



VFARM

Vertical Farming Sostenibile

D3.3 TECNOLOGIE AL PLASMA: USO DI PAW PER IL CONTROLLO DEI PATOGENI E LA STIMOLAZIONE DELLA CRESCITA



Acronimo:	VFARM
Titolo completo:	Vertical Farming sostenibile
Codice progetto:	2020ELWM82
Finanziamento	PRIN
Coordinatore:	Università di Bologna
Inizio del progetto:	8 Maggio, 2022
Durata del progetto:	36 mesi

a	Caratteristiche documento
Titolo del documento	D3.3 TECNOLOGIE AL PLASMA: USO DI PAW PER IL CONTROLLO DEI PATOGENI E LA STIMOLAZIONE DELLA CRESCITA
Work Package:	D 3.3
Partner responsabile:	University of Bologna
Autori principali:	Roberto Montalbetti, Francesco Orsini, Nicoletta Contaldo, Alessandro Pistillo, Assunta Bertaccini, Giuseppina Pennisi, Vittorio Colombo, Romolo Laurita
Altri autori:	
Numero di pagine:	13



Indice dei contenuti

1. Introduzione.....	4
1.1 Obiettivi del progetto	4
1.3 Acqua attivata al plasma (PAW)	5
2. Materiali e metodi	7
2.1 Sorgente Plasma atmosferico freddo.....	7
2.2 Materiale vegetale e trattamenti PAW	8
2.3 Analisi morfologiche, fisiologiche di maturazione e raccolta	9
3. Risultati.....	11
3.1 Caratterizzazione chimica e fisica.....	11
3.2 Risultati sulle analisi morfologiche, fisiologiche di maturazione e raccolta	11
3.3 Analisi espressione genica.....	13



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*, 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 WP3 ha lo scopo di progettare soluzioni tecnologiche ottimali per le *vertical farm*, focalizzandosi in particolare su:

1. Sistemi di coltivazione
2. Illuminazione LED
3. Tecnologie al plasma (PAW) per il controllo delle fitopatologie e l'aumento della crescita delle piante
4. Sensori e diagnostica per la gestione automatizzata delle colture
5. Ottimizzazione del controllo del clima e dell'efficienza nell'uso delle risorse.

In particolare, l'obiettivo di questo deliverable (D3.3) è lo studio di tecnologie al plasma da applicare in agricoltura: negli ultimi due decenni, i ricercatori hanno impiegato con successo l'acqua attivata al plasma (PAW) in agricoltura per migliorare la crescita delle piante e la germinazione dei semi.

1.3 Acqua attivata al plasma (PAW)

L'efficacia biologica della PAW è strettamente legata alla concentrazione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (RONS) generate all'interno del liquido durante il trattamento al plasma. Le caratteristiche del trattamento PAW variano in base al tipo di sorgente di plasma freddo, gas di processo, tipo e volume del liquido trattato e tempo di trattamento. Questi parametri influenzano direttamente sia la concentrazione di RONS disciolti sia il pH finale del liquido trattato, influenzando così l'attività biologica della PAW risultante. Questo studio presenta un sistema innovativo progettato per la produzione di grandi volumi (litri) di acqua attivata al plasma. La nuova sorgente di plasma freddo ibrida integra una sorgente a scarica a barriera dielettrica (DBD) e una sorgente a scarica corona, che funzionano alternativamente per attivare 5 litri di acqua di rubinetto.



Nel presente deliverable, per valutare l'efficacia della PAW prodotta, piante di *Solanum lycopersicum L.* cv. Micro-Tom sono state trattate in un ambiente idroponico. Saranno presentati i risultati sulla crescita, produzione e caratteristiche fenotipiche delle piante.



2. Materiali e metodi

2.1 Sorgente Plasma atmosferico freddo

L'acqua attivata al plasma (PAW) viene generata esponendo acqua di rubinetto ad una nuova sorgente di plasma ibrida composta da una sorgente Dielectric Barrier Discharge (DBD) e corona (Fig. 1). Il DBD presenta un elettrodo ad alta tensione immerso in una soluzione elettricamente conduttiva contenuta all'interno di una provetta di vetro, che include un sistema di raffreddamento per la soluzione liquida. Questa sorgente è posizionata verticalmente sopra la superficie dell'acqua e il liquido è messo a terra tramite l'immersione di un cilindro in acciaio inossidabile. Il plasma atmosferico freddo (CAP) si genera nel gap interelettrodico tra punta della sorgente DBD e il pelo libero dell'acqua. L'elettrodo ad alta tensione è collegato a un generatore micropulsato (AlmaPulse, AlmaPlasma s.r.l.), che opera a 17 kV con una frequenza fissa di 10 kHz. La sorgente corona è composta da un cilindro in acciaio inossidabile con una punta in tungsteno, posizionata a 5 mm sopra la superficie dell'acqua per generare CAP nello spazio tra la punta e l'acqua. L'elettrodo è collegato a un generatore ad alta tensione micropulsato (AlmaPulse, AlmaPlasma s.r.l.), che opera a 13 kV e 3 kHz. Il tempo totale di trattamento è di 30 minuti, suddiviso equamente tra le due sorgenti di plasma freddo.



Figura 1. Sorgente plasma freddo atmosferico durante il trattamento di 6 L di acqua di rubinetto.



Le misurazioni di tensione (V) e corrente (i) sono state ottenute utilizzando una sonda ad alta tensione (Tektronix P6015A) e una sonda di corrente (Pearson 6585), interfacciate con un oscilloscopio digitale (Tektronix DPO4034, 350 MHz, 2.5 GSa s⁻¹).

La potenza media (P) dissipata nella scarica è stata calcolata utilizzando la formula:

$$P = \frac{1}{T} \int_0^T i(t)V(t)dt$$

dove $v(t)$ è la tensione istantanea, $i(t)$ è la corrente istantanea e T è il periodo del segnale.

Le concentrazioni di H_2O_2 , NO_2^- e il pH generati nella PAW dal trattamento CAP vengono quantificati immediatamente dopo il trattamento. Per misurare rispettivamente H_2O_2 , NO_2^- , sono stati utilizzati l'Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e il Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay (ROCHE, Basilea, Svizzera). La concentrazione di NO_3^- è stata valutata con le strisce Quantofix. L'analisi delle concentrazioni è condotta fotometricamente secondo i protocolli del produttore.

2.2 Materiale vegetale e trattamenti PAW

I semi della varietà di pomodoro Micro-Tom sono stati seminati in contenitori di polistirene riempiti con una miscela di torba (70%) e vermiculite (30%), e posizionati sotto lampade fluorescenti a luce bianca fredda (TL-D90 De Luxe 950, Philips), con un PPFD di 215 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e un fotoperiodo di 16 h d⁻¹ di luce per la germinazione. Quando le piante hanno raggiunto lo stadio di due foglie vere, ovvero 21 giorni dopo la semina (Days After Sowing, DAS), le radici sono state lavate e le piantine sono state trapiantate in sistemi idroponici individuali (Pennisi et al., 2019). Ogni unità idroponica per singola pianta consisteva in barattoli di plastica (volume di 1 L) riempiti con soluzione nutritiva (EC = 1.6, pH = 6.5) con la seguente composizione: N- NO_3^- : 14 mM; N- NH_4^+ : 4.4 mM; P: 1.0 mM; K: 5.0 mM; S: 2.0 mM; Ca: 1.2 mM; Mg: 5.2 mM; Fe: 17.9



μM , Cu: 2.0 μM , Zn: 3.8 μM , B: 11.6 μM , Mn: 18.2 μM , Mo: 0.5 μM . La soluzione nutritiva è stata costantemente aerata attraverso pompe d'aria (Airline 3, Haquoss) con tasso di scambio d'aria di 0.25 L min^{-1} vaso $^{-1}$). Le piante sono state coltivate sotto lampade LED dimmerabili (Flytech s.r.l.) caratterizzate da diodi emettitori di luce rossa (R, picco a 669 nm) e blu (B, picco a 465 nm), impostati per fornire una composizione spettrale con un rapporto RB=3:1 (RB₃). Tre box indipendenti con 6 piante ciascuna sono stati utilizzati per mantenere le piante analizzate: i trattamenti con PAW sono stati effettuati 15 e 42 giorni dopo il trapianto (Days After Transplant, DAT), immergendo le radici nella soluzione per 30 minuti. Lo stesso numero di piante divise in tre blocchi e trattate con soluzione nutritiva sono state utilizzate come controllo negativo. Immediatamente dopo il trattamento è stata raccolta una foglia da ciascuna replica/trattamento, poi congelata rapidamente in azoto liquido e conservata a -80 °C fino all'estrazione dell'RNA.

2.3 Analisi morfologiche, fisiologiche di maturazione e raccolta

Le analisi morfologiche intermedie sono state condotte a 14, 41, 51, 63 e 104 DAT. Durante queste valutazioni, sono stati misurati:

- Il numero di foglie vere per pianta;
- Il numero di palchi fiorali, la presenza di fiori e il numero di frutti per pianta;
- Il diametro e altezza del fusto (mm);
- Lunghezza media delle foglie e radici (mm);

Inoltre, sono state svolte analisi fisiologiche:

- Contenuto relativo di clorofilla, mediando tre letture da tre foglie, a 41 e 63 DAT (SPAD-502Plus, Konica Minolta®, Tokyo, Giappone);



- Conduttanza stomatica (AP4 Leaf Porometer, Delta-T Devices®, Cambridge, UK) a 63 DAT mediando sei punti di misurazione su una foglia completamente sviluppata.

Inoltre, il consumo idrico delle singole piante per ogni trattamento e replica è stato monitorato utilizzando una bilancia elettronica di precisione (Kern EWJ 300-3H, Kern®, Germania).

Infine, al termine del ciclo di sviluppo, sono stati raccolti i frutti di ciascun trattamento, replica e pianta. Per ciascun frutto, sono stati poi misurati il diametro equatoriale, il diametro polare e l'indice di maturità ΔA utilizzando un DA-Meter (DA METER®, SINTELEIA, Bologna, Italia).

2.4 Estrazione di RNA e analisi dell'espressione genica

L'RNA è stato estratto da 100 mg di materiale vegetale utilizzando il kit Qiagen RNeasy Plant Minikit (# 74.904) in combinazione con il set RNase-Free DNase (Qiagen # 79.254) seguendo le istruzioni del produttore. L'RNA totale, disciolto in 50 μL di acqua distillata priva di nucleasi, è stato conservato a -20°C . La trascrittasi inversa M-MLV (RT, Promega, USA) è stata impiegata per sintetizzare i cDNA utilizzando un random primer esamerico (Fermentas, Lituania) e ~ 1.5 ng di cDNA stampo sono stati utilizzati per l'amplificazione tramite qPCR del gene fenilalanina ammonio-liasi (PAL) (Perez et al., 2019). Tutte le reazioni di qPCR sono state eseguite utilizzando la master mix SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e utilizzando tre repliche tecniche per tutte le 6 repliche biologiche. Tutti i livelli di trascrizione genica sono stati riportati come trascrizione normalizzata media relativa al gene β -actina, utilizzata come gene di riferimento. La trascrizione genica è stata determinata mediante il metodo $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ aggiustato per l'efficienza di amplificazione di ciascun trascritto. I dati medi ottenuti sono stati analizzati tramite ANOVA ($p \leq 0.05$) seguita dal test di Student.



3. Risultati

3.1 Caratterizzazione chimica e fisica

La potenza media della scarica, calcolata direttamente dalle misurazioni di tensione e corrente, è risultata essere di circa 370 W per la sorgente DBD e circa 180 W per la sorgente Corona. Il valore del pH misurato dopo il trattamento è di 6.36. Le concentrazioni delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (RONS) misurate dopo il trattamento con acqua distillata sono 5.20 ± 0.07 mg/L di H_2O_2 , 82.3 ± 0.8 mg/L di NO_2^- , e 500 mg/L di NO_3^- .

3.2 Risultati sulle analisi morfologiche, fisiologiche di maturazione e raccolta

Analizzando i dati ottenuti dalle misurazioni dei parametri morfologici e fisiologici, si osserva che i trattamenti con PAW abbiano un effetto benefico sulla lunghezza delle radici (Figura 2 e 3) 14 giorni dopo il trattamento e sul numero totale di frutti (Tabella 1). I dati ottenuti indicano che le piante rispondono meglio al trattamento con PAW nelle prime fasi di crescita; pertanto, sarà interessante aumentare il numero di trattamenti idroponici nella fase iniziale di crescita delle piantine.



Figura 2. Immagine di una pianta trattata con PAW (sinistra) e una pianta non trattata (destra).

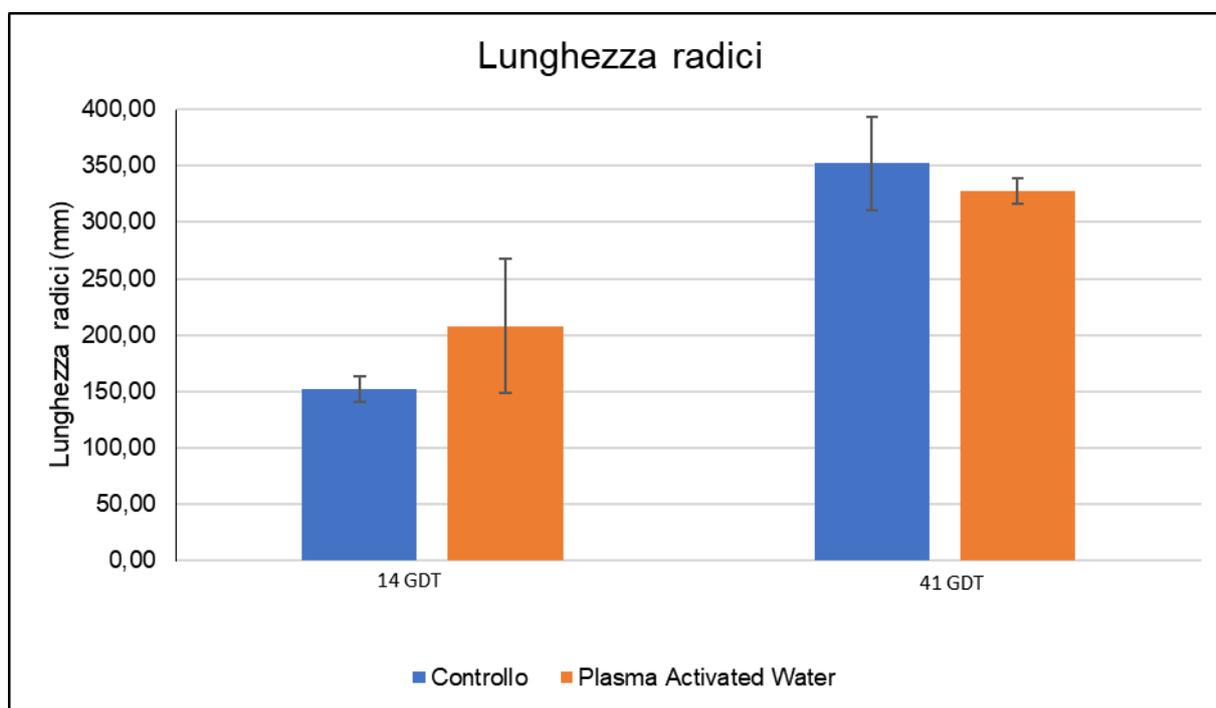


Figura 3. Lunghezza delle radici di pomodoro Micro-Tom trattato con Plasma Activated Water (PAW) e controllo a 14 e 41 giorni dal trattamento.



Tabella 1. Effetto del trattamento sul numero di frutti raccolti.

Tipologia di trattamento	Numero totale di frutti
Controllo	38.6±5.2
PAW	45.9±5.3

Per quanto concerne le altre analisi condotte, non è stata verificata una differenza statistica tra i dati, anche se le tendenze mostrano un effetto benefico della PAW. Le prove future saranno volte a verificare se aumentando il numero di trattamenti e il numero di campioni trattati sarà possibile verificare un incremento nei parametri morfologici e fisiologici dei Micro-Tom.

3.3 Analisi espressione genica

Le foglie delle piante trattate e non trattate con PAW sono state raccolte in due diversi momenti dopo il trattamento (a 14 e 41 DAT, rispettivamente denominati T1 e T2) e attraverso l'analisi di PCR quantitativa (qPCR) si sono valutati i cambiamenti nell'espressione genica nei due gruppi di piante. In particolare, è stata quantificata l'espressione del gene PAL i cui livelli genici sono stati confrontati nei due tempi e tra i due trattamenti. È stata osservata una sovraespressione del gene al tempo T1, mentre dopo 41 DAT (T2) il livello di trascrizione non mostra lo stesso andamento, confermando l'effetto positivo della PAW nella fase iniziale di crescita, in accordo con i dati morfologici e fisiologici ottenuti.

Tabella 2. Espressione genica a 14 (T1) e 41 (T2) giorni dal trattamento. I valori riportati sono normalizzati rispetto al controllo.

	Fold Change
T1	1.22±0.93
T2	0.66±0.4