferano è la spezia più preziosa e redditizia al mondo, derivata principalmente dagli stimmi del fiore di *Crocus sativus* L. È utilizzato per aromi, fragranze, coloranti e medicinali, grazie ai suoi composti fitochimici come picrocrocina, safranale e crocina. La produzione mondiale di zafferano in campo aperto è stimata a 3.4 kg ha<sup>-1</sup>, con l'Iran come primo produttore contando il 90% dello zafferano mondiale, seguito da Spagna, India, Grecia e Marocco. Il suo valore di mercato, a seconda della qualità, varia tra i 25.000 e i 60.000 € al kg. L'Italia produce circa 500 kg di zafferano all'anno. Il costo elevato di questa spezia deriva dalla sua lavorazione dall'impianto fino alla raccolta degli stigmi, totalmente manuale. Generalmente in Italia, lo zafferano viene coltivato in zone collinari o montuose con clima secco e i cicli di coltivazione di un bulbo-tubero (o corno) possono essere fino a cinque consecutivi (la durata di un corno di zafferano può variare da 2 a 5 anni). Durante questo periodo, il corno produce nuovi bulbi che si sviluppano attorno



al corno madre. Tuttavia, la coltivazione tradizionale all'aperto affronta sfide come i cambiamenti climatici e le temperature elevate.

L'agricoltura in ambiente controllato (CEA), che include l'agricoltura *indoor* e il *vertical farming*, sta emergendo come approccio promettente per la produzione di zafferano. La CEA offre protezione dai vincoli esterni e mantiene condizioni di crescita ottimali, ottimizzando l'uso di risorse come acqua, energia, terreno e spazio. La coltivazione fuori suolo in *vertical farming*, partendo da materiale precedentemente vernalizzato, consentirebbe di migliorare quantità e qualità delle produzioni, destagionalizzandola, aumentando l'efficienza d'uso delle risorse impiegate, riducendo l'uso di agrofarmaci e agevolando le operazioni di raccolta.

Le tecniche di coltivazione idroponica e aeroponica, tra cui anche la cosiddetta fogponica (fogponics, o aeroponica ad alta pressione), sono utilizzate nella CEA per ottimizzare la crescita delle piante. Diversi studi hanno dimostrato che la percentuale di bulbi fioriti è più alta nei sistemi di produzione senza suolo rispetto alla produzione tradizionale. Inoltre, visto che la luce influenza la sintesi e l'accumulo di fitochimici nelle piante, l'uso di luci LED con lunghezze d'onda specifiche, in particolare nelle regioni spettrali del rosso e del blu, hanno contribuito positivamente alla crescita e sviluppo delle piante, anche in zafferano. Anche i regolatori di crescita delle piante (PGR) giocano un ruolo importante nella crescita e nello sviluppo. L'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) e l'acido gibberellico ( $GA_3$ ) sono due PGR che hanno mostrato effetti significativi su vari processi fisiologici e biochimici delle piante.

Nonostante i progressi nella produzione *indoor*, ci sono ancora sfide nella produzione di zafferano di alta qualità in ambienti controllati. La ricerca sta esplorando l'interazione tra diversi spettri luminosi e PGR per ottimizzare la resa e la qualità dello zafferano, così come la selezione e la gestione del substrato idoneo. Questi aspetti sono oggetto di questo deliverable e gli studi di seguito riportati fanno riferimento alle attività sperimentali condotte presso l'Università degli Studi di Napoli Federico II e l'Università degli Studi di Torino.



## 2.1 Coltivazione di zafferano fuori suolo: comparazione fra substrati - UNINA

### 2.1.1 Materiali e metodi

Presso il Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II sono stati eseguiti due esperimenti per identificare il substrato idoneo per la coltivazione di zafferano fuori suolo e valutare l'influenza della coltivazione in ambiente controllato sulla resa e la durata del ciclo colturale dello zafferano.

#### *Esperimento 1*

Il primo esperimento è stato condotto in una serra fredda da agosto 2022 a giugno 2023. Sono stati confrontati due substrati: perlite espansa a granulometria grossa (2-5 mm) e una miscela 1:1 di torba bionda e perlite (v/v). I cormi (diametro di 30 mm) sono stati trapiantati il 10 agosto 2022 in contenitori di plastica (1.0 m x 1.0 m x 0.2 m) con una densità di impianto di 50 cormi m<sup>-2</sup>, dopo essere stati immersi in una soluzione di prochloraz allo 0.1% (0.1 g p.a. disciolti in 100 ml di acqua) e asciugati sotto ventilazione forzata. Durante il riposo vegetativo, i cormi sono stati incubati sotto pacciamatura nera per circa 80 giorni. L'acqua è stata fornita tramite un sistema di irrigazione a goccia. Una volta iniziata la fioritura (29 novembre), le piante sono state fertirrigate due volte al giorno utilizzando una soluzione ½ Hoagland con pH 5.8 e conducibilità elettrica di 1.2 dS m<sup>-1</sup>. Alla fioritura, sono stati determinati il numero di fiori per pianta e la resa in spezia. Al termine della fioritura, l'irrigazione è stata interrotta (30 aprile 2023) fino alla senescenza delle foglie. Dopo la senescenza delle foglie, i nuovi cormi sono stati separati dai cormi madre, classificati, ripuliti e conservati in condizioni standard.





## *Esperimento 2*

Il secondo esperimento è stato eseguito dal 15 agosto 2023 utilizzando cormi di diametro di 30 mm ottenuti nel precedente esperimento. I cormi sono stati immersi in una soluzione di prochloraz allo 0.1%, asciugati sotto ventilazione forzata e trapiantati in contenitori di plastica (1 m x 1 m x 0.2 m) con una densità di impianto di 50 cormi m<sup>-2</sup>. Sono stati confrontati due substrati: vermiculite espansa a granulometria media (1–6 mm) e perlite espansa a granulometria grossa (2-5 mm) in due diversi ambienti di coltivazione (una serra fredda e una camera di crescita). I cormi nella camera di crescita sono stati mantenuti al buio a una temperatura di 25°C con UR pari all'85% e una concentrazione di CO<sub>2</sub> di 400 ppm per 80 giorni (dal 15 agosto al 3 novembre). I cormi in serra sono stati incubati sotto pacciamatura nera per lo stesso periodo di tempo. Dopo il periodo di incubazione, i cormi allevati nella camera di crescita sono stati mantenuti a una temperatura di 17°C; UR del 60% con fotoperiodo di 8/16 ore (luce/buio) e intensità luminosa di 250 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornita da lampade fluorescenti compatte bianche fredde per 30 giorni (dal 4 novembre al 3 dicembre). Nella serra, le piante sono state esposte a condizioni naturali senza controllo climatico artificiale. In entrambi i trattamenti, la fertirrigazione è stata eseguita utilizzando la soluzione ½ Hoagland. Alla fioritura, sono stati determinati il numero di fiori per pianta e la resa in spezia.

### 2.1.2 Risultati

#### *Esperimento 1*

I cormi hanno iniziato a germogliare 106 giorni dopo il trapianto, il 24 novembre 2022. La fioritura è iniziata cinque giorni dopo ed è durata 12 giorni. Il substrato non ha influenzato la durata del ciclo di coltivazione. In media sono stati prodotti 225 fiori m<sup>-2</sup>. Il numero di fiori per cormo è stato significativamente più elevato su perlite rispetto alla miscela torba+perlite (5.2 vs. 3.8 fiori per cormo). Il peso secco degli stigmi è risultato inversamente correlato al numero di fiori formati per cormo (Tab. 1). Di conseguenza, la resa in spezia per cormo è stata di 41.8 mg su perlite e di 46.8 mg sulla miscela torba+perlite. La resa in zafferano (in media 22.5 kg ha<sup>-1</sup>) è stata molto superiore rispetto a quella



ottenuta in Italia nella tradizionale coltivazione in pieno campo. Il numero di nuovi cormi è stato significativamente maggiore su perlite rispetto alla miscela torba+perlite. Al contrario, la miscela torba+perlite ha aumentato sia il peso che il diametro medio dei cormi (Tab. 1). Questo risultato è probabilmente associato alle diverse caratteristiche fisico-meccaniche dei due substrati, che hanno influenzato lo sviluppo dei cormi. In entrambi i substrati, più del 50% dei nuovi cormi aveva un diametro > 30 mm. Tuttavia, su perlite, il 30% dei nuovi cormi aveva un diametro < 20 mm.

*Tabella 1. Numero di fiori, peso secco stigmi, caratteristiche dei nuovi cormi e resa in spezia durante il primo esperimento (valori medi; \* = significativo per  $P \leq 0.05$ ; \*\* = significativo a  $P \leq 0.01$ )*

| Substrato            | Fiori                 | Peso secco stigmi         | Resa in spezia         | Nuovi cormi           | Peso cormi | Diametro cormi |
|----------------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------|----------------|
|                      | (n. m <sup>-2</sup> ) | (mg fiore <sup>-1</sup> ) | (kg ha <sup>-1</sup> ) | (n. m <sup>-2</sup> ) | (g)        | (mm)           |
| <b>Perlite</b>       | 260                   | 9.0                       | 23.4                   | 230                   | 11.1       | 29             |
| <b>Torba+Perlite</b> | 190                   | 11                        | 20.9                   | 150                   | 14.3       | 33             |
|                      | *                     | **                        | *                      | **                    | *          | *              |

## *Esperimento 2*

I cormi in serra fredda hanno germogliato il 20 novembre 2023 e la fioritura è iniziata dopo sei giorni (103 giorni dal trapianto). La durata media del periodo di fioritura è stata di 10 giorni. La durata del ciclo di coltivazione e il numero di fiori prodotti non sono stati influenzati dal substrato. Il numero di fiori prodotti non è stato significativamente diverso tra i 2 substrati, ma il peso fresco medio dei fiori è stato maggiore su vermiculite rispetto a quanto ottenuto in piante allevate su perlite (Tab. 2). Viceversa, il peso secco degli stigmi per fiore è risultato superiore su perlite che su vermiculite. Di conseguenza, la resa totale in zafferano è stata in media di 21.4 kg ha<sup>-1</sup> senza differenze significative tra i due substrati ed è risultata in linea con quella ottenuta l'anno precedente. In generale, l'ambiente controllato ha offerto condizioni più stabili e ottimali per la crescita delle piante rispetto alla serra fredda. I cormi hanno iniziato a



germogliare e fiorire dieci giorni prima rispetto alla serra fredda. Il periodo di fioritura è durato 11 giorni, senza differenze significative tra i due substrati. I cormi coltivati su vermiculite hanno prodotto un numero significativamente più elevato di fiori e hanno fornito una resa in spezia superiore rispetto a quelli coltivati su perlite sebbene il peso secco degli stigmi per fiore sia risultato inferiore su vermiculite che su perlite (Tab. 2).

Tabella 2. Numero di fiori, peso fresco fiori, indice di raccolta di zafferano durante il secondo esperimento (valori medi; ns = non significativo; \* = significativo per  $P \leq 0.05$ ; \*\* = significativo a  $P \leq 0.01$ )

|                           | Fiori<br>(n. m <sup>-2</sup> ) | Peso fresco fiore<br>(g fiore <sup>-1</sup> ) | Peso secco stigmi<br>(mg fiore <sup>-1</sup> ) | Resa in spezia<br>(kg ha <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|--------------------------------|---|--|--|
| <b>Serra fredda</b>       |                                |   |  |  |
| Perlite                   | 225                            | 0.44  | 9.8  | 21.1                                     |
| Vermiculite               | 245                            | 0.54  | 8.9  | 21.8                                     |
|                           | ns                             | *   | **   | ns                                       |
| <b>Camera di crescita</b> |                                |   |  |  |
| Perlite                   | 235                            | 0.52  | 9.6  | 22.6                                     |
| Vermiculite               | 270                            | 0.59  | 8.9  | 24                                       |
|                           | *                              | *   | **   | *  |

I risultati ottenuti in questo studio confermano che i sistemi fuori suolo rappresentano una valida alternativa alla produzione tradizionale di zafferano in pieno campo (Gresta et al., 2008). Substrati minerali con granulometria media/grossa sono risultati idonei alla produzione di zafferano (Chourak et al., 2022). Ulteriori studi sulla combinazione substrato/gestione della nutrizione idrica e minerale delle piante potrebbero fornire ulteriori informazioni per ottimizzare la tecnologia per la coltivazione fuori suolo dello zafferano (Orsini et al., 2020). Considerando che lo zafferano è una delle spezie più costose al mondo, lo sviluppo di tecniche di coltivazione fuori suolo potrebbe contribuire a soddisfare la domanda crescente di questa pregiata spezia, garantendo al contempo la sostenibilità economica e ambientale della produzione. In questo



contesto, il *vertical farming* potrebbe rivelarsi una scelta vincente per garantire la massima efficienza e produttività della coltivazione fuori suolo dello zafferano.



## 2.2 Impiego di trattamenti luminosi e regolatori di crescita nella coltivazione di zafferano in vertical farms - UNITO

### 2.2.1 Materiali e metodi

Questo studio ha esaminato gli effetti di due regolatori di crescita delle piante (PGR) e quattro diverse qualità di luce sui bulbi di zafferano per determinarne gli effetti su resa e la qualità di zafferano in ambiente controllato.

L'esperimento è stato condotto come uno studio fattoriale a due fattori in un disegno a blocchi completi randomizzato, con tre repliche. I fattori sperimentali includevano tre livelli di PGR ( $GA_3$ , GABA e controllo con sola acqua) e quattro qualità di luce: bianca (White), blu (Blue), rossa (Red) e una combinazione blu-rossa (B&R) pari a 50% blu e 50% rossa. Per lo studio sono stati selezionati bulbi di zafferano di un ecotipo iraniano denominato Qayen, originario della provincia del Khorasan Meridionale (la principale regione di produzione dello zafferano).

Il processo sperimentale ha seguito diverse fasi:

- Trattamento iniziale dei bulbi con acaricida e fungicida, seguito da un'incubazione al buio per tre mesi.
- Applicazione di soluzioni di  $GA_3$  e GABA ai bulbi.
- Mantenimento dei bulbi in un fitotrone controllato con specifiche condizioni di umidità, temperatura e fotoperiodo.
- Esposizione dei bulbi a diversi regimi luminosi utilizzando moduli LED con spettri personalizzati.

I trattamenti luminosi sono stati isolati utilizzando pannelli di alluminio per evitare interferenze. L'intensità e lo spettro della luce sono stati monitorati costantemente con strumenti specializzati. Infine, dopo 25 giorni di trattamenti luminosi, i bulbi sono stati sottoposti a uno shock freddo a 13°C per indurre la fioritura, una condizione difficilmente replicabile in ambiente esterno non controllato. Per ogni trattamento sono stati utilizzati 100 bulbi, garantendo una robusta base di dati per l'analisi.



## 2.2.2 Risultati

Lo studio ha esaminato gli effetti dell'interazione tra qualità della luce e regolatori di crescita delle piante (PGR) sulla resa floreale e la qualità degli stammi dello zafferano. I risultati hanno mostrato differenze significative tra i trattamenti per tutti i parametri misurati. Il trattamento GABA+BR (GABA con luce B&R combinata) ha prodotto il massimo numero di fiori per bulbo, circa tre volte superiore ai controlli. I pesi freschi e secchi dei fiori e degli stammi sono stati massimi con GABA+BR e GABA+B (GABA con luce B) (Tab. 3).

*Tabella 3. Risultati per il numero di fiori, il peso fresco e secco dei fiori per bulbo e il peso fresco e secco dello stamma per bulbo per le piante sottoposte a regolatori di crescita, a diversi spettri o la combinazione dei due. (ns = non significativo; \* = significativo per  $p \leq 0.05$ ; \*\* = significativo a  $p \leq 0.01$ ; F.D.V. = Fonte Di Variazione; gl = gradi di libertà; RCP = Regolatore di Crescita delle Piante; E = Errore; CV = Coefficiente di variazione).*

| F.D.V.                 | gl | Numero di fiori (n fiori bulbo <sup>-1</sup> ) | Peso fresco fiore (mg FW bulbo <sup>-1</sup> ) | Peso secco fiore (mg DW bulbo <sup>-1</sup> ) | Peso fresco stamma (mg FW bulbo <sup>-1</sup> ) | Peso secco stamma (mg DW bulbo <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|----|--|--|---|---|--|
| R                      | 2  | 0.054<br>ns                                    | 225,864.111 **                                 | 7,255.083 **                                  | 727.083 **                                      | 9.631 *  |
| RCP                    | 2  | 2.629 **                                       | 212,712.694 **                                 | 6,869.083 **                                  | 1787.25 **                                      | 134.156 **                                     |
| Qualità della luce     | 3  | 0.733 **                                       | 54,509.435 **                                  | 1,801.657 **                                  | 586.25 **                                       | 75.117 **                                      |
| RCP×qualità della luce | 6  | 0.175 *  | 5,998.102 **                                   | 201.38 **                                     | 119.25 *  | 17.839 **                                      |
| E                      | 22 | 0.059  | 711.626  | 23.508  | 45.265  | 1.762  |
| CV (%)                 | -  | 21   | 6.7  | 6.7   | 19.1  | 17.6   |

La massima quantità di safranale (associato al profumo della spezia) e picrocrocina (associata al sapore) è stata osservata nel trattamento GABA+BR. Il contenuto di crocina (responsabile della colorazione) è stato

massimo nel trattamento GA<sub>3</sub>+BR. La concentrazione di safranale in GABA+BR era 2.1 volte superiore rispetto al controllo con luce rossa (Fig. 1).

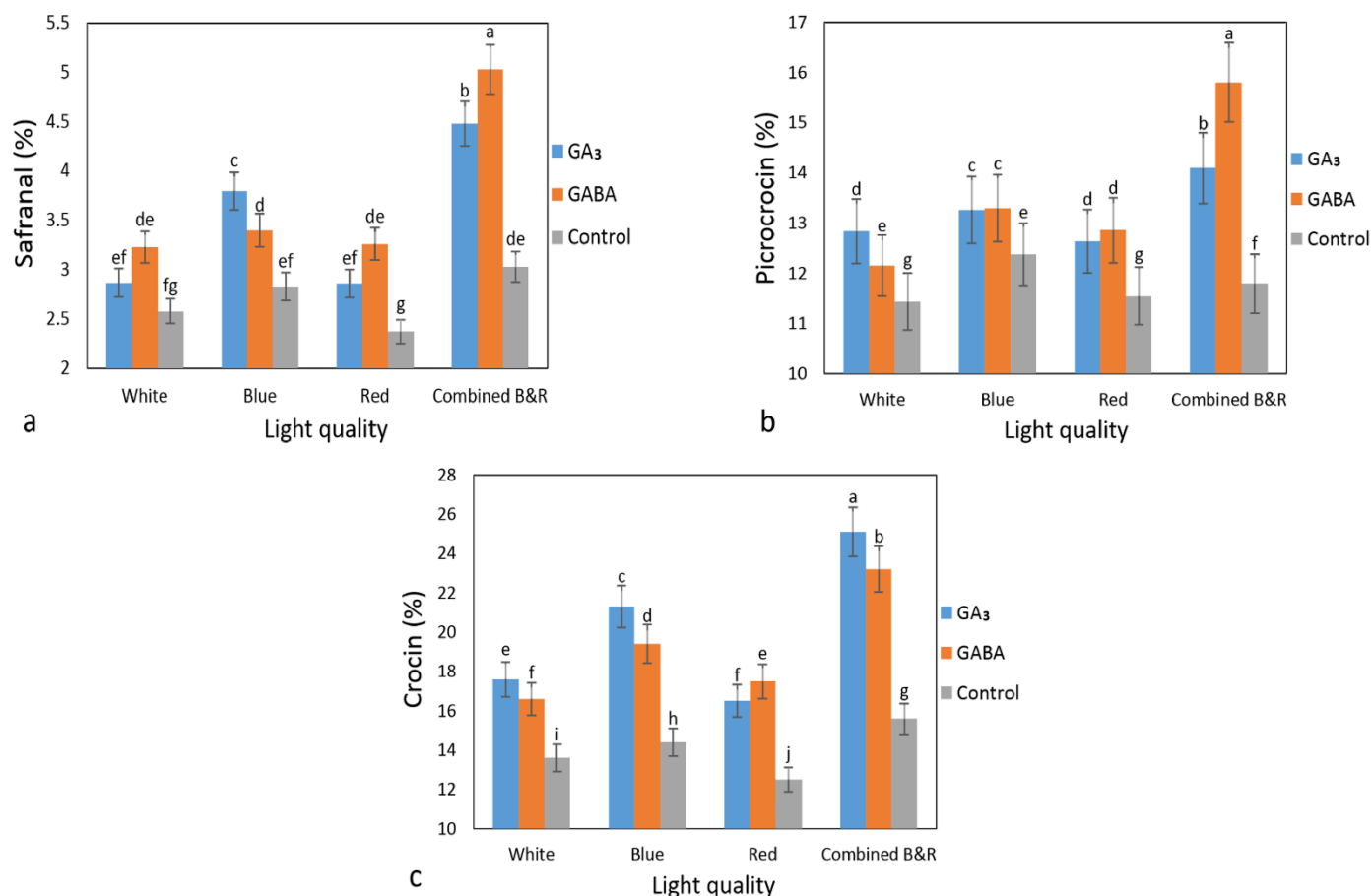
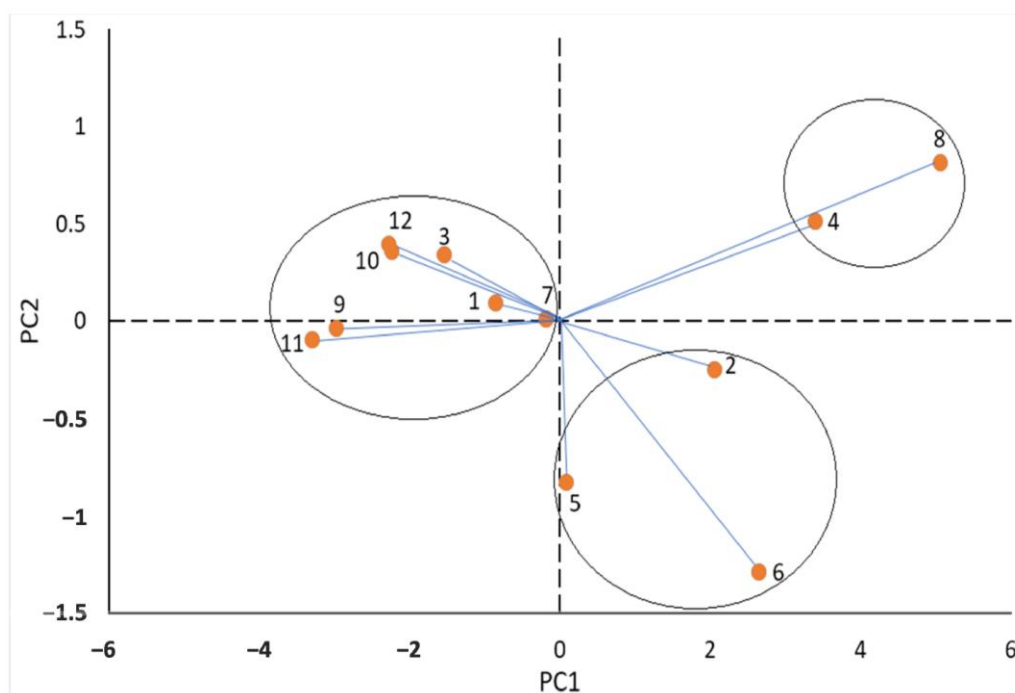


Figura 1. Accumulo di safranale (a), picrocrocina (b) e crocina (c) in fiori di zafferano cresciuti con applicazione di due PGR (GA<sub>3</sub> e GABA) e quattro qualità dello spettro luminoso (white, blue, red e combinato B&R). Lettere diverse indicano che i valori sono significativamente diversi per  $p \leq 0.05$  secondo il test di Duncan. Le barre di errore rappresentano il valore medio di tre repliche  $\pm$  deviazione standard.

Dal biplot ottenuto in seguito all'analisi delle componenti principali (PCA) (Fig. 2) è possibile osservare come i trattamenti creino tre raggruppamenti separati. In particolare, il trattamento GA<sub>3</sub>+BR è associato al trattamento GABA+BR. Come mostrato in precedenza, questi due trattamenti sono stati i più efficaci nel migliorare la resa e la qualità dello zafferano.



*Figura 2 Grafico biplot PCA delle variabili misurate nei fiori di zafferano coltivati in diverse condizioni: 1 = GA<sub>3</sub>+luce; W 2 = GA<sub>3</sub>+luce B; 3 = GA<sub>3</sub>+luce R; 4 = GA<sub>3</sub>+luce combinata B&R; 5 = GABA+luce W; 6 = GABA+luce B; 7 = GABA+luce R; 8 = GABA+luce combinata B&R; 9 = controllo+luce W; 10 = controllo+luce B; 11 = controllo+luce R; 12 = controllo+luce combinata B&R.*

In generale, i risultati hanno dimostrato che l'applicazione di PGR, specialmente GABA, in combinazione con luce blu e rossa, ha avuto un effetto sinergico positivo su resa e qualità dello zafferano, migliorando significativamente sia la produzione di fiori sia la concentrazione dei metaboliti secondari chiave.





### **3. Introduzione all'uso di insetti impollinatori nei sistemi di vertical farming per migliorare la quantità e la qualità della produzione (2.4c) - UNIBO**

L'obiettivo di questa ricerca è valutare l'uso di insetti impollinatori nei sistemi di vertical farming per migliorare la quantità e la qualità della produzione. Dato il limitato volume di letteratura sull'argomento e informazioni disponibili sull'uso degli impollinatori in ambienti indoor con illuminazione artificiale, risulta essenziale analizzare inizialmente la reattività e il comportamento degli insetti impollinatori in queste specifiche condizioni ambientali. Successivamente, è stata valutata la fattibilità di integrarli in tali sistemi. Come coltura da analizzare è stato selezionato il basilico (*Ocimum basilicum* L.), specie modello già studiata nella sua produzione nelle vertical farm, per verificare la fattibilità dell'impollinazione nei sistemi indoor con luce artificiale. Inoltre, le erbe aromatiche sono particolarmente attraenti per gli impollinatori (Nurzynska-Wierdak, 2007), rendendole una risorsa eccellente per lo sviluppo e il perfezionamento di protocolli sperimentali su questo tema.

Gli insetti impollinatori come i bombi (*Bombus terrestris*) sono stati ampiamente utilizzati e validati in diversi sistemi di coltivazione al chiuso come le serre, per migliorare la qualità e la resa della frutta (Morandin et al., 2001; Whittington et al., 2004; Gosterit & Gurel, 2018). Tuttavia, le coltivazioni in serra si basano principalmente sulla luce naturale, che sostiene l'attività di questi insetti impollinatori. Tutti gli insetti appartenenti alla superfamiglia Apoidea, inclusi i bombi, non hanno la capacità di percepire la luce rossa e rossa lontana (far-red) (Chittka & Waser, 1997) e di conseguenza questo potrebbe renderli inattivi in sistemi di vertical farming in cui altre componenti spettrali comunemente



presenti in presenza di radiazione solare sono limitate o assenti. Per testare l'efficacia dell'impollinazione di questi insetti in vertical farm, è necessario capire se le combinazioni di spettri luminosi comunemente utilizzate, che includono lunghezze d'onda nella regione del rosso, potrebbero ostacolare il loro volo e le loro prestazioni di ricerca del cibo. Pertanto, per testare la fattibilità e il potenziale successo dell'impollinazione in vertical farm, sono stati progettati tre esperimenti consecutivi a fasi:

1. **Esperimento pilota:** utilizzo di ciclamini (*Cyclamen* L.) per valutare in modo osservabile la risposta e il comportamento degli impollinatori all'ambiente interno con luci artificiali.
2. **Test di scelta:** utilizzo di piante di basilico esposte a luci monocromatiche oppure con combinazione di diverse lunghezze d'onda per determinare l'attività e preferenza dei bombi nei confronti dei diversi spettri luminosi.
3. **Implementazione in vertical farm:** introduzione dei bombi nella vertical farm sperimentale dell'Università di Bologna, AlmaVFarm, per valutare se il loro servizio di impollinazione si traduce in un aumento della produzione di semi di basilico.

Attualmente, l'impollinazione rappresenta una grande sfida nei sistemi indoor. A differenza delle piante coltivate in pieno campo, in vertical farm si devono produrre varietà e colture autocompatibili, o in alternativa colture che richiederebbero un'impollinazione manuale che spesso richiede manodopera specializzata, aggravando ulteriormente i costi (Chole et al., 2021; Wurz et al., 2021; Dingley et al., 2022). Questo vincolo porta spesso i produttori a optare per coltivare colture a crescita rapida e di bassa altezza, come la lattuga (*Lactuca sativa* L.), invece di quelle che producono frutti (Benke & Tomkins, 2017; Kozai & Niu, 2020).

L'impollinazione da insetti, soprattutto da parte delle api, spesso porta a una produzione superiore in termini di resa di frutta (Sáez et al., 2019), dimensioni del frutto (Nayak et al., 2020) e conteggio dei semi (Yankit et al., 2018). Secondo Switzer et al. (2016), l'impollinazione con bombi porta a un aumento del 74% del peso del frutto rispetto alle strategie di impollinazione artificiale



manuale, che raggiungono solo un aumento del 28%. La loro efficienza risiede nel trasferire un numero sufficiente di granuli di polline per un'impollinazione efficace in breve tempo, offrendo un elevato rapporto costo-beneficio. I bombi possono impollinare un gran numero di piante quotidianamente (circa 500) utilizzando una quantità ottimale di granuli di polline e lavorano continuamente per tutta la giornata, a differenza del lavoro umano che è limitato a poche ore (Dingley et al., 2022; Morandin et al., 2001).

I bombi possono essere ben adattati ai sistemi indoor come le vertical farm, poiché le loro colonie per l'impollinazione delle colture sono disponibili commercialmente e facili da utilizzare, se efficientemente gestite, con l'alveare che può essere aperto e chiuso facilmente, semplificando la loro rimozione dalla camera di crescita ad attività di impollinazione conclusa. Tuttavia, è importante valutare attentamente l'eventuale impatto delle luci rosse sul loro servizio di impollinazione negli ambienti di coltivazione indoor con luce artificiale. Sebbene esistano prove aneddotiche sui tentativi di utilizzare sirfidi e altri insetti dipteranici come agenti impollinatori in vertical farm, l'utilizzo di insetti come i bombi o altri imenotteri rimane ancora piuttosto inesplorato in questi ambienti, con pochi studi in letteratura a riguardo (Wold & Hart, 2021). Alla luce di questi risultati, esplorare l'impollinazione da insetti in vertical farms presenta un'importante opportunità di ricerca per ottimizzare la tecnologia e il sistema di coltivazione.

## 2.1 Esperimento pilota

Prima di introdurre i bombi all'interno della vertical farm sperimentale AlmaVFarm, bisognava stabilire la loro risposta e comportamento nei confronti delle luci artificiali, convalidando così la loro idoneità come agenti impollinatori. Pertanto, i primi esperimenti sono stati condotti all'interno di una camera di crescita a clima controllato presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna, adattata per simulare l'ambiente di una vertical farm. In particolare, in questa camera di crescita, le condizioni



ambientali selezionate sono state una temperatura pari a  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e un'umidità relativa di circa 55-70%.

Per introdurre i bombi nella camera di crescita, sono state impiegate colonie denominate 'Bombox' (CBC Bioplanet Soc. Agr. Srl., Cesena, Italia) e posizionate su un tavolo di fronte ai ripiani di coltivazione. A turno, un ricercatore (per standardizzare lo sforzo lavorativo) è rimasto a 1 metro di distanza dal lato della colonia per osservare e registrare i movimenti dei bombi dentro e fuori dall'alveare, nonché le loro interazioni con le piante. Ogni colonia è stata lasciata per un periodo di acclimatazione di 24 ore utilizzando un fotoperiodo standard di  $16 \text{ h d}^{-1}$  per quanto riguarda l'illuminazione. Questo ha permesso loro di studiare e imparare il loro ambiente circostante, aiutandoli a orientarsi verso i fiori e al loro ritorno al nido (De Vries et al., 2020). In totale sono state utilizzate cinque colonie di bombi diverse, mantenendo ciascuna fino alla senescenza prima di essere sostituita, alimentate con acqua zuccherata ad libitum.

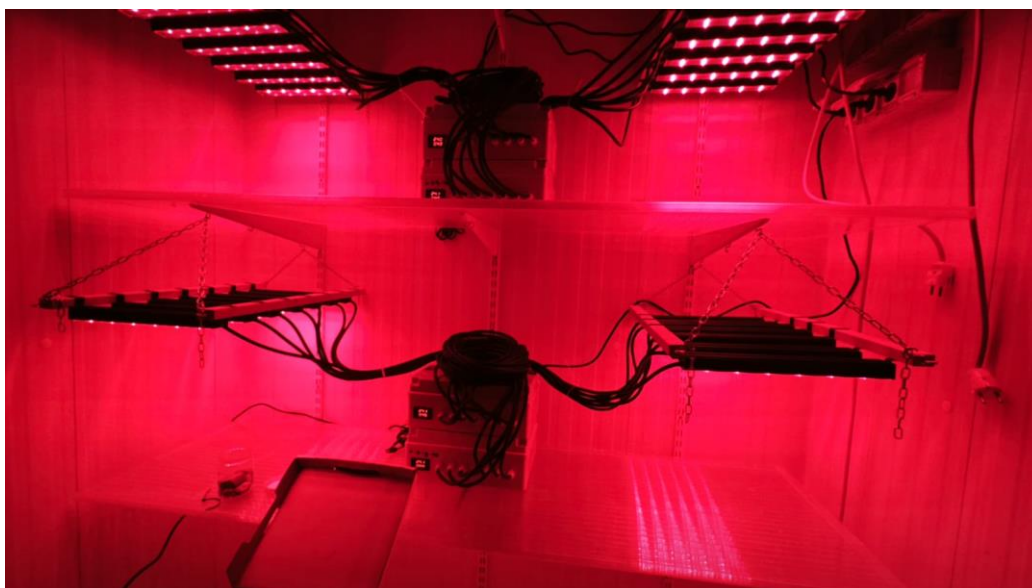
Per questa prova preliminare sono stati scelti i ciclamini ornamentali (*Cyclamen* L.), utilizzati semplicemente come incentivi visivi e olfattivi per stimolare le uscite dall'alveare verso i trattamenti luminosi. Le piante sono state posizionate sotto il sistema di illuminazione artificiale rappresentato da luci LED (Flytech s.r.l., Belluno, Italia) (Fig. 3).

I trattamenti luminosi includevano i seguenti spettri:

- Spettro completo Bianco (W)
- Monocromatico rosso (R)
- Monocromatico blu (B)
- Monocromatico verde (G)
- Rosso:Blu (RB) con rapporto 3:1 ( $\text{RB}_3$ )
- RB con rapporto 1:1 ( $\text{RB}_1$ )
- RB con rapporto 1:1 con l'aggiunta dello spettro completo W ( $\text{RB}_1 + \text{W}$ )
- RB con rapporto 3:1 con l'aggiunta dello spettro completo W ( $\text{RB}_3 + \text{W}$ ).



Ciascun trattamento luminoso è stato acceso singolarmente per tre ore consecutive nelle quattro lampade in contemporanea, per studiare il comportamento degli insetti nei confronti di ogni spettro utilizzato.



*Figura 3. Installazione nella camera di crescita dei sistemi di illuminazione LEDs.*

Infine è stata testata al termine della prova preliminare l'abilità dei bombi di tornare all'alveare simulando la fase crepuscolare. In particolare, sono stati testati spettri nella regione del rosso con diverse intensità luminose.

Le osservazioni misurate sono state:

- Numero di bombi che uscivano ed entravano nell'alveare;
- Monitoraggio delle loro attività per tre ore consecutive sotto ciascun trattamento luminoso per determinare se i bombi:
  - Visitavano i fiori;
  - Manifestavano reazioni avverse o comportamenti aggressivi verso i ricercatori;
  - Mostravano diversi modelli comportamentali basati sul trattamento luminoso specifico;



- Tornavano al nido al termine della sperimentazione mimando la fase crepuscolare normalmente presente in natura.

### 3.2 Test di scelta

Sono stati programmati due test di scelta separati, il primo nel quale era previsto l'utilizzo di sole luci monocromatiche mentre nel secondo test combinazioni di lunghezze d'onda e l'utilizzo di piante di basilico portate a fiore. L'esperimento è funzionale alla determinazione di quali spettri luminosi siano preferiti dai bombi, favorendo così l'attività di impollinazione. Come nello studio pilota, prima di ogni prova, i bombi sono stati sottoposti ad un periodo di adattamento di 24 ore e gli insetti venivano nutriti con sola acqua, risultando quindi affamati. L'esperimento mira a valutare efficacemente le risposte degli impollinatori ai diversi trattamenti luminosi e a raccogliere preziose informazioni sul loro comportamento di ricerca del cibo e sulle preferenze.

Per garantire che i bombi selezionino in modo appropriato il basilico posizionato sotto un particolare trattamento luminoso e per ridurre al minimo la sovrapposizione delle luci, ogni LED è stato isolato da un contenitore opaco alla luce (Figura 4A).

Per il primo test di scelta con luci monocromatiche, sono state testate: R (controllo), W, G, B. Per il secondo test di scelta è stato utilizzato nuovamente R come controllo, mentre le combinazioni fra le diverse lunghezze d'onda sono state selezionate in base ai risultati del test precedente. Ogni prova aveva durata di 4 ore e veniva ripetuta utilizzando lo stesso alveare in quattro diverse giornate. L'esperimento poi veniva ripetuto altre tre volte per ottenere un totale di quattro repliche per ciascun test di scelta. Gli alveari venivano quindi sostituiti con nuovi dopo ogni replica (impiegando così 8 alveari in totale). I trattamenti luminosi venivano riposizionati dopo ogni ora fino a quando ciascun trattamento veniva attivato in ciascuna delle quattro posizioni, per un totale di 4 ore di sperimentazione al giorno (Figura 4B).

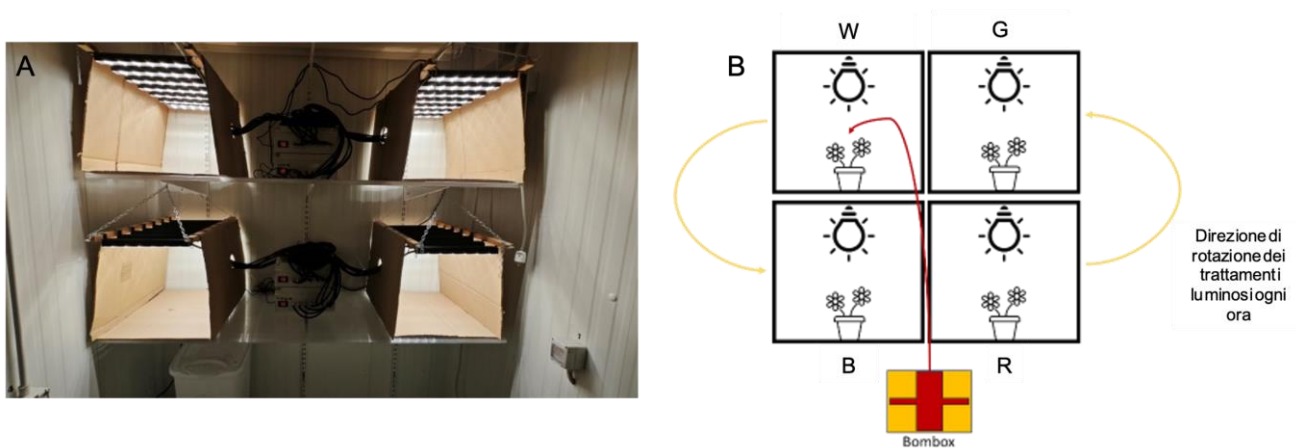


Figura 4. A) Ciascuna lampada LEDs isolata per gli esperimenti di test di scelta per evitare sovrapposizioni tra le diverse luci; B) Rappresentazione schematica del disegno sperimentale del test di scelta con luci monocromatiche, dove le frecce gialle indicano la direzione di rotazione dei trattamenti luminosi ogni ora.

Le osservazioni misurate sono:

- Numero di bombi che uscivano ed entravano nell'alveare;
- Monitoraggio delle loro attività sotto ciascun trattamento luminoso per determinare se i bombi:
  - Visitavano i fiori di basilico;
  - Manifestavano reazioni avverse o comportamenti aggressivi verso i ricercatori;
  - Mostravano diversi modelli comportamentali basati sul trattamento luminoso specifico;
  - Tornavano al nido al termine della sperimentazione mimando la fase crepuscolare normalmente presente in natura.

### 3.3 Implementazione all'interno di AlmaV Farm

Una volta conclusi i test di scelta e stabiliti gli spettri luminosi preferiti, i bombi sono stati introdotti all'interno di AlmaV Farm per testare se le loro visite ai fiori si traducevano in una produzione di semi di basilico aumentata. Una sezione della vertical farm è stata pertanto isolata usando reti e quattro scaffali di



coltivazione sono stati destinati alla colonia di bombi, mentre quattro scaffali di crescita non avevano insetti. L'esperimento è stato continuato fino al termine della fioritura di basilico e i semi sono stati raccolti, contati e pesati. Alla fine dell'esperimento, le "luci crepuscolari" venivano attivate per 3 ore per permettere ai bombi di tornare al loro alveare. L'esperimento è stato replicato con cinque diversi alveari per tener conto delle variazioni tra le colonie.

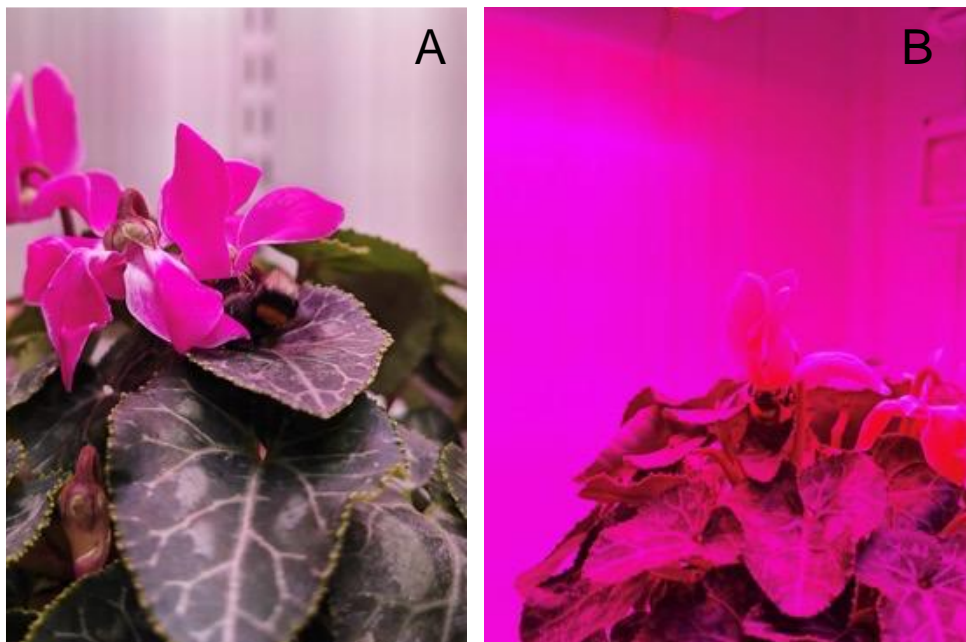
### 3.5 Osservazioni dal test pilota

Di seguito sono riportate le principali osservazioni e deduzioni elaborate dal test pilota:

- a) Durante il test pilota, si è osservato come i bombi siano stati attivi e siano usciti dall'alveare sotto vari trattamenti luminosi, ad eccezione della luce rossa, che hanno interpretato come buio. In particolare, sotto i trattamenti W, RB<sub>3</sub>, RB<sub>1</sub> e RB<sub>3</sub> + W, i bombi hanno attivamente visitato i ciclamini e consumato nettare da essi. Questo comportamento suggerisce una risposta positiva a queste specifiche condizioni luminose.
- b) Inoltre, i bombi non hanno mostrato avversione, stress o aggressività nei confronti dei ricercatori durante l'esperimento, indicando la loro capacità di adattarsi e sopravvivere alle condizioni ambientali indoor stabilite. Questo comportamento è cruciale per garantire il benessere e le prestazioni dei bombi per i test successivi.
- c) I bombi hanno richiesto un solo giorno con un fotoperiodo regolare (16 h d<sup>-1</sup>) per acclimatarsi all'ambiente e favorire le uscite dall'alveare durante i test successivi.
- d) Una transizione graduale di 3 ore dalla luce bianca completa alla luce far-red ha mimato con successo il crepuscolo, spingendo i bombi a tornare nel loro alveolare. Anche se non tutti gli insetti sono tornati durante questa transizione, questo comportamento era prevedibile, poiché alcuni foraggiatori rimangono naturalmente fuori dall'alveare durante la notte in natura.



e) Queste scoperte forniscono preziose informazioni sulle risposte dei bombi a diverse condizioni luminose, la loro adattabilità a impostazioni sperimentali e i loro comportamenti naturali in risposta a segnali ambientali simulati.



*Figura 5. Bombi che assorbono il nettare sotto i trattamenti A)W e B) RB<sub>3</sub>.*



## 4. Bibliografia

- Benke K & Tomkins B (2017) Future food-production systems: vertical farming and controlled-environment agriculture. *Sustainability: Science, Practice and Policy* 13: 13-26.
- Chole A, Jadhav A & Shinde V (2021) Vertical farming: Controlled environment agriculture. *Just Agric* 1: 249-256.
- Chourak, Y., Belarbi, E. H., da Cunha-Chiamolera, T. P. L., Guil-Guerrero, J. L., Carrasco, G., & Urrestarazu, M. (2022). Effect of macronutrient conditions and electrical conductivity on the quality of saffron grown in soilless culture systems. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(4), 4449-4457.
- De Vries LJ, Van Langevelde F, Van Dooremalen C, Kornegoor IG, Lankheet MJ, Van Leeuwen JL, Naguib M & Muijres FT (2020) Bumblebees land remarkably well in red–blue greenhouse LED light conditions. *Biology open* 9: bio046730.
- Dingley A, Anwar S, Kristiansen P, Warwick NW, Wang C-H, Sindel BM & Cazzonelli CI (2022) Precision pollination strategies for advancing horticultural tomato crop production. *Agronomy* 12: 518.
- Eftekhari, M., Javid, M. G., Aliniaiefard, S., & Nicola, S. (2023). Alteration of flower yield and phytochemical compounds of saffron (*Crocus sativus* L.) by application of different light qualities and growth regulators. *Horticulturae*, 9(2), 169.
- Gresta, F.; Lombardo, G.M.; Siracusa, L.; Ruberto, G. (2008). Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2008, 28, 95–112.
- Kozai T & Niu G (2020) Role of the plant factory with artificial lighting (PFAL) in urban areas: *Plant Factory* (ed. Elsevier, pp. 7-34.
- Morandin L, Lavery T & Kevan P (2001) Bumble bee (Hymenoptera: Apidae) activity and pollination levels in commercial tomato greenhouses. *Journal of Economic Entomology* 94: 462-467.
- Nayak RK, Rana K, Bairwa VK, Singh P & Bharti VD (2020) A review on role of bumblebee pollination in fruits and vegetables. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 9: 1328-1334.
- Sáez A, Negri P, Viel M & Aizen MA (2019) Pollination efficiency of artificial and bee pollination practices in kiwifruit. *Scientia horticulturae* 246: 1017-1021.



- Salas, M. D. C., Montero, J. L., Diaz, J. G., Berti, F., Quintero, M. F., Guzmán, M., & Orsini, F. (2020). Defining optimal strength of the nutrient solution for soilless cultivation of saffron in the Mediterranean. *Agronomy*, 10(9), 1311.
- Whittington R, Winston ML, Tucker C & Parachnowitsch AL (2004) Plant-species identity of pollen collected by bumblebees placed in greenhouses for tomato pollination. *Canadian journal of plant science* 84: 599-602.
- Wold E & Hart Rkjgjh (2021) China: vertical farming as a way to fight hunger.
- Wurz A, Grass I & Tschardtke T (2021) Hand pollination of global crops—A systematic review. *Basic and Applied Ecology* 56: 299-321.
- Yankit P, Rana K, Sharma HK, Thakur M & Thakur R (2018) Effect of bumble bee pollination on quality and yield of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) grown under protected conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7: 257-263.