

Relazione finale progetto OIGA (2009-2013): *Analisi della biodiversità molecolare di varietà di insalate proposte per la produzione di quarta gamma in provincia di Salerno e miglioramento della produttività mediante fertilizzazione con compost ottenuto dalla frazione organica dei residui solidi urbani (FORSU).*

Coordinatore scientifico: Prof. Stefano Castiglione, (Dipartimento di Chimica e Biologia, Università degli Studi di Salerno, Via Giovanni Paolo II, 132 - 84084 Fisciano (SA).

Impresa proponente: Azienda Agricola Frigenti Giuseppe, Via Donnarumma 13 - 84082 Bracigliano (SA). L'attività proposta sulla base degli obiettivi previsti dal progetto originale inviato al MIPAAF aveva una duplice finalità: condurre un'analisi della biodiversità molecolare di alcune varietà di insalata e valutare gli effetti di due diverse tipologie di fertilizzazione (minerale vs organica) sia sul suolo che sulle colture, attraverso l'allestimento di campi sperimentali. L'Italia è uno dei maggiori Paesi produttori di insalate. Le più note e appetite insalate sono la lattuga, il radicchio, la rucola, la valeriana, l'indivia e la cicoria. Ognuna di queste ha particolari caratteristiche organolettiche, possono essere gustate in insalata singolarmente oppure mischiate. Esse sono tra gli ortaggi più apprezzati soprattutto per il sapore e il limitato apporto calorico.

Gli obiettivi principali, quelli generali e specifici, e le fasi di realizzazione proposti dal progetto originale inviato al MIPAAF sono di seguito riportati.

Finalità principali e fasi della ricerca (punto 7.2 progetto proposto) sono:

- valutazione della biodiversità (in termini molecolari) di insalate largamente coltivate in Campania e in particolare nell'Agro-nocerino (Salerno-Campania);
- analisi dell'espressione genica in relazione alla fertilizzazione con compost;
- definizione di sistemi orticoli conservativi delle risorse ambientali attraverso la valorizzazione della frazione organica dei rifiuti solidi urbani stabilizzata mediante compostaggio.

Il programma di ricerca è stato articolato in 4 Fasi:

1. Acquisizione di informazioni relative alle varietà di insalate. Recupero e catalogazione del germoplasma disponibile.
2. Analisi e stima mediante marcatori molecolari del livello di biodiversità del germoplasma.
3. Realizzazione di tre impianti sperimentali utilizzando le varietà che hanno mostrato la maggiore variabilità genetica e biodiversità, stimate in Fase 2.
4. Valutazione degli effetti delle due tipologie di fertilizzazione sulle proprietà fisiche, chimiche e biologiche del suolo.
5. Rilievi agronomici e stima dell'espressione genetico-differenziale per valutare gli effetti del compost sulle colture orticole.

Obiettivi generali e specifici (punto 7.3 progetto proposto):

Obiettivi generali della ricerca sono:

1. valutazione della biodiversità (in termini molecolari) di varietà di insalate largamente coltivate in Campania e in particolare nell'Agro-nocerino (Salerno-Campania),
2. analisi dell'espressione genica in relazione alla fertilizzazione con compost,
3. definizione di sistemi orticoli conservativi delle risorse ambientali attraverso la valorizzazione della frazione organica dei rifiuti solidi urbani stabilizzata mediante compostaggio.

Obiettivi specifici e intermedi del progetto proposto al punto 1 sono:

- A) caratterizzazione delle principali varietà di insalate coltivate in Italia e di quelle coltivate in Campania;
- B) stima del livello di biodiversità molecolare delle varietà scelte;
- C) selezione sulla base della genotipizzazione molecolare delle varietà con il maggior livello di biodiversità da utilizzare nelle prove in campo.

Obiettivi specifici e intermedi del progetto proposto al punto 2 sono:

- A) identificazione mediante tecniche di differential display (cDNA-AFLP) di geni sovra- o sotto-espressi nelle tesi trattate con compost rispetto a quelle trattate con fertilizzanti minerali;
- B) clonazione e sequenziazione di tali geni;
- C) stima quantitativa dei livelli di sotto- o sovra-espressione dei geni identificati al punto 2A, mediante Real-Time PCR.

Obiettivi specifici e intermedi del progetto proposto al punto 3 sono verificati attraverso il monitoraggio di parametri sensibili agli effetti indotti dai trattamenti, specificamente:

- A) la biomassa microbica del suolo;
- B) l'attività biologica del suolo;
- C) la disponibilità di nutrienti, con particolare riferimento alla frazione minerale dell'azoto;
- D) i risultati produttivi in termini di qualità e quantità;
- E) la disponibilità di elementi tossici nel suolo e l'eventuale accumulo nei tessuti vegetali.

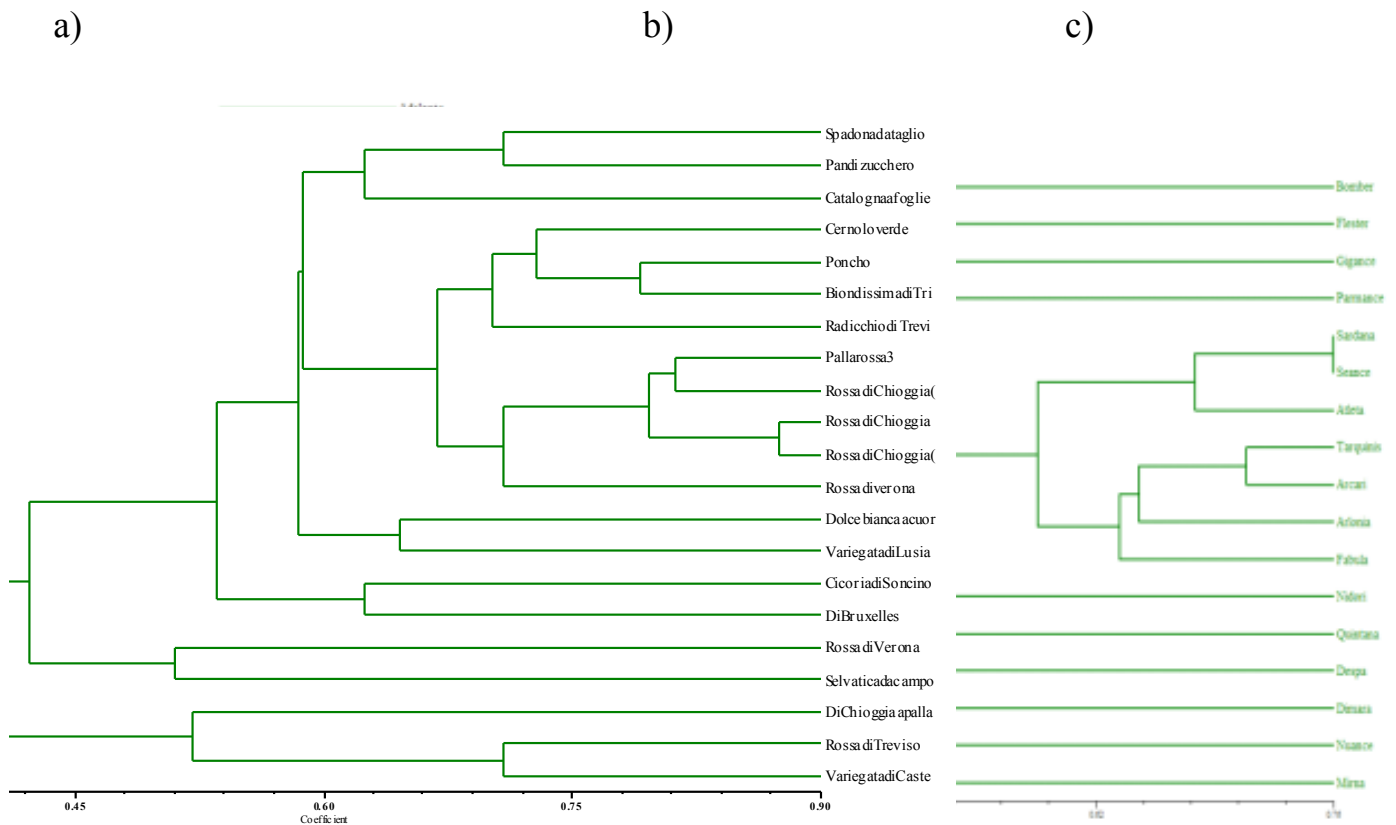
Relazione delle attività di ricerca svolte in base agli obiettivi proposti al punto 1.

7.3.1 Valutazione della biodiversità (in termini molecolari) di varietà di insalate largamente coltivate in Campania e in particolare nell'Agro-nocerino (Salerno).

7.3.1A. Caratterizzazione delle principali varietà di insalate coltivate in Italia, di quelle Campane e di quelle coltivate nell'Agro-nocerino in particolare.

La prima fase sperimentale ha previsto il recupero del germoplasma (semi) di lattuga, cicoria e indivia disponibile, con preferenza per le varietà principalmente coltivate in Campania. Un totale di 98 varietà di lattuga, 28 varietà di cicoria e 25 varietà di indivia è stato acquisito da differenti ditte sementiere. I semi delle insalate sono stati messi a dimora fino alla germinazione, in condizioni controllate, allo scopo di prelevare, dalle giovani piante, del materiale fogliare, utile all'estrazione del DNA genomico, necessario per la caratterizzazione della biodiversità genetica (per ulteriori dettagli far riferimento alla relazione intermedia). I dati molecolari sono stati elaborati in alberi di similarità riportati in Fig.1 per ciascuna specie orticola analizzata.

Fig. 1 Albero di similarità genetica (UPGMA), calcolata secondo l'indice di Jaccard, delle varietà di lattuga (a), cicoria (b) e indivia (c) caratterizzate molecularmente. Alcune varietà sulla base della tipizzazione genetica sono state selezionate e coltivate in pieno campo durante le annate agrarie (2010-2013).



7.3.1 C Selezione sulla base della genotipizzazione molecolare delle varietà con il maggior livello di biodiversità e allestimento delle prove sperimentali in campo.

Sulla base della tipizzazione molecolare sono state selezionate le varietà di lattuga, cicoria e indivia, caratterizzate da un elevato livello di biodiversità e destinate alle prove in campo realizzate durante le annate agrarie 2010, 2011, 2012. Nella Tabella 1 sono riportate le varietà selezionate e utilizzate per ciascuna prova sperimentale.

Tabella 1

Varietà usate per l'allestimento del campo sperimentale		
Anno 2010	Anno 2011	Anno 2012
Stylist	Bomber	Pan di Zucchero
Xanadu	Despa	Poncho
Aljeva	Parmance	Variegata di Castelfranco
Bacio	Mirna	Rossa di Chioggia
Analena	Indivia Riccia d'inverno	Variegata di Lusìa
Vincenzo	Scarola cartocciata	Bomber
		Parmance

L'impianto sperimentale, locato nel comune di S. Valentino Torio (Scafati, SA) presso l'azienda Frigenti, ha previsto l'impiego della varietà maggiormente biodiverse da un punto di vista genetico, ma anche maggiormente coltivate nelle aree campane vocate a questo tipo di produzione. Il terreno è stato inizialmente fresato, per una profondità di 20-25 cm, e successivamente rippato, per consentire il massimo dell'aerazione e drenaggio. Successivamente, per valutare la crescita delle differenti varietà di insalata a seguito del trattamento con compost, rispetto alla concimazione minerale, si è allestito il campo sperimentale su una superficie di circa 1000 m². Tale superficie è stata suddivisa in 2 parti di quasi 500 m², una delle quali è stata concimata con fertilizzante organico (15 t/ha di compost all'anno, distribuito circa 15 giorni prima della messa a dimora dei sementali) e l'altra con un concime binario a base di azoto e fosforo (6 % N -18 % P).

Relazione delle attività di ricerca svolte in base agli obiettivi proposti al punto 2

7.3.2 Espressione genica in relazione alla fertilizzazione con compost

7.3.2 A Identificazione mediante tecniche di differential display (cDNA-AFLP) di geni sovra- o sotto-espressi nelle tesi trattate con compost rispetto a quelle fertirrigate.

Per valutare gli effetti del compost sulle colture orticole è stato condotto uno studio comparativo sulle varietà di lattuga “Analena” coltivate su suolo fertirrigato o ammendato con compost. Durante e al termine della stagione vegetativa (Marzo 2010), si è proceduto con il recupero del materiale vegetale (foglie e radici) da piante cresciute su parcelle sottoposte ai due differenti tipi di fertilizzazione. Due differenti analisi molecolari sono state effettuate sul materiale vegetale recuperato: cDNA-AFLP e MSAP. Queste metodologie hanno permesso di valutare gli effetti delle due tipologie di fertilizzazione sul trascrittoma (cDNA-AFLP- cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism; Vuylsteke et al., 2006) e sull’epigenoma (MSAP- Methylation Sensitive Amplified Polymorphism; Aina et. al, 2004) in radice e foglia. Entrambe le metodiche combinano le potenzialità della PCR alla specificità degli enzimi di restrizione e sono varianti della metodica AFLP. La metodica MSAP consente di studiare i fenomeni epigenetici, mentre la tecnica cDNA-AFLP è stata impiegata per l’analisi trascrittomica. La metodica cDNA-AFLP ha trovato larga diffusione nel campo della trascrittomica come una delle tecnologie più sensibili e affascinanti che consentono l’identificazione di nuovi geni d’interesse differenzialmente espressi. Essa permette di comparare il profilo di espressione genica di numerosi campioni anche senza conoscerne la sequenza nucleotidica e fornisce utili informazioni sul livello di espressione dei geni attivati e/o repressi in funzione di un trattamento. Sebbene utilizzata in numerosi studi di espressione genica differenziale in specie animali e vegetali (Vuylsteke et al., 2007), la tecnica è risultata di non semplice applicazione in tutti gli esperimenti preliminari condotti. Da qui si è resa necessaria la collaborazione con il laboratorio del Prof. Vuylsteke dell’Università di Gent (Belgio) per la messa a punto del protocollo cDNA-AFLP sul materiale vegetale recuperato. Dalle radici e dalle foglie raccolte sono stati estratti gli RNA totali e da questi sono state ottenute collezioni di cDNA (DNA copia) rappresentative degli mRNA espressi negli organi delle piante cresciute nelle diverse condizioni sperimentali. Il cDNA prodotto è stato poi utilizzato come DNA substrato per l’identificazione di polimorfismi mediante l’ormai bene collaudata metodica AFLP. La strategia di amplificare selettivamente i frammenti permette di aumentare considerevolmente la qualità del template e di ottenere sottoinsiemi diversi di cDNA. I prodotti derivati dall’amplificazione in PCR (con 15 diverse coppie di primer oligonucleotidici) sono stati separati mediante corsa elettroforetica su piattaforma Li-COR (Fig.2). Nel caso specifico la tecnica cDNA-AFLP ha permesso di valutare se i geni fossero differenzialmente espressi in radice o foglia in risposta ai due diversi tipi di

fertilizzazione. L'analisi trascrittomica condotta su entrambi gli organi ha evidenziato profili elettroforetici simili per tutti i campioni analizzati, denotando che il trascrittoma non si modifica in maniera sostanziale in funzione del trattamento di fertilizzazione effettuato sulla coltura.

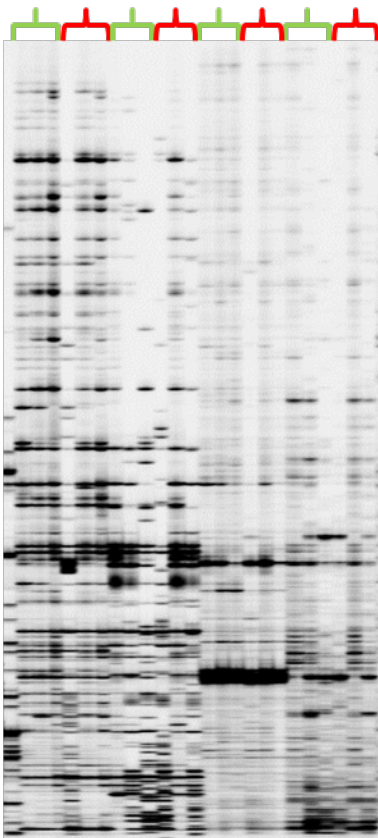
La tecnica MSAP (Aina et al., 2004) permette di valutare eventuali modificazioni epigenetiche a carico del DNA. Dopo aver estratto dalle radici e dalle foglie il DNA genomico sono stati condotti esperimenti preliminari, volti a mettere a punto la metodologia MSAP e a saggiare le combinazioni di primer utilizzabili per le amplificazioni in PCR. I prodotti MSAP derivati dall'amplificazione in PCR, che ha previsto l'utilizzo di molteplici combinazioni di coppie di primer oligonucleotidici, sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 6,0%, in condizioni denaturanti (Fig. 3). Il confronto tra il pattern elettroforetici ottenuti sul DNA di entrambi gli organi studiati non ha rivelato significative differenze tra le varietà cresciute su terreno fertirrigato rispetto a quello ammendato con compost. L'analisi MSAP dimostra che anche l'epigenoma non subisce alterazioni sostanziali, in risposta ai due diversi tipi di fertilizzazione. Tale risultato conferma quindi quello dell'analisi trascrittomica. Entrambe le analisi molecolari condotte dimostrano chiaramente che le due tipologie di fertilizzazione non determinano alcuna alterazione né a livello dell'epigenoma né a livello del trascrittoma sulle parti eduli della pianta (foglie), garantendo l'assoluta salubrità del prodotto dovuta a uno stato metabolico e fisiologico paragonabile per i due trattamenti di concimazione. Questo importante risultato potrebbe incoraggiare gli agricoltori a un uso ecosostenibile ed equilibrato del compost in agricoltura e rassicurare in tal modo i consumatori, invogliandoli a mangiare prodotti alimentari certamente salubri, qualitativamente apprezzabili e ottenuti mediante l'ammendamento dei suoli agrari con compost certificato e di qualità, derivato da una corretta raccolta differenziata dell'umido.

7.3.2 B Clonaggio e sequenziamento dei geni differenzialmente espressi identificati al punto 7.3.2.A e stima quantitativa dei livelli di sovra e sotto espressione mediante Real-Time PCR.

Le analisi molecolari condotte non hanno evidenziato polimorfismi né a carico del DNA né del trascrittoma delle specie orticole indagate (lattuga, indivia, e cicoria) coltivate su suolo ammendato con compost o su suolo fertirrigato. Poiché non sono stati identificati geni e/o regioni genomiche alterate nelle foglie delle specie orticole analizzate e oggetto di studio in funzione della fertilizzazione dei suoli, le fasi di clonaggio, sequenziamento e analisi di espressione non sono state da noi condotte.

Figura 2 Esempio di profilo elettroforetico cDNA-AFLPs ottenuto su foglie (a) e radici (b) della varietà Analena (lines 1-6 e 13-18, prima raccolta-annata agraria 2010 e lines 7-12 e 19-24 seconda raccolta-annata agraria 2010). I campioni derivati da piante fertilizzate con concimi minerali sono indicati in verde, mentre quelli derivati da piante ammendate con compost sono indicati in rosso.

a)



b)

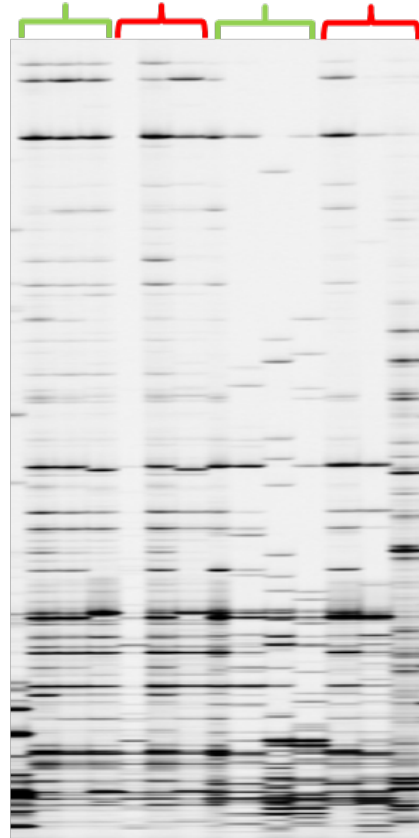
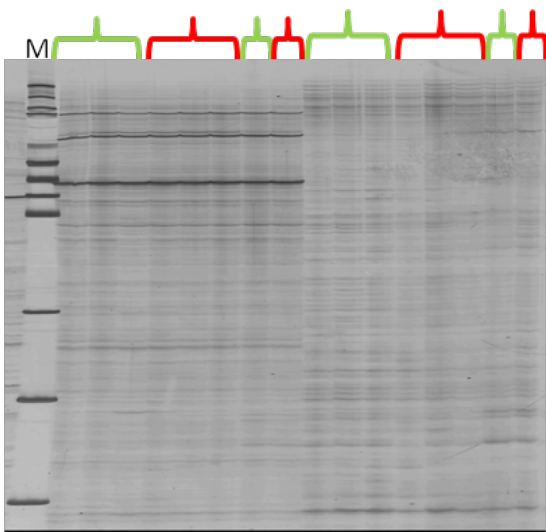


Figura 3 Esempio di profilo elettroforetico MSAP ottenuto su foglie (lines 1-6; 9-14) e radici (lines 7-8; 15-16) della varietà di lattuga Analena (lines 1-8 Digestione *EcoRI-MspI*; lines 9-16 Digestione *EcoRI-HpaII*). I campioni derivati da piante fertilizzate con concimi minerali sono indicati in verde, mentre quelli derivati da piante ammendate con compost sono indicati in rosso. Nella posizione indicata con M è riportato il marcatore di peso molecolare.



Relazione delle attività di ricerca svolte in base agli obiettivi proposti al punto 3

7.3.3 Definizione di sistemi orticoli conservativi delle risorse ambientali attraverso la valorizzazione della frazione organica dei rifiuti solidi urbani stabilizzata mediante compostaggio.

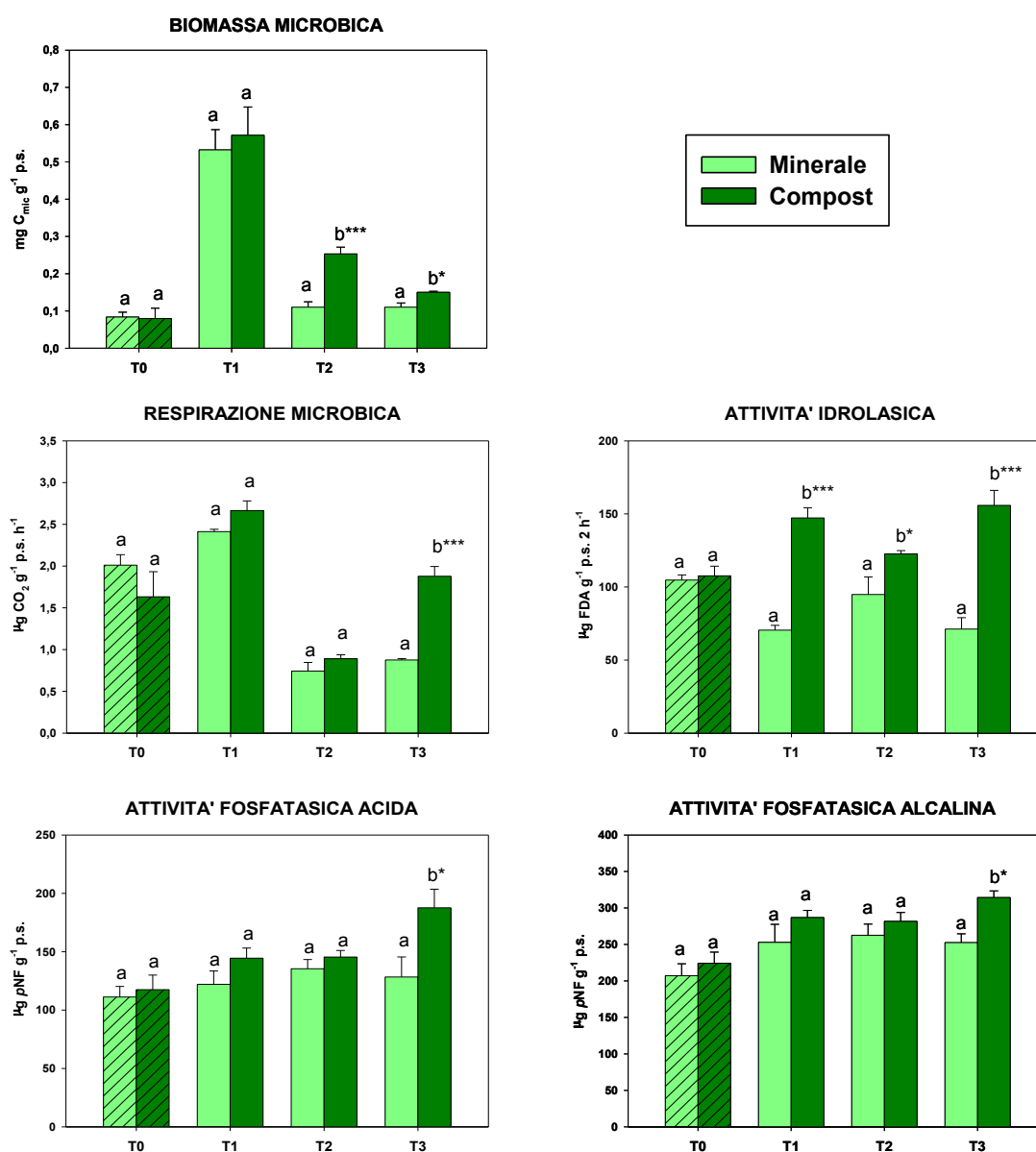
7.3.3 A e B Stima della biomassa microbica e dell'attività biologica del suolo.

Nell'agricoltura industriale il ricorso a pratiche agronomiche non conservative della risorsa suolo, come le lavorazioni intensive e l'uso massiccio e continuativo dei fertilizzanti minerali, risulta deleterio per il mantenimento di una serie di equilibri ecologici del sistema suolo nei quali la componente microbica svolge un ruolo chiave. Uno dei principali effetti della fertilizzazione con compost sulle proprietà del suolo, oltre a quello di fornire elementi nutritivi per la crescita delle colture, è la stimolazione della microflora edafica e della sua attività metabolica, che influisce positivamente sulla qualità biologica del suolo e, conseguentemente, sulla sua fertilità. Un suolo con intensa attività microbica presenta una maggiore efficienza dei cicli biogeochimici e una maggiore resistenza all'attacco di patogeni tellurici grazie a fenomeni di antagonismo e antibiosi, rispetto ad un suolo impoverito della sua componente microbica. Inoltre, la microflora del suolo produce sostanze biologicamente attive con effetto ormono-simile che stimolano la crescita delle piante. Per valutare i benefici derivanti dall'ammendamento organico si è scelto di monitorare alcuni parametri biochimici riconosciuti dalla letteratura scientifica come indicatori della qualità biologica del suolo. In particolare sono stati monitorati la biomassa microbica, la respirazione e tre attività enzimatiche: l'attività idrolasica totale, l'attività fosfatasica acida e quella alcalina. Tutti questi parametri sono stati determinati prima dell'inizio della prova agronomica (T0) e alla fine del ciclo colturale di ciascun anno di sperimentazione, ovvero nel marzo del 2010 (T1), 2011 (T2) e 2012 (T3). Da ogni parcella sono stati prelevati 8 subcampioni di suolo nello strato 0-10 cm, uniti a formare un campione omogeneo per ciascuna parcella. I campioni sono stati poi setacciati e conservati a 4°C fino a completamento delle analisi. Tutte le analisi sono state effettuate su due repliche di laboratorio.

La biomassa microbica è stata determinata come carbonio microbico con il metodo della fumigazione-estrazione (Vance et al., 1987); il carbonio contenuto negli estratti ottenuti da campioni di suolo fumigati e non fumigati è stato analizzato mediante misuratore TOC-Shimadzu. Le attività enzimatiche sono state determinate utilizzando specifici substrati cromogeni, il diacetato di fluoresceina (FDA) per l'attività idrolasica totale e il *p*-nitrofenil-disodio-ortofosfato esaidrato, somministrato in soluzione tampone a pH 6,5 e 11, per l'attività fosfatasica acida e alcalina. Dopo opportuna incubazione, la concentrazione del prodotto della reazione enzimatica è stata determinata per via spettrofotometrica e convertita in valori di attività enzimatica mediante interpolazione delle assorbanze su rette di taratura opportunamente costruite mediante soluzioni standard.

I risultati sono riportati in figura 4. Al tempo T0 per nessuno dei parametri analizzati sono state evidenziate differenze tra le parcelle destinate ad essere ammendate con il compost e quelle destinate alla fertilizzazione minerale. Ciò indica che le condizioni di partenza del suolo che ha ospitato la prova erano abbastanza omogenee riguardo alle proprietà biologiche oggetto di studio. Dopo il primo ammendamento con compost (T1), solo l'attività idrolasica totale era significativamente differente ($P < 0,001$) tra le parcelle trattate con le due strategie di fertilizzazione, con valori all'incirca doppi in COMP rispetto a MIN. Dopo due ammendamenti (T2), oltre all'attività idrolasica, anche la biomassa microbica era significativamente maggiore ($P < 0,01$ per entrambi i parametri) nel suolo delle parcelle trattate con compost rispetto a quelle trattate con i fertilizzanti minerali. Dopo il terzo ammendamento (T3), tutti gli indicatori biologici monitorati risultavano significativamente incrementati nelle parcelle ammendate con il compost. Questi risultati indicano che ammendamenti ripetuti annualmente con 15 t ha^{-1} di compost producono importanti modificazioni nelle proprietà biologiche del suolo migliorandone la qualità, con effetti che risultano cumulativi ad ogni successivo trattamento. Inoltre, mentre alcune proprietà biologiche del suolo variano molto rapidamente, altre richiedono più trattamenti prima che gli effetti diventino evidenti, almeno nel caso di dosi relativamente basse, come quelle impiegate in questa prova. In particolare, l'incremento della biomassa microbica nelle parcelle trattate con compost indica un miglioramento delle condizioni di abitabilità per i microrganismi del suolo; l'incremento della respirazione e dell'attività idrolasica totale indicano, rispettivamente, un effetto positivo sul metabolismo ossidativo della microflora del suolo e sulla sua attività eterotrofica in generale; infine, l'incremento dell'attività fosfatasica (acida e alcalina) indica una maggiore capacità del sistema enzimatico del suolo di rendere disponibile per le colture, sotto forma di fosfato inorganico, il fosforo legato alla sostanza organica.

Figura 4. Biomassa microbica, respirazione e tre attività enzimatiche (valori medi $\pm$ errori standard) misurati prima dell'inizio dell'esperimento (T0), nel suolo delle parcelle destinate all'ammendamento con compost o alla fertilizzazione minerale, e alla fine del ciclo colturale del 2010 (T1), del 2011 (T2) e del 2012 (T3), nelle parcelle sottoposte ai due tipi di fertilizzazione. Per ogni singolo campionamento lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per $P < 0,05$ (*) o $P < 0,001$ (***)

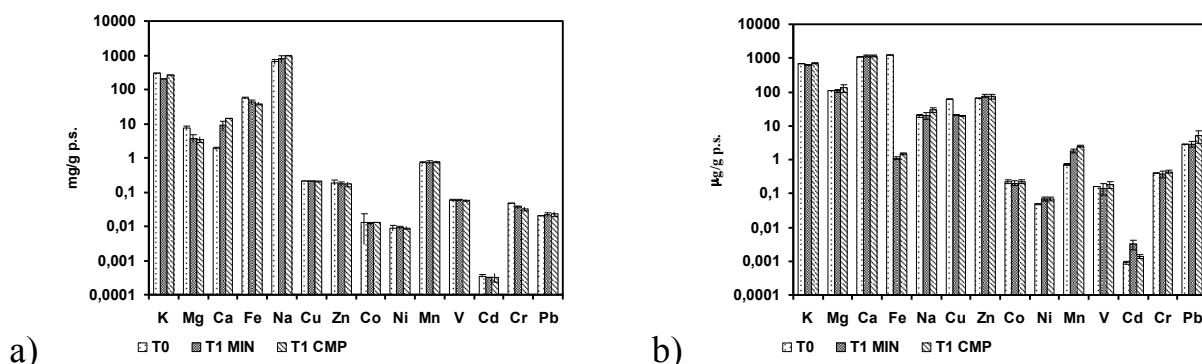


7.3.3 C Disponibilità di nutrienti, con particolare riferimento alla frazione minerale dell'azoto.

Per poter valutare in modo corretto gli effetti che le due diverse tipologie di fertilizzazione, quella minerale e quella fatta mediante ammendamento del terreno con compost ottenuto dalla frazione organica dei residui solidi urbani (FORSU), hanno prodotto sulla produzione delle varietà di insalate coltivate nell'Agro nocerino non si può prescindere da una analisi dei terreni su cui tale coltivazione avviene.

Il terreno campionato, sia prima della fertilizzazione e della coltivazione (tempo T0), che dopo la raccolta delle piante di lattuga (tempo T1), è stato successivamente sottoposto ad analisi per la determinazione di alcuni metalli considerati per la pianta nutrienti o elementi non essenziali, valutandoli sia come concentrazione totale, che come frazione disponibile (Figure 5).

Figura 5 a) Istogramma in scala logaritmica delle concentrazioni dei metalli totali al tempo T0 prima della fertilizzazione e della coltivazione ed al tempo T1 per le parcelle di terreno dopo fertilizzazione (MIN = minerale, CMP = compost) e coltivazione. b) Istogramma in scala logaritmica delle concentrazioni dei metalli disponibili al tempo T0 prima della fertilizzazione e della coltivazione ed al tempo T1 per le parcelle di terreno dopo fertilizzazione (MIN = minerale, CMP = compost) e coltivazione.



Le concentrazioni totali dei metalli (Fig. 5a) misurate a T0 sono confrontabili con quelle dei vari elementi presenti nella crosta terrestre e con le concentrazioni medie riportate per altri suoli italiani. Al tempo T1, le analisi condotte per la determinazione delle concentrazioni dei metalli totali nel suolo, non hanno mostrato differenze sostanziali per le diverse fertilizzazioni ad eccezione di Na, Pb e Ca, che presentano valori leggermente più alti rispetto a T0 per entrambi i tipi di fertilizzazione. Un'analisi dei risultati ottenuti per le parcelle di terreno al tempo T1 trattate con i due diversi tipi di fertilizzazione ha evidenziato che la fertilizzazione minerale ha determinato un maggior accumulo di Cu e Ni, mentre il compost di Mn.

Per i metalli disponibili (Fig. 5b), il confronto dei risultati ottenuti dalle analisi fatte per il terreno al tempo T0 e al tempo T1 mostra un contenuto di elementi come Fe e Cu nelle parcelle fertilizzate inferiore rispetto allo stato iniziale; mentre, al contrario,

Cd, Mn e Ni presentano una frazione disponibile leggermente più elevata dopo fertilizzazione e coltivazione rispetto al contenuto iniziale. Un aumento certamente meno evidente si osserva anche per elementi come Zn e Ca. Facendo un confronto tra i diversi tipi di fertilizzazione si evince che quella minerale ha apportato leggermente più Cu, mentre l'ammendamento con compost ha apportato una piccola quantità di V, Pb, Mg, Mn e Cr.

La concentrazione totale degli elementi nel suolo, ma ancor più la frazione di questi elementi disponibile all'assorbimento da parte delle colture, influenza le caratteristiche della produzione orticola, da un punto di vista qualitativo. Infatti, se da un lato è importante la presenza di nutrienti utili al metabolismo umano, d'altra parte preoccupa l'eventuale accumulo di elementi tossici, quali alcuni metalli pesanti. Per questo motivo, è di fondamentale importanza l'analisi elementare delle parti eduli (foglie) delle varietà di insalata coltivate. Per comprendere l'entità della traslocazione degli elementi alle foglie, sono state analizzate anche le radici delle stesse piante, quali organo di assorbimento e verosimilmente di accumulo. Foglie e radici di tutte le varietà di insalate riportate nella Tabella 1, coltivate su suolo ammendato con compost e su suolo a fertilizzazione minerale e campionate nel corso dei tre anni di sperimentazione in campo, sono state analizzate separatamente.

Da ciascuna delle parcelle sperimentali sono stati prelevati 2-3 cespi per ciascuna varietà; da questi sono state selezionate le foglie più giovani, normalmente commercializzate, e le radici. I sub-campioni sono stati successivamente uniti per ottenere un unico campione rappresentativo per organo, varietà e trattamento. Su tutti i campioni di foglie, seccati in stufa a 75 °C, è stato determinato il tenore idrico, variabile tra il 63 e il 98% del peso fresco, a seconda della specie e della varietà analizzata. Questa determinazione risulta di fondamentale importanza per il confronto della concentrazione dei metalli analizzati con i valori di concentrazione imposti dal Regolamento (CE) n. 629/2008 della Commissione del 2 luglio 2008, che modifica il Regolamento (CE) n. 1881/2006, sui tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Nei regolamenti CE, le concentrazioni massime dei metalli vengono infatti riferite al peso fresco del campione.

La concentrazione degli elementi (K, Mg, Na, Zn, Fe, Mn, Cu, Cd, Pb, Ni, Cr, V) nei campioni dell'annata agraria 2010 è stata determinata per spettrometria ad assorbimento atomico, utilizzando un sistema di atomizzazione a fiamma aria-acetilene o a fornello di grafite, in relazione alle concentrazioni dell'elemento nel campione; la concentrazione degli stessi elementi nei campioni delle annate agrarie 2011 e 2012 è stata determinata per spettrometria ad emissione ottica al plasma ad accoppiamento induttivo. Le analisi sono state effettuate sempre su campioni seccati a 75 °C, polverizzati manualmente in azoto liquido e mineralizzati in soluzioni acide (combinazione di acido nitrico e fluoridrico) con l'ausilio di un forno a microonde. Per valutare l'accuratezza dei dati ottenuti, materiale standard di riferimento di origine vegetale (Pine needles 1575a - NIST, 2004) è stato sottoposto alle stesse procedure analitiche dei campioni, in modo da poter correggere eventualmente i dati rispetto ad un fattore di recupero.

Le differenti specie e le varietà analizzate hanno presentato una diversa capacità di accumulo dei metalli in foglie e radici, indipendentemente dal trattamento di fertilizzazione del suolo. Per entrambi i trattamenti, gli ortaggi a foglia larga hanno presentato, per la maggior parte degli elementi analizzati, concentrazioni più elevate nelle radici; fanno eccezione il Cd, che ha mostrato concentrazioni mediamente più alte nelle foglie e Cr, Mn, Ni e Zn, che hanno presentato concentrazioni generalmente confrontabili nei due organi. Nessuna significativa differenza di concentrazione di elementi, sia essenziali che tossici, è risultata attribuibile alle modalità di fertilizzazione del suolo. Ciò che invece appare preoccupante è l'elevata concentrazione di Cd nelle foglie delle varietà analizzate, soprattutto di lattuga e di indivia che, indipendentemente dal trattamento di fertilizzazione del suolo, hanno spesso presentato valori vicini o superiori al limite (0,2 µg/g p.f.) indicato dal Regolamento (CE) n. 629/2008 sui tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Queste elevate concentrazioni sono preoccupanti se si considera che il cadmio è un elemento non essenziale, tossico e cancerogeno (IARC, 2011) e che lattuga ed indivia, che accumulano elevate quantità di metalli nelle foglie rispetto ad altri ortaggi, sono ampiamente utilizzate nell'alimentazione umana. Talvolta le concentrazioni più elevate sono state misurate in funzione della fertilizzazione minerale, sebbene le differenze tra trattamenti non siano risultate significative.

Dipartimento di Chimica e Biologia
Università degli Studi di Salerno
Via Giovanni Paolo II, 132
84084 Fisciano (SA)

Prof. Stefano Castiglione.