



Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale: l'Europa investe nelle zone rurali



Assessorato Agricoltura, e Sviluppo Rurale Caccia e Pesca



Misura 124. Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nel settore agricolo, alimentare e forestale

SCHEDA DESCRITTIVA DOMANDA DI AIUTO N. 8475921091

1	TITOLO DEL PROGETTO	Introduzione di tecniche innovative per la coltivazione di lattuga iceberg di alta qualità – acronimo ICEBERG	
2	REDATTORE DEL TESTO	Dott. Simone Fanasca	
3	COORDINATORE DI PROGETTO	NOME INDIRIZZO E-MAIL TELEFONO TIPO DI PARTNER	Il giardino di Getsemani s.s. di Fiaschetti Fedele e Calvani Felice via del Truglio N. 4 - 04100 – LATINA ilgiardinodigetsemaniss@cgn.legalmail.it 0773/242827 Impresa agricola
4	PARTNERS DI PROGETTO	NOME INDIRIZZO E-MAIL TELEFONO TIPO DI PARTNER	Università degli Studi Federico II via Università, 100 Portici (NA) ateneo@pec.unina.it 0812531111 Ente di ricerca
		NOME INDIRIZZO TIPO DI PARTNER	ORTOFRUTTICOLA DELLE VERDURE SRL Viale Piemonte Stand 16 MOF - FONDI (LT) Azienda di commercializzazione
5	OBIETTIVO DEL PROGETTO	<p>Il progetto ha perseguito i seguenti obiettivi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ottimizzare la gestione dell'irrigazione della coltura di iceberg mediante l'utilizzo di innovativi sensori per la misura del contenuto idrico del suolo; • selezionare varietà di lattuga iceberg in grado di garantire ottime performance quali-quantitative, in grado quindi di adattarsi in maniera ottimale alle condizioni pedo-climatiche dell'Agro Pontino; • mettere a punto un trattamento post raccolta con acqua ozonizzata in grado di garantire un incremento della salubrità e della shelf life del prodotto; 	

		<ul style="list-style-type: none"> • mettere a punto una tecnica che prevede l'utilizzo di acqua ozonizzata per uso irriguo, allo scopo di disinfezione e incremento della shelf life del prodotto; • mettere a punto di un protocollo per l'ottenimento di una lattuga iceberg a limitato impatto ambientale, utilizzando prodotti alternativi al chimico.
6	ABSTRACT	<p>Il progetto si è articolato nei progetti pilota di seguito elencati.</p> <p>Progetto pilota sulla scelta varietale Questo progetto pilota ha previsto il confronto di diverse varietà di lattuga iceberg quali: Ombrinas, Silvinas, Equinos (Rijk Zwaan srl), Ice Castel (Syngenta srl), Metalia, Nunhems 189 e Vanguardia (Nunhems srl). La migliore performance produttiva è stata osservata per la varietà Vanguardia, valori intermedi sono stati osservati per le varietà Silvinas, Ice Castle, N 189 ed Equinos. La cultivar Num 189 ha mostrato la quantità più elevata di acido cicorico e di acido caffeiltartarico. La varietà Num 189 ha mostrato la più elevata attività idrofilica e lipofilica ed il più alto contenuto di fenoli totali. La cultivar Equinos e la cultivar Ombrinas hanno mostrato il più elevato contenuto di nitrati. La cultivar Equinos è anche quella a più basso contenuto di minerali quali potassio, magnesio e calcio. La cultivar Ombrinas insieme alla cultivar Metalia, presentano il più elevato contenuto di clorofilla.</p> <p>Progetto pilota per l'ottimizzazione dell'irrigazione mediante l'utilizzo di innovativi sensori dielettrici per la misura del contenuto idrico del suolo Questo progetto pilota è stato sviluppato sulla coltivazione di lattuga iceberg, confrontando tre livelli di restituzione idrica (60% - 80% -100%) mediante l'utilizzo di sensori dielettrici per la misura del contenuto idrico del suolo. Si è osservata una riduzione della produzione commerciabile al diminuire della restituzione idrica esclusivamente al valore del 60%, con conseguente incremento del contenuto di sostanza secca.</p> <p>Progetto pilota sull'utilizzo di acqua ozonizzata nella vasca di lavaggio della lattuga iceberg Questo progetto pilota ha previsto il confronto tra il lavaggio effettuato con acqua deionizzata (T0), acqua trattata con ipoclorito di sodio, acqua trattata con 10 mg L⁻¹ min di ozono (T2), acqua trattata con 20 mg L⁻¹ min di ozono (T3). I trattamenti sia con ipoclorito che con ozono riducono significativamente il valore del TPC, la maggiore riduzione si è osservata nel trattamento con presenza di 20 mg L⁻¹ min dose totale di ozono. Lo stesso trend si è osservato dopo lo stoccaggio a 4 °C per 7 gg. I trattamenti sia con ipoclorito che con ozono riducono significativamente il valore del TEC, la maggiore riduzione si è osservata nel trattamento con presenza di 20 mg L⁻¹ min dose totale di ozono. Lo stesso trend si è osservato dopo lo stoccaggio a 4 °C per 7 gg.</p> <p>Progetto pilota sull'utilizzo di acqua ozonizzata per l'irrigazione a pioggia della lattuga iceberg Questo progetto pilota ha previsto il confronto tra l'utilizzo dell'acqua d'irrigazione non trattata (T0) e acqua trattata con 20 mg L⁻¹ min dose totale di ozono (T2). Si è osservata durante la coltivazione una minore</p>

		<p>incidenza di malattie fungine, in particolare di peronospora. Nessuna differenza significativa è stata osservata né per la shelf life del prodotto né per i parametri qualitativi considerati.</p> <p>Progetto pilota sul controllo fitosanitario a basso impatto ambientale</p> <p>Questo progetto pilota ha previsto l'utilizzo di prodotti a controllo biologico quali: <i>Trichoderma</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> per il controllo dei patogeni fungini. Per quanto riguarda la produzione totale e commerciabile non si sono osservate differenze significative. È stato osservato un effetto significativo dei trattamenti rispetto al controllo.</p>
7	SETTORE DI INTERVENTO	Ortofrutticolo
8	PERIODO DI PROGETTO	<p>INIZIO 05/06/2014</p> <p>FINE 29/09/2015</p>
9	DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA' DI PROGETTO	<p>Progetto pilota sulla scelta varietale</p> <p>Questo progetto pilota ha previsto il confronto di diverse varietà testate di lattuga iceberg in diversi trapianti di cui sono state valutate le relative performance quali-quantitative. Le varietà testate sono state: Ombrinas, Silvinas, Equinos commercializzate dalla Rijk Zwaan srl, Ice Castel (ex LS12523) – Syngenta srl, Metalia, Nunhems 189 e Vanguardia (Nunhems srl).</p> <p>I campioni di lattuga Iceberg sono stati analizzati per la determinazione del contenuto dei principali acidi fenolici, nonché per il contenuto di fenoli totali (TP), e dell'attività antiossidante idrofila (HAA) e lipofila (LAA). Inoltre è stata determinata la sostanza secca e il contenuto di clorofilla, di nitrati e dei minerali K, Mg e Ca.</p> <p>In particolare:</p> <p><u>Determinazione degli acidi fenolici</u></p> <p>Le analisi dei campioni liofilizzati di lattuga iceberg sono state condotte come descritto da Llorach et al (2008) con piccole modifiche. In particolare, 0,4 g di campione sono stati sciolti in 12 ml di metanolo/acqua/acido formico (25/24/3), e sonificati per 30 minuti. I campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm x 15 min e il supernatante è stato prelevato e poi ultra-centrifugato a 14800 rpm x 10 min. Infine, i supernatanti sono stati prelevati per l'analisi HPLC. I campioni sono stati eluati in accordo al metodo descritto da Llorach et al (2008) con piccole modifiche. Venti µl sono stati iniettati in una colonna ODS3250 mm x 4.6 a fase inversa C-18 (Phenomenex). Le fasi mobili sono state acqua con 5% di acido formico (A) e metanolo (B). Il cromatogramma UV è stato tarato a 330 nm per gli acidi fenolici. Tre acidi fenolici sono stati identificati (attraverso LC-MS) e quantificati (con HPLC) nei campioni. La curva standard dell'acido chicorico è stata preparata nelle stesse condizioni dei campioni ed è stata usata per quantificare i principali acidi fenolici nei campioni.</p> <p><u>Determinazione del contenuto in fenoli totali</u></p>

La determinazione del contenuto dei fenoli totali è stata effettuata attraverso una reazione di ossidazione. L'insieme dei composti fenolici viene ossidato dal reattivo di Folin-Ciocalteu. Tale reattivo è costituito da una miscela di acido fosfotungstico (H₃PW₁₂O₄₀) e di acido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀) che si riduce, con l'ossidazione dei fenoli, a una miscela di ossidi blu di tungsteno (W₈O₂₃) e di molibdeno (Mo₈O₂₃). La colorazione blu prodotta, ha un assorbimento massimo intorno a 765 nm, proporzionale al tenore in composti fenolici. A 125 µl dei campioni opportunamente diluiti (aggiunta di 0,5 ml di acqua distillata), sono stati aggiunti 125 µl di reattivo di Folin-Ciocalteu (Fluka 47641) e 1,25 ml di soluzione di carbonato di sodio al 7,5 %. Dopo 90 minuti, a temperatura ambiente, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica a 765 nm utilizzando lo spettrofotometro HACH mod. DR/4000 Il valore ottenuto, tenendo conto delle diluizioni effettuate, ha fornito i mg L⁻¹ di fenoli totali espressi in acido gallico.

Determinazione dell'attività antiossidante idrofila

L'attività antiossidante idrofila è stata valutata mediante il metodo DMPD (Fogliano et al., 1999), basato sull'uso del cromogeno 4-ammino-N,N-dimetilanilina diidrocloreuro (DMPD). In ambiente acido ed in presenza di un ossidante, tale composto forma un catione radicalico stabilizzato per risonanza e caratterizzato da un'intensa colorazione rossa con un picco di assorbanza a 505 nm. In presenza di sostanze antiossidanti, si assiste al sequestro dell'elettrone singoletto e, di conseguenza, ad una riduzione dell'assorbanza. Per questo, sarà possibile valutare l'attività antiossidante di un campione, in funzione di tale riduzione dell'assorbanza, nota anche come percentuale di inibizione. Per la preparazione del campione, 0,200 g di esso congelati e liofilizzati sono stati centrifugati con 5 ml di acqua deionizzata a 4° C, a 4000 rpm per 5 minuti; il surnatante rappresenta il primo estratto, ed è stato diluito in rapporto 1:5 in acqua deionizzata, mentre il pellet è stato sottoposto ad una seconda centrifugazione, con altri 5 ml di acqua deionizzata in modo da effettuare, poi, la misura dell'attività antiossidante sui due estratti, separatamente. I saggi sono stati effettuati, in duplicato, su campioni costituiti da 2 mL della soluzione cromogena, da un volume noto della soluzione da testare (20 µL) e dal complemento di acqua deionizzata, per un volume finale di 2,2 mL. La lettura ottica viene effettuata dopo 10 minuti dalla preparazione dei campioni, in modo da consentire l'inibizione del catione radicalico. Nota l'assorbanza del campione, così preparato (Absc), è stato possibile calcolare, mediante la seguente formula, la percentuale di inibizione rispetto all'assorbanza del bianco (Absb):

$$\text{Abs (\%)} = (1 - \text{Absc} / \text{Absb}) * 100.$$

L'attività antiossidante idrofila misurata viene espressa in µM equivalenti di acido ascorbico, mediante una conversione dei valori ottenuti, sulla base di una retta di taratura. Come antiossidante idrofilo standard si è utilizzato, appunto, l'acido ascorbico e, partendo da una soluzione 0,04% (0,04 gr di acido ascorbico puro in 100 ml deionizzata), sono stati preparati campioni a concentrazioni scalari; di tali campioni è stata letta l'assorbanza, analogamente a quanto descritto precedentemente, poi, si è calcolata la percentuale di

inibizione.

Determinazione dell'attività antiossidante lipofila

L'attività antiossidante lipofila è stata valutata mediante il metodo ABTS (Pellegrini, 1999), basato sull'uso del cromogeno 2-2'-azinobis-(acido 3-etilenbenzotiazoline-6-sulfonico) (ABTS). Il meccanismo di funzionamento è molto simile a quello DMPD, descritto in precedenza, in quanto il cromogeno è intensamente colorato di verde con un picco di assorbanza a 734 nm ma, in presenza di molecole antiossidanti, si assiste ad una riduzione dell'assorbanza, che può essere calcolata in termini di percentuale di inibizione. Per la preparazione del campione, 0,200 g di esso congelati e liofilizzati sono centrifugati con 5 mL di metanolo a 4° C, a 4000 rpm per 5 minuti. Il surnatante rappresenta il primo estratto ed è stato diluito in rapporto 1:5 in metanolo, mentre il pellet è stato sottoposto ad una seconda centrifugazione con altri 5 mL di metanolo in modo da effettuare, poi, la misura dell'attività antiossidante sui due estratti, separatamente. I saggi sono stati effettuati, in duplicato, su campioni costituiti da 1 mL della soluzione cromogena, da un volume noto della soluzione da testare (20µL) e dal complemento di etanolo fino a raggiungere un volume finale di 1,1 mL. La lettura ottica è stata effettuata dopo 2,5 minuti per permettere la stabilizzazione della decolorazione. Il bianco è stato preparato con 1mL di cromogeno e 100 µL di etanolo. Nota l'assorbanza del campione, così preparato (Absc), è stato possibile calcolare, mediante la seguente formula, la percentuale di inibizione rispetto all'assorbanza del bianco (Absb):

$$\text{Abs (\%)} = (1 - \text{Absc} / \text{Absb}) * 100.$$

L'attività antiossidante lipofila misurata, viene espressa in µM di Trolox (acido 6-idrossi 2,5,7,8-tetrametil carbossilico, ossia l'analogo idrosolubile dell' α- tocoferolo) mediante una conversione dei valori ottenuti, sulla base di una retta di taratura. Come antiossidante lipofilo standard si è utilizzato, appunto, il Trolox. Preparate soluzioni a concentrazioni note e scalari, è stata misurata, con la stessa metodologia descritta in precedenza, l'assorbanza ed è stata calcolata la percentuale di inibizione. Le letture sono fatte utilizzando lo spettrofotometro HACH mod. DR/4000.

Determinazione della sostanza secca

La determinazione della sostanza secca è effettuata ponendo i campioni freschi in stufa a 65 °C per 5 giorni. Essa è espressa in percentuale ed è ottenuta dal rapporto: Peso secco netto/Peso fresco netto*100.

Determinazione della clorofilla

La determinazione della clorofilla è effettuata su campione vegetale fresco, dal quale si preleva un sub campione con un'area pari a 2 cm², misurando con un righello l'area ed effettuando un taglio con un bisturi, evitando l'asse centrale della foglia. Il sub campione viene sminuzzato all'interno di una navicella di plastica, il contenuto è poi trasferito in una provetta di vetro recuperando anche parte di materiale molto piccolo nella navicella con 3 ml di acetone 90%. Si aggiungono altri 7 ml di acetone 90% nella provetta di

vetro. Dopo aver agitato con una bacchettina di vetro la provetta è lasciata per 15 minuti al buio. Il materiale viene centrifugato a 1920 rpm per 10 minuti. Il surnatante ottenuto viene trasferito in cellette spettrofotometriche di 25 ml portate a volume con acetone al 90%. Il bianco viene ottenuto utilizzando 25 ml di acetone 90%. Le assorbanze lette sono quelle a 647, 664 e 750 nm utilizzando lo spettrofotometro HACH modello DR/4000.

Determinazione di nitrati

L'analisi spettrofotometrica di nitrati prevede anche in questo caso una prima fase di estrazione da impiegare successivamente per il testing dell'azoto-nitrato. Per la determinazione dei nitrati si aggiungono 10 ml di estratto acquoso filtrato ad una cella campione e si porta a volume di 25 ml con H₂O deionizzata, di seguito si aggiunge il contenuto di una bustina di NitraVer 5 Nitrate Reagent Powder Pillow alla cella campione, si tappa immediatamente e si agita per un minuto esatto. Poi si attende un periodo di reazione di 5 minuti (presenza di NO₃⁻ color ambra), e si legge il campione allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 500nm. Il bianco viene ottenuto portando ad un volume di 25ml una celletta con H₂O deionizzata. Il risultato viene espresso come % di NO₃⁻ a cui bisogna sottrarre il valore del bianco.

Analisi minerali

Dai campioni di foglie e radici essiccate, prima macinati in un mulino Wiley, e successivamente setacciati, è stato prelevato un sub-campione di 0.5 g, su cui effettuare le analisi minerali. La determinazione della concentrazione di azoto totale è stata effettuata previa mineralizzazione con acido solforico con il metodo Kjeldahl (Bremner, 1965). Questo procedimento si divide in 3 fasi: digestione del campione vegetale, distillazione e titolazione. La fase di digestione prevede l'inserimento di 1 g per ogni campione all'interno di un tubo in vetro pirex compatibile con la piastra riscaldante Velp, DK 20 Heating Digester. In ogni tubo è aggiunto acido solforico e un catalizzatore a base di solfato di potassio, selenio e ossido di rame, che permettono la mineralizzazione della sostanza organica. E' poi aggiunto perossido di idrogeno per ottenere un rapido incremento della temperatura. I tubi vengono adagiati sulla piastra riscaldante, fino a che la temperatura raggiunge i 409°C. Si ottiene così una soluzione trasparente in cui è stata distrutta completamente la sostanza organica contenuta nel tessuto vegetale, e l'azoto presente è sotto forma di sali di ammonio. La fase di distillazione viene eseguita dopo il raffreddamento del campione. Viene impostato il programma relativo all'analisi del materiale vegetale nel distillatore Velp UDK 140, che provvede all'inserimento di idrossido di sodio (al 40%) all'interno del tubo, portando alla liberazione di ammoniaca dai sali di ammonio, la quale viene intrappolata in un'aliquota (25 ml) di acido bórico in seguito alla distillazione in corrente di vapore e raccolta in una beuta. Alla soluzione così ottenuta si aggiunge un indicatore a base di rosso metile e verde bromocresolo (2 gocce). Si procede poi alla titolazione con acido solforico 10 N fino al viraggio dal verde a rosa pallido. Dal valore che si ottiene sulla buretta viene calcolato il contenuto di azoto totale, in termini di percentuale di azoto totale.

L'analisi della composizione dei campioni in cationi è invece effettuata mediante cromatografia ionica (ICP 3000 Dionex, Thermo Fisher Scientific Per l'estrazione dei minerali, 250 mg di campione secco macinato a 0,5 mm con un mulino (IKA, MF10.1, Staufen, Germany) è disciolto in 50 ml di acqua ultrapura (Milli-Q, Merck Millipore, Darmstadt, Germany), messo in agitazione in bagno termostato (ShakeTemp SW22, Julabo, Seelbach, Germany) a 80° C per 10 min e infine centrifugato a 6000 rpm per 10 min (R-10M, Remi Elektrotechnik, India). Il surnatante è stato filtrato a 0.45 µm e mantenuto a -20°C fino al momento delle analisi. La determinazione dei cationi e degli anioni è stata effettuata mediante cromatografia a scambio ionico (ICS-3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) con rilevazione conduttimetrica. Per l'analisi dei cationi sono utilizzate una precolonna IonPac CG12A 4mm, una colonna IonPac CS12A 4mm e un soppressore auto-rigenerante CERS500. La metodica prevede la rilevazione isocratica a 30°C, utilizzando come eluente acido metansolfonico 20mM ed applicando un flusso di 1,0mL min⁻¹ con soppressione in modalità di riciclo.

Progetto pilota per l'ottimizzazione dell'irrigazione mediante l'utilizzo di innovativi sensori dielettrici per la misura del contenuto idrico del suolo

Questo progetto pilota è stato sviluppato sulla coltivazione di lattuga iceberg, confrontando tre livelli di restituzione idrica (60% - 80% -100%) mediante l'utilizzo di sensori dielettrici per la misura del contenuto idrico del suolo. Sono state utilizzate delle sonde PR2 probe profile Delta T – Devices Ltd (UK), e per l'acquisizione dati un apparecchio molto semplice portatile HH2 Delta T – Devices Ltd (UK).

Progetto pilota sull'utilizzo di acqua ozonizzata nella vasca di lavaggio della lattuga iceberg

Questo progetto pilota ha previsto il confronto tra il lavaggio effettuato con acqua deionizzata (T0), acqua trattata con 80 mg/l di cloro totale (T1), ottenuta con l'utilizzo di ipoclorito di sodio (10% peso/volume), acqua trattata con 10 mg L⁻¹ min dose totale di ozono (T2), acqua trattata con 20 mg L⁻¹ min dose totale di ozono (T3). Subito dopo il lavaggio e dopo uno stoccaggio di 7 giorni a 4 °C è stata misurata la carica batterica ed il totale degli enterobatteri.

Progetto pilota sull'utilizzo di acqua ozonizzata per l'irrigazione a pioggia della lattuga iceberg

Questo progetto pilota ha previsto il confronto tra l'utilizzo dell'acqua d'irrigazione non trattata (T0) e acqua trattata con 20 mg L⁻¹ min dose totale di ozono (T2). Si è osservata durante la coltivazione di varietà Vanguardia una minore incidenza di malattie fungine.

Progetto pilota sul controllo fitosanitario a basso impatto ambientale

Questo progetto pilota ha previsto l'utilizzo di prodotti a controllo biologico quali: *Trichoderma*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* per il controllo dei patogeni fungini. È stata realizzata una prova su varietà Vanguardia che ha previsto il confronto tra una tesi non trattata e l'utilizzo di tre prodotti commerciali che contengono i tre sopramenzionati prodotti biologici.

10	LOCALIZZAZIONE GEOGRAFICA	Latina
11	SITO WEB	
12	LINK AD ALTRI SITI WEB	
13	DESCRIZIONE DEL CONTESTO DEL PROGETTO	
14	INFORMAZIONI AGGIUNTIVE	
15	COMMENTI AGGIUNTIVI	