



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia – Nutrizione e Ambiente

TESI DI LAUREA

**EFFETTO DELLA COMPOSIZIONE DEL SUOLO E DELL'APPLICAZIONE DI CONSORZI MICROBICI (COMUNITÀ
SINTETICHE E MICORRIZE) SULLA COMPOSIZIONE DELL'UVA NEBBIOLO**

Relatore

Prof. Jean Daniel COÏSSON

Correlatore

Dott. Manuel MARTOCCIA



Firmato digitalmente da Jean Daniel
Coisson
Data: 11.03.2026 17:11:54 CET
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DEL PIEMONTE ORIENTALE/01943490027

Candidato

Mirko TUNESI

Matricola

20023292

Sessione Straordinaria

A.A. 2024/2025

INDICE

Abbreviazioni.....	
1. INTRODUZIONE	1
• Botanica della vite: descrizione della pianta e del suo ciclo vitale	1
• Struttura dell'acino d'uva	3
• Uva Nebbiolo.....	3
1.1. COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'UVA.....	5
• Acqua	5
• Zuccheri	5
• Acidi Organici	7
• Composti Polifenolici.....	8
• Flavonoidi	9
• Flavanoli	10
• Flavonoli	11
• Antociani.....	12
• Proantocianidine	13
• Composti non flavonoidi.....	14
• Sostanze Aromatiche	16
• Minerali.....	17
1.2. Parametri che potrebbero influenzare la crescita e la composizione dell'uva.....	18
• Il suolo.....	19
• Trattamento AMF.....	26
• Trattamento SynCom	29
2. SCOPO DEL LAVORO.....	31
3. MATERIALI E METODI	32
3.1. Campioni.....	32
3.1.1. Preparazione Campioni	35
3.2. Analisi di base.....	35
3.2.1. Umidità	35
3.2.2. pH e Acidità Titolabile	36
3.2.3. Solidi Solubili e Indice di Maturazione	37
3.3. Analisi Spettrofotometriche	38
3.3.1. Polifenoli Totali (Folin)	39

3.3.2.	Flavonoidi Totali (AlCl ₃).....	40
3.3.3.	Antociani Totali e Monomerici.....	42
3.3.4.	Proantocianidine (DMAC)	43
3.3.5.	Attività Antiradicalica (ABTS e DPPH)	45
3.3.6.	Attività Antiossidante (FRAP)	48
3.4.	Analisi in HPLC	50
3.4.1.	Composti Polifenolici	50
3.4.2.	Zuccheri.....	53
3.4.3.	Acidi Organici.....	55
3.5.	Analisi Statistica.....	57
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	58
4.1.	Analisi di base.....	59
4.1.1.	Umidità	60
4.1.2.	pH e Acidità Titolabile	64
4.1.3.	Solidi Solubili e Indice di Maturazione	68
4.2.	Analisi spettrofotometriche.....	71
4.2.1.	Polifenoli Totali (Folin)	71
4.2.2.	Flavonoidi Totali (AlCl ₃).....	74
4.2.3.	Antociani Totali e Monomerici.....	78
4.2.4.	Proantocianidine (DMAC)	83
4.2.5.	Attività Antiradicalica (ABTS e DPPH)	86
4.2.6.	Attività Antiossidante (FRAP)	91
4.3.	Analisi in HPLC	94
4.3.1.	Composti Polifenolici	94
4.3.2.	Zuccheri.....	108
4.3.3.	Acidi Organici.....	112
4.4.	Analisi Statistica.....	116
5.	CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	122
6.	RINGRAZIAMENTI	124
7.	BIBLIOGRAFIA	125

Abbreviazioni

ABTS: Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-solfonico)

Abs: Absorbance

AMF: Arbuscular Mycorrhizal Fungi

ANOVA: Analysis of Variance

BL-DMAC: Brunswick Laboratories 4-dimethylaminocinnamaldehyde

CE: Catechin equivalents

C3GE: Cianidina-3-O-glucoside equivalenti

CNR: Consiglio Nazionale delle Ricerche

CREA: Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazile

DW: Dry weight

FAO: Food and Agriculture Organization

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

FW: Fresh weight

GAE: Gallic acid equivalents

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

NT: No Tillage

OIV: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin

PAC: Proantocianidine

PCA: Principal Component Analysis

SS: Soluble solids

SynCom: Synthetic microbial communities

T: Tillage

TA: Titratable Acidity

TE: Trolox Equivalents

TPTZ: 2,4,6-tri(2-pyridyl) -1,3,5-triazina

UE: Unione Europea

1. Introduzione

L'Italia occupa una posizione di assoluto rilievo nel settore vitinicolo internazionale, in quanto la coltivazione della vite non rappresenta soltanto un pilastro economico, ma un vero e proprio simbolo dell'identità culturale e sociale del Paese.

Analizzando le rilevazioni più recenti, nel 2023 la superficie coltivata con viti sul territorio nazionale si è attestata su 713,350 ettari, con un rendimento medio di circa 9.348,6 Kg per ettaro. Tali cifre confermano il profondo legame tra il territorio e la viticoltura, favorita da condizioni pedoclimatiche ottimali e da una costante evoluzione delle metodologie agricole, che hanno garantito elevati standard produttivi. Nello specifico, la produzione complessiva ha raggiunto le 6.668.830 tonnellate di uva, ripartite tra il consumo interno, che assorbe poco meno della metà del raccolto, e il mercato estero¹.

Sebbene l'uva trovi impiego sia per il consumo fresco sia per diverse trasformazioni agroalimentari, come succhi o uva passa, il suo sbocco principale rimane la vinificazione². In questo ambito, l'Italia detiene il primato mondiale: nel 2024 la produzione ha toccato i 44 milioni di ettolitri, incidendo per il 19,5% sul totale globale. La leadership italiana è confermata anche sul fronte delle esportazioni, in cui il nostro paese contribuisce al 21,8% dell'export mondiale, posizionandosi come principale esportatore di vino³.

Botanica della vite: descrizione della pianta e del suo ciclo vitale

Dal punto di vista sistematico, la vite appartiene alla famiglia delle *Vitaceae*, la quale si dirama nelle sottofamiglie *Lecoldeae* e *Ampelideae*. All'interno di quest'ultima, il genere *Vitis* (nello specifico il sottogenere *Euvitis*) è l'unico a rivestire un ruolo centrale in campo agroalimentare, mentre gli altri generi sono destinati prevalentemente al florovivaismo ornamentale.

Il gruppo *Euvitis* si suddivide in tre grandi ceppi geografici:

- Specie americane: *V. rupestris*, *V. lambrusca*, *V. coriacea*. Sono sfruttate principalmente come portainnesti per la loro capacità di trasmettere agli ibridi resistenza ai patogeni e alle basse temperature.
- Specie asiatiche: *V. amurensis*, *V. armata*. Anch'esse utilizzate come portainnesti, si distinguono per un'estrema tolleranza al gelo (fino a -40°C) e per l'assenza del tipico sentore "foxy" (selvatico) tipico delle varietà americane.

- Specie eurasiatica: la *Vitis vinifera* rappresenta l'unica specie di rilievo per la produzione enologica globale grazie alle sue eccelse proprietà organolettiche, nonostante una spiccata vulnerabilità alle malattie parassitarie^{2,4}.

Vitis vinifera si distingue nelle sottospecie *sylvestris* (selvatica) e *vinifera* (coltivata). Il processo di domesticazione, avvenuto tra l'VII e il VI sec. a.C., ha favorito la sottospecie *vinifera* per la sua attitudine all'autoimpollinazione e per la qualità dei frutti, portando però a una progressiva erosione della biodiversità delle forme selvatiche⁵. Sotto il profilo legale, la produzione vinicola è strettamente normata dal Regolamento (UE) n. 1308/2013, che autorizza la vinificazione solo delle varietà iscritte nei registri ufficiali. In Italia, ciò comporta il divieto di vinificare varietà storiche come il *Clinton* o l'*Isabella*, permettendo l'uso di altre specie di *Vitis* esclusivamente come portainnesti per contrastare la fillossera, insetto fitofago della vite.

La struttura della vite si distingue in un apparato radicale e uno epigeo. Le radici non si limitano all'ancoraggio e all'assorbimento di nutrienti, ma mostrano adattamenti specifici: un angolo geotropico ampio, come quello di *V. riparia*, indica un apparato superficiale, mentre un angolo stretto, come quello di *V. rupestris*, denota uno sviluppo profondo, ideale per resistere a stress idrici⁴.

La porzione epigea della vite comprende il ceppo, o fusto, e i tralci, ovvero i rami e le foglie. Queste ultime sono fondamentali in quanto sono indicatori dello stato di salute della pianta: alterazioni cromatiche come l'ingiallimento o l'arrossamento possono rivelare, rispettivamente, carenze di azoto/ferro o fosforo/potassio. L'inflorescenza è composta da fiori ermafroditi e l'impollinazione è prevalentemente anemofila, ovvero dovuta al vento, sebbene sia facilitata da insetti pronubi. Il frutto, rappresentato dall'acino, è una bacca strutturata in un grappolo sostenuto dal raspo^{6,7}.

Il ciclo della vite prosegue, dopo la fioritura, con l'allegagione, fase in cui il fiore si trasforma in frutto sotto stimolo ormonale. In questo stadio, possono verificarsi la colatura, ovvero la caduta dei fiori non fecondati, o l'acinellatura, lo sviluppo di acini minuscoli privi di vinaccioli, che influenzano la resa del prodotto finale⁶.

A queste segue la fase erbacea, in cui l'acino aumenta di volume pur restando verde e duro, che è seguita dall'invaiaatura, momento critico in cui la bacca cambia colore e si ammorbidisce grazie alla sintesi di flavonoidi e antociani. Il ciclo si conclude con la maturazione, che definisce il momento ottimale per la raccolta e la vendemmia, prima che inizino eventuali processi di degradazione o ultramaturazione^{4,6}.

Struttura dell'acino d'uva

L'acido è un sistema complesso divisibile in tre strati.

L'epicarpo rappresenta la buccia ed è circa il 10-15% del peso dell'acino. È importante in quanto è ricco di polifenoli, tannini e sostanze pectiche; inoltre è rivestito dalla pruina, cera naturale che protegge il frutto e ne regola l'idratazione⁸. A seconda della varietà d'uva può essere sottile, spesso, coriaceo o tenero.

Il mesocarpo, ossia la polpa, incide con una percentuale dell'80-85% sul peso finale. Costituisce la riserva idrica e zuccherina della bacca, contenendo anche una quota di acidi organici.

L'endocarpo, membrana che avvolge i vinaccioli, è circa il 5% del peso. I semi, solitamente 2-4 in ogni acino, sono ricchi di lipidi e tannini⁴.

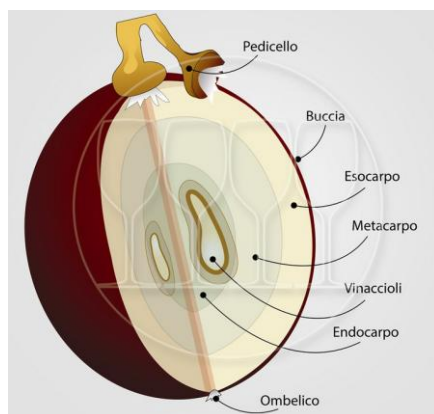


Figura 1: Struttura di un acino d'uva

Uva Nebbiolo

Il Nebbiolo rappresenta uno dei vitigni autoctoni più prestigiosi del Piemonte, con testimonianze storiche che risalgono almeno al 1268, anno della sua prima menzione ufficiale a Rivoli sotto l'appellativo di "Nibiol".⁹ L'etimologia del nome è tuttora dibattuta: potrebbe richiamare l'estesa presenza di pruina sulla buccia dell'acino, che gli conferisce un aspetto "annebbiato", oppure ricollegarsi al periodo di raccolta tardivo, che coincide tipicamente con le prime nebbie autunnali di ottobre.

La zona principale della sua coltivazione si trova nelle aree delle Langhe e del Roero, territori d'elezione per la produzione di denominazioni d'eccellenza come Barolo, Barbaresco, Nebbiolo d'Alba e Roero. Sebbene la sua presenza si estenda ad altre zone piemontesi (Monferrato, Canavese, Alto Novarese) e ad areali limitrofi dalle specifiche condizioni pedoclimatiche (Valtellina e Valle

d'Aosta), il Nebbiolo manifesta una spiccata sensibilità territoriale. I tentativi di coltivazione in altre regioni italiane (Umbria, Abruzzo, Basilicata) o in contesti internazionali non hanno prodotto risultati qualitativi paragonabili, a causa della perdita dei tratti distintivi del vitigno, limitandone di fatto una diffusione globale su vasta scala^{9,10}.

Sotto il profilo colturale, il Nebbiolo è considerato un vitigno "difficile" ed esigente. Predilige esposizioni collinari ben soleggiate, con altitudini comprese tra i 200 e i 500 metri s.l.m., al fine di proteggere la pianta dalle gelate primaverili. Il suo ciclo biologico è particolarmente esteso: caratterizzato da un germogliamento precoce (fine marzo) e una maturazione tardiva (fine ottobre), questo ampio intervallo temporale favorisce l'accumulo di un corredo polifenolico complesso, un'ottima spalla acida e un profilo aromatico profondo.

Il Nebbiolo si differenzia nettamente da altre cultivar a bacca rossa per la sua peculiare composizione biochimica:

- Il profilo antocianico, rispetto ad altri vigneti, rappresenta una concentrazione di antociani relativamente bassa, fattore che lo rende vulnerabile agli stress termici, come temperature superiori a 30° C, in quanto possono andare a compromettere la stabilità del colore dato dagli antociani¹¹. la sua "impronta digitale" chimica è definita dalla prevalenza di peonidina-3-O-glucoside, a differenza di varietà come Merlot o Syrah, dove domina la malvidina-3-O-glucoside¹².
- Il contenuto di tannini fa sì che questa varietà si distingua, in quanto contiene un'elevata concentrazione di proantocianidine¹³, che conferiscono ai vini una struttura tannica imponente e una grande attitudine all'invecchiamento.
- In presenza di avversità ambientali, stress, il vitigno reagisce attivando geni specifici, come la *stilbene sintasi*, determinando un incremento significativo dei livelli di resveratrolo¹⁴.

1.1 COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'UVA

Acqua

L'acino d'uva è costituito prevalentemente da acqua, che rappresenta circa il 75-85% del suo peso fresco. Tale componente esercita un ruolo determinante nel modulare la concentrazione delle altre sostanze presenti, tra cui zuccheri solubili, acidi organici e composti fenolici, incidendo in maniera significativa sulle caratteristiche qualitative dell'uva. Le variazioni nelle concentrazioni di questi metaboliti possono essere attribuite sia a fenomeni di diluizione o concentrazione legati alle modificazioni del volume cellulare, sia alle condizioni di stress idrico, che influenzano in maniera rilevante direttamente i processi biosintetici responsabili della loro produzione.¹⁵

Il trasporto dell'acqua all'interno della pianta avviene mediante due sistemi vascolari distinti e funzionalmente complementari: lo xilema e il floema. Nelle prime fasi dello sviluppo dell'acino, l'approvvigionamento idrico è garantito principalmente dallo xilema, tessuto deputato al movimento ascendente dell'acqua e degli elementi minerali dalle radici verso gli organi epigei, incluse foglie e frutti neoformati.

Con il progredire della maturazione, in particolare dopo l'invaiaatura, si osserva una progressiva riduzione del contributo xilematico e una predominanza del floema nel rifornimento d'acqua al frutto. Il floema diventa quindi la principale via di traslocazione dei prodotti fotosintetici, in particolare zuccheri e soluti organici, dalle foglie agli acini in accrescimento. Questa transizione comporta un parziale disaccoppiamento idrico del frutto rispetto alla pianta madre, consentendo una maggior stabilità del suo stato idrico anche in presenza di fluttuazioni ambientali.

La regolazione del flusso idrico è ulteriormente modulata da gradienti osmotici e dall'attività delle acquaporine, ovvero proteine di membrana che facilitano il movimento dell'acqua attraverso le membrane cellulari. La comprensione integrata di questi meccanismi risulta essenziale per definire il livello ottimale di disponibilità idrica, condizione imprescindibile per il raggiungimento di standard qualitativi elevati nella produzione vitivinicola.⁸

Zuccheri

Il contenuto zuccherino degli acini rappresenta un indicatore chiave di qualità sia per l'uva da consumo fresco sia per quella destinata alla trasformazione enologica, in quanto incide direttamente sul potenziale alcolico del vino ottenuto. La quantità di zuccheri fermentescibili determina l'entità della conversione in etanolo durante la fermentazione alcolica.

Evidenze scientifiche recenti hanno messo in luce una relazione tra il tenore zuccherino e la sintesi di metaboliti secondari, in particolare degli antociani, suggerendo un'interazione tra accumulo di zuccheri e modulazione delle vie biosintetiche responsabili del colore e di altri attributi qualitativi dell'uva.¹⁶

I monosaccaridi predominanti nell'acino d'uva sono glucosio e fruttosio, presenti complessivamente in concentrazioni generalmente comprese tra 150 e 250 g/L, sebbene questi valori possano variare in funzione del genotipo e delle condizioni climatiche. Nelle fasi precoci di sviluppo si riscontra una prevalenza del glucosio, mentre con l'avanzare della maturazione, il rapporto glucosio/fruttosio tende a stabilizzarsi attorno 1:1. In condizioni di sovraturazione si osserva un incremento del fruttosio. Generalmente, le varietà destinate alla vinificazione raggiungono concentrazioni zuccherine superiori rispetto a quelle da tavola; cultivar caratterizzate da cicli vegeto-produttivi più lunghi mostrano maggior capacità di accumulo glucidico.¹⁷

L'invasatura costituisce una fase cruciale per la dinamica degli zuccheri: in questo stadio si verifica un rapido e consistente trasferimento di saccarosio dalle foglie agli acini attraverso il floema, seguito dalla sua idrolisi e dall'accumulo di glucosio e fruttosio nei vacuoli cellulari. Anche il portainnesto svolge un ruolo importante, in quanto influenza l'assorbimento idrico e minerale, ma anche l'efficienza fotosintetica e il vigore vegetativo, fattori che condizionano complessivamente la disponibilità di assimilati destinati agli acini.⁸

Negli ultimi decenni si è registrato un incremento generalizzato del contenuto zuccherino in numerosi vitigni associato all'aumento delle temperature medie e alle modificazioni attuate nelle pratiche agronomiche. Oltre ai cambiamenti climatici, è stata avanzata l'ipotesi di influenza del mercato, nota come "effetto Parker", secondo cui la crescente domanda di vini più strutturati, maturi e concentrati avrebbe indotto i produttori a posticipare la vendemmia, prolungando la permanenza degli acini sulla pianta, favorendo un ulteriore accumulo di zuccheri.¹⁸

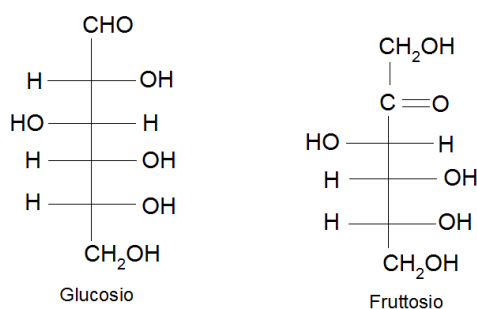


Figura 2: Struttura dei principali monosaccaridi presenti nell'uva.⁸⁶

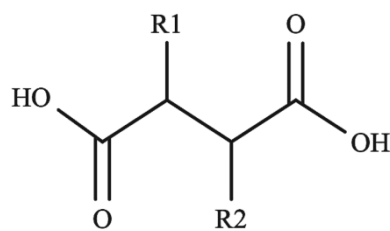
Acidi organici

Gli acidi organici costituiscono una classe di molecole a basso peso molecolare, composte principalmente da carbonio, idrogeno e ossigeno, largamente diffuse nei tessuti vegetali e presenti in concentrazioni rilevanti anche nell'uva. Essi svolgono un ruolo determinante nella definizione delle caratteristiche organolettiche del succo e del vino, contribuendo alla percezione di freschezza gustativa, alla modulazione dell'aroma, alla stabilità del colore e all'equilibrio chimico-fisico del prodotto finale. L'acidità rappresenta uno dei parametri fondamentali per la qualità enologica, incidendo sia sulla bevibilità del prodotto, sia sulla sua conservabilità.⁸

Nell'uva i principali acidi organici sono l'acido tartarico e l'acido malico, ai quali si aggiungono l'acido succinico e l'acido citrico in concentrazioni minori. L'acido tartarico ha un'importanza peculiare, in quanto è considerato un elemento distintivo della specie *Vitis vinifera*: esso non è presente nella maggior parte delle altre specie fruttifere. La sua sintesi avviene prevalentemente nelle prime fasi dello sviluppo dell'acino, con un accumulo progressivo che raggiunge il massimo in prossimità dell'invasatura. Successivamente, la concentrazione tende a ridursi lievemente per effetto dei fenomeni di diluizione legati all'accrescimento del frutto, mantenendosi relativamente stabile fino alla maturazione.¹⁹

Diversamente, l'acido malico, pur risultando abbondante nelle fasi iniziali e durante l'invasatura, è soggetto ad una marcata diminuzione nelle fasi terminali della maturazione. Tale decremento è principalmente riconducibile al suo utilizzo nei processi respiratori cellulari, che ne determinano una progressiva degradazione, portando a concentrazioni finali generalmente inferiori rispetto a quelle dell'acido tartarico.¹⁷

Oltre agli acidi principali, nell'acino troviamo anche composti organici in quantità minori, ossia gli acidi ossalico, succinico, gluconico e ascorbico. Sebbene presenti in concentrazioni ridotte, contribuiscono in modo significativo al profilo sensoriale complessivo, influenzando parametri come astringenza, freschezza e equilibrio gustativo. In particolar modo l'acido ascorbico svolge una funzione antiossidante, partecipando ai meccanismi di protezione nei confronti dei fenomeni ossidativi che possono compromettere la qualità del mosto e del vino.



Succinic acid ; $R_1 = H$, $R_2 = H$

Malic acid ; $R_1 = OH$, $R_2 = H$

Tartaric acid ; $R_1 = OH$, $R_2 = OH$

Figura 3: Struttura dei principali acidi organici presenti nell'uva.⁸⁷

Composti polifenolici

I composti fenolici rappresentano una vasta e strutturalmente diversificata categoria di molecole caratterizzate dalla presenza di almeno un anello aromatico, a cui sono legati uno o più gruppi ossidrilici. Si tratta di metaboliti secondari che la pianta sintetizza nel corso del proprio sviluppo fisiologico e in risposta a specifici stimoli ambientali, quali condizioni di stress biotico e abiotico, esposizione a radiazioni ultraviolette e attacchi di patogeni.²⁰ La loro biosintesi è connessa alla via dello shikimato e al metabolismo dei fenilpropanoidi, che costituiscono nodi centrali nella regolazione delle risposte adattative della pianta.

Dal punto di vista qualitativo, i composti fenolici svolgono un ruolo determinante nel definire il profilo sensoriale dell'uva e dei prodotti enologici derivati. Essi contribuiscono in maniera significativa alla formazione del colore, in particolare nei vitigni a bacca rossa, e influenzano parametri quali aroma, sapore, amarezza e astringenza, nonché incidono sulla struttura e sulla complessità gustativa del vino.¹⁹ L'interazione tra le differenti classi fenoliche e altri costituenti del mosto condiziona inoltre la stabilità cromatica e l'evoluzione organolettica durante l'invecchiamento.

Oltre all'importanza che questa classe di molecole ricopre a livello tecnologico e enologico, i polifenoli dell'uva sono oggetto di interesse per i loro potenziali effetti benefici sulla salute umana. Numerosi studi clinici e sperimentali suggeriscono che il consumo moderato e regolare di derivati dell'uva, quali succhi, estratti e vini, possa contribuire alla riduzione dei processi infiammatori e dello stress ossidativo, grazie alle proprietà antiossidanti di queste molecole. È stato ipotizzato un loro ruolo nella prevenzione di patologie croniche multifattoriali, tra cui obesità, diabete mellito e malattie cardiovascolari, attraverso meccanismi che portano alla modulazione delle vie infiammatorie e del metabolismo lipidico e glucidico.²¹

Dal punto di vista strutturale e biosintetico, i polifenoli dell'uva possono essere suddivisi in due macrocategorie: flavonoidi e non flavonoidi, gruppi che si differenziano per organizzazione molecolare, distribuzione nei tessuti dell'acino e contributo alle proprietà chimico-sensoriali complessive.

Flavonoidi

I flavonoidi costituiscono una delle principali sottoclassi dei composti fenolici e sono caratterizzati da una struttura di base a 15 atomi di carbonio, organizzata secondo uno schema C6-C3-C6. Tale architettura molecolare comprende due anelli aromatici, indicati convenzionalmente come anello A e anello B, collegati da un anello eterociclico centrale a tre atomi di carbonio, detto anello C.

Le diverse classi di flavonoidi si distinguono in funzione del grado di ossidazione dell'anello eterociclico e della configurazione strutturale complessiva, inclusa la posizione dell'anello B, che nella maggior parte dei casi è legato all'anello C sul carbonio in posizione 2.

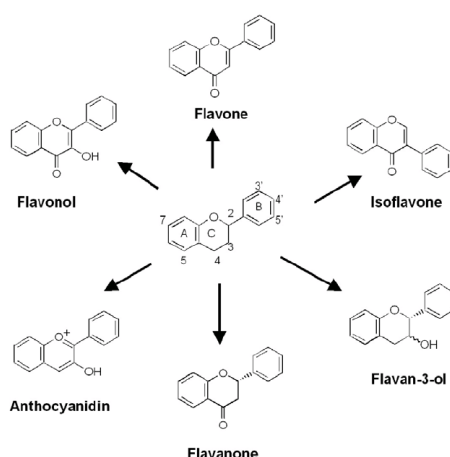


Figura 4: Principali classi di flavonoidi.⁸⁸

Nei tessuti vegetali, i flavonoidi possono essere presenti sia in forma agliconica, ovvero libera, sia in forma coniugata, più frequentemente legata a una o due unità zuccherine. Il processo di glicosilazione ne influenza solubilità, stabilità e biodisponibilità. Dal punto di vista strutturale si distinguono in O-glicosidi e C-glicosidi: nei primi il residuo zuccherino è connesso allo scheletro flavonoidico mediante un legame glicosidico che coinvolge il gruppo ossidrilico (-OH), generalmente localizzato nelle posizioni C3, C5 o C7; nei secondi, invece, il legame è di tipo carbonio-carbonio (C-C) risultando strutturalmente più stabile nell'idrolisi. Gli zuccheri maggiormente coinvolti nella formazione dei glicosidi sono il glucosio, e in percentuale inferiore galattosio, ramnosio, xilosio e arabinosio.¹⁹

All'interno di questa ampia famiglia si individuano diverse sottoclassi di rilievo per l'uva e i suoi derivati enologici, tra cui flavanoli, flavonoli, antocianidine e proantocianidine. Ciascuna di esse presenta peculiarità strutturali e funzionali specifiche, che si riflettono nel contributo alle proprietà sensoriali, alla stabilità cromatica e al potenziale biologico dei derivati dell'uva.

Flavanoli

I flavanoli rientrano nella sottoclasse dei benzopirani e si distinguono per specifiche caratteristiche strutturali: presentano un anello eterociclico saturo tra i carboni C2 e C3, un gruppo ossidrilico in posizione C3 e l'assenza del gruppo carbonilico in C4. Questa configurazione li identifica anche come flavan-3-oli e ne determina le peculiari proprietà chimiche e reattive, in particolare la capacità di partecipare a processi di polimerizzazione e ossidoriduzione.¹⁹

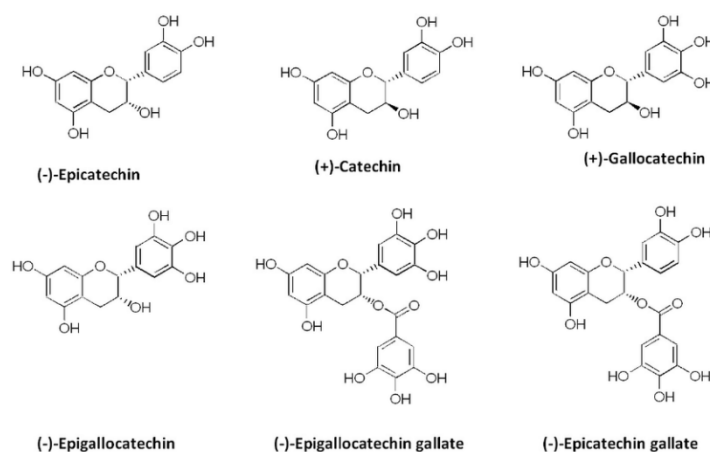


Figura 5: Strutture dei principali flavan-3-oli.⁸⁸

Tra i flavan-3-oli più diffusi in natura troviamo catechina, epicatechina, epigallocatechina e epicatechina gallato (Figura 5).

Nell'acino d'uva tali composti mostrano una distribuzione tissutale differenziata: le concentrazioni più elevate si riscontrano nei semi, dove catechina ed epicatechina rappresentano le forme predominanti. In questa sede, infatti, possono raggiungere valori compresi tra 57,7 e 317,1 mg/Kg con variazioni in base al genotipo e alle condizioni ambientali. Al contrario, l'epicatechina gallato è generalmente presente in quantità ridotte, con concentrazioni comprese tra 0,2 e 4,4 mg/Kg.

I flavanoli sono rilevabili anche nelle bucce, seppur in quantità inferiori rispetto ai semi, con valori compresi tra 3,8 e 11,7 mg/Kg di uva fresca. In questo tessuto il composto maggiormente rappresentato è l'epicatechina, mentre in alcune varietà possono essere presenti anche epigallocatechina e gallocatechina, contribuendo al profilo fenolico complessivo.²²

La presenza e la distribuzione dei flavanoli in diversi compartimenti dell'acino rivestono un'importanza fisiologica e tecnologica significativa, in quanto queste molecole partecipano alla formazione delle proantocianidine, che influenzano parametri sensoriali quali astringenza, struttura e persistenza gustativa nei prodotti enologici.

Flavonoli

I flavonoli, noti anche come 3-idrossiflavoni, sono una sottoclasse di flavonoidi caratterizzata dalla presenza di un doppio legame tra i carboni C2 e C3 dell'anello eterociclico e di un gruppo ossidrilico in posizione C3. Questa configurazione strutturale conferisce specifiche proprietà spettroscopiche e reattive, oltre a influenzare il ruolo biologico nei tessuti vegetali.

Nell'acino d'uva, i flavonoli sono localizzati prevalentemente nelle bucce, dove si accumulano quasi esclusivamente in forma glicosilata: la molecola agliconica è coniugata a uno o più residui zuccherini, condizione che ne aumenta la solubilità e ne facilita lo stoccaggio nel vacuolo cellulare. La liberazione dell'aglicone può avvenire attraverso processi di idrolisi del legame glicosidico, mediati da enzimi specifici, oppure indotti da condizioni acide, come quelle che si instaurano durante le vasi di vinificazione.

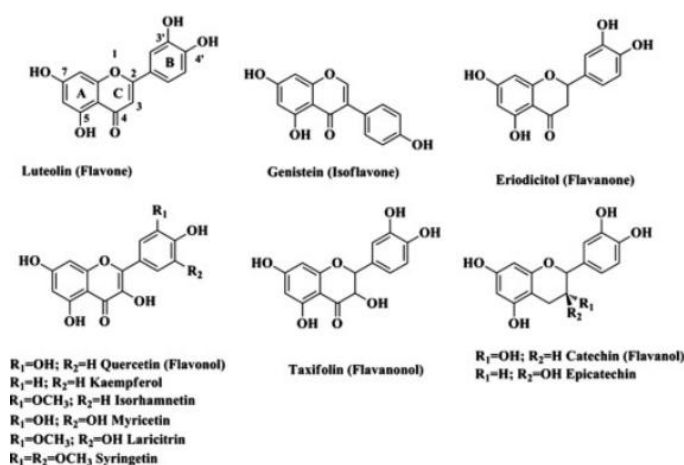


Figura 6: Strutture dei principali flavonoli.¹⁹

Tra gli agliconi identificati nell'uva si annoverano quercetina, kaempferolo, isoramnetina, laricitrina, miricetina, siringetina, tutti presenti principalmente nella forma glicosilata.¹⁹ La composizione qualitativa dei flavonoli varia in funzione del colore della bacca: nelle varietà rosse sono generalmente presenti tutti e sei gli agliconi, ciascuno coniugato con il rispettivo zucchero, mentre nelle cultivar a bacca bianca si riscontrano prevalentemente quercetina, kaempferolo, isoramnetina, mentre miricetina, laricitrina e siringetina risultano assenti.

Tale differenza è attribuibile alla mancata espressione dell'enzima flavonoide 3',5'-idrossilasi nelle varietà bianche: questo enzima è coinvolto nell'introduzione di gruppi ossidrilici sull'anello B della struttura flavonoidica e la sua assenza limita la biosintesi dei flavonoli tri-idrossilati, spiegando così la differente composizione fenolica tra cultivar rosse e bianche.²³

Antociani

Gli antociani sono caratterizzati da una struttura chimica basata sul catione flavillo (2-fenilbenzopirilio), costituito da due anelli aromatici connessi attraverso un anello eterociclico di tipo piranosico, recante una carica positiva localizzata sull'atomo di ossigeno. In ambito naturale, tali molecole si presentano prevalentemente come glicosidi delle rispettive antocianidine: quest'ultime rappresentano le forme agliconiche ottenibili mediante idrolisi del legame glicosidico. Negli organi vegetali freschi, gli agliconi liberi sono rari, mentre predominano le forme glucosilate, talvolta coniugate ad altri zuccheri o ulteriormente modificate tramite acilazione, dando origine ad acilglicosidi.¹⁹

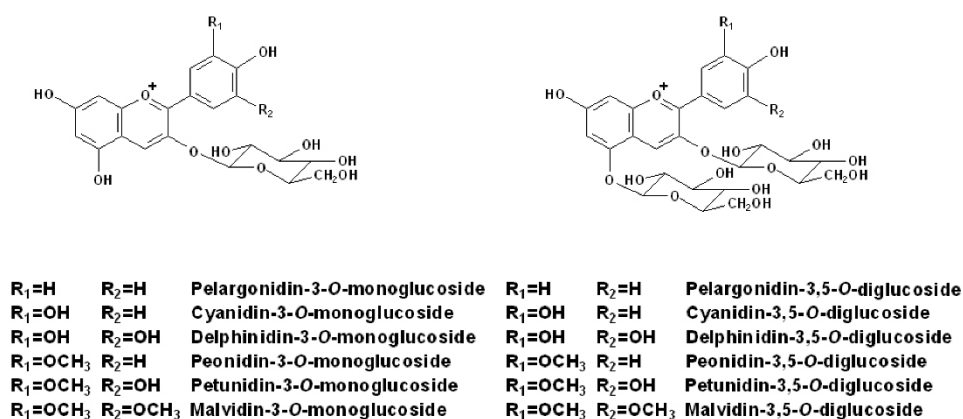


Figura 7: Strutture antocianidine nell'uva.⁸⁹

Gli antociani sono i principali responsabili della colorazione delle cultivar a bacca rossa e dei vini da esse derivati. La variabilità cromatica dipende strettamente dalla loro struttura molecolare: il numero e la posizione dei gruppi ossidrilici e metossilici sull'anello e il grado di glicosilazione e di eventuale acilazione, influenzano la tonalità, l'intensità e la stabilità del pigmento. In particolare, la glicosilazione in posizione C3 è essenziale per la stabilità della molecola, mentre la presenza di un ulteriore zucchero in posizione C5 modula l'intensità cromatica. I derivati 3-O-glucosidici conferiscono una colorazione più intensa rispetto ai corrispondenti 3,5-diglucosidici. Nella specie *Vitis vinifera* sono presenti esclusivamente antociani 3-O-monoglucosidici, a causa di mutazioni che interessano il gene codificante una forma non funzionale dell'enzima 5-O-glucosiltransferasi, impedendo la glicosilazione in posizione C5.

Nelle varietà di uva rossa, e nei rispettivi vini, sono state identificate sei principali antocianidine, ciascuna associata a specifiche sfumature cromatiche: cianidina (rosso-aranciato), peonidina (rosso), delphinidina (rosso-bluastro), pelargonidina (aranciato), petunidina e malvidina (rosso con tonalità bluastre). Tra queste, la malvidina rappresenta la forma quantitativamente più rilevante nelle varietà di *Vitis vinifera*, contribuendo in modo significativo al colore tipico dei vini rossi.²⁴

A differenza di altre classi flavonoidiche, gli antociani sono localizzati quasi esclusivamente nelle bucce dell'acino. Alcune eccezioni vedono una distribuzione dei pigmenti anche nella polpa, come in uva *Garnacha tintorera*: in questi casi composti come la peonidina-3-glucoside risultano abbondanti anche nei tessuti interni del frutto.²⁵

Il profilo antocianico riveste, inoltre, un'importanza applicativa rilevante, in quanto può essere impiegato come criterio di discriminazione varietale, costituendo un valido strumento per la caratterizzazione chemiotassonomica dell'uva.²⁶ Oltre al ruolo tecnologico ed enologico, gli antociani sono oggetto di interesse nutraceutico; analogamente agli altri polifenoli, mostrano proprietà antiossidanti e antinfiammatorie e sono stati associati alla prevenzione di patologie cardiovascolari e neurodegenerative, contribuendo alla protezione dallo stress ossidativo e dai processi infiammatori cronici.²⁷

Proantocianidine

I tannini condensati, noti anche come proantocianidine, rientrano anch'essi nella classe dei flavonoidi, e sono costituiti da oligomeri o polimeri derivanti dall'unione di unità monomeriche di flavan-3-oli, in particolare catechina, epicatechina e epicatechina-3-O-gallato. Le singole subunità sono collegate prevalentemente da legami carbonio-carbonio di tipo C4-C8 e, in maniera minore, tramite legami C4-C6.^{19,28} Questa modalità di condensazione conferisce alle molecole una notevole stabilità strutturale e una marcata resistenza all'idrolisi.

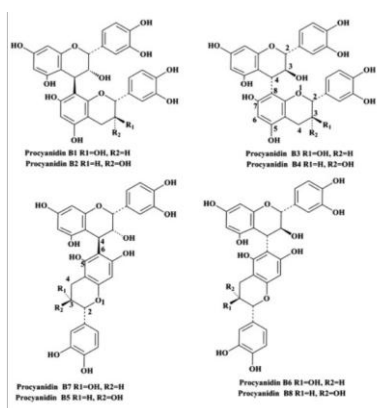


Figura 8: Struttura delle procianidine presenti nell'uva e nel vino.¹⁹

Dal punto di vista della distribuzione tissutale, le proantocianidine si localizzano principalmente nei vinaccioli, e in quantità inferiori, nelle bucce dell'acino. Nei semi si riscontrano strutture mediamente meno complesse, caratterizzate da un grado di polimerizzazione relativamente basso; al contrario, nelle bucce sono presenti forme più polimerizzate e strutturalmente articolate, con molecole che possono raggiungere un grado di polimerizzazione di 31, rispetto al grado 6 individuabile nei semi.

Questa differenza riveste un'importanza tecnologica rilevante in ambito enologico: durante la vinificazione, infatti, l'estrazione delle proantocianidine dipende dal grado di polimerizzazione. Solamente quelle con un grado inferiore a circa 20 risultano sufficientemente solubili ed estraibili dal mosto, contribuendo a caratteristiche sensoriali del vino, quali astringenza e struttura gustativa.²⁹

Per quanto riguarda la polpa, essa è sostanzialmente priva di tannini condensati. Di conseguenza, nei vini bianchi, nei quali il mosto viene separato precocemente da bucce e semi, il contenuto di proantocianidine risulta generalmente basso, con un impatto limitato sulle sensazioni di astringenza, rispetto ai vini rossi ottenuti mediante macerazione delle parti solide dell'acino.

Composti non flavonoidi

I composti fenolici non flavonoidi nell'uva comprendono principalmente due categorie molecolari, gli acidi fenolici e gli stilbeni, molecole che, pur essendo in quantità inferiori, rivestono un ruolo importante dal punto di vista fisiologico e enologico.

Gli acidi fenolici sono composti aromatici derivati dal metabolismo dei fenilpropanoidi e si suddividono in due sottogruppi sulla base della loro struttura carboniosa.

Gli acidi benzoici (C6-C1) possiedono un singolo atomo di carbonio legato al nucleo fenolico, mentre gli acidi idrossicinnamici (C-C3) presentano una catena laterale a tre atomi di carbonio connessa all'anello aromatico.

Tra gli acidi benzoici presenti nell'uva troviamo l'acido gallico come composto quantitativamente più significativo a valori di 2-3 mg/Kg, localizzato prevalentemente nei semi, dove contribuisce anche alla formazione dei tannini idrolizzabili.

Gli acidi idrossicinnamici risultano generalmente più abbondanti con concentrazioni che possono raggiungere circa 150 mg/Kg. Tra i principali troviamo l'acido p-cumarico, l'acido caffeico e l'acido ferulico. Essi sono presenti soprattutto nella polpa e vengono sintetizzati nelle fasi che precedono l'invasatura; nel corso della maturazione la loro concentrazione tende a mantenersi relativamente stabile.

Dal punto di vista enologico, questi composti sono importanti anche per il loro coinvolgimento nelle reazioni di ossidazione che possono influenzare il colore e la stabilità dei mosti e dei vini.

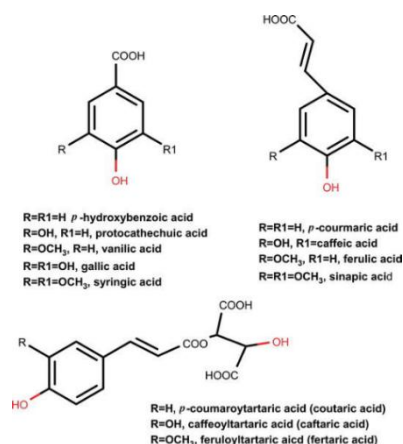


Figura 9: Struttura degli acidi fenolici presenti nell'uva.⁹⁰

Gli stilbeni costituiscono un'altra classe di fenoli non flavonoidi e sono caratterizzati da una struttura formata da due anelli aromatici uniti da un ponte etilenico. Tra essi, il composto più studiato è il resveratrolo, presente principalmente nelle foglie e nelle bucce dell'acino, la cui concentrazione tende a diminuire con l'avanzare della maturazione.

Nella specie *Vitis vinifera* il resveratrolo svolge la funzione di fitoalessina, ovvero molecola di difesa sintetizzata in risposta ad attacchi patogeni, in particolare fungini, o a condizioni di stress abiotico, quali radiazioni ultraviolette ed esposizione a metalli pesanti.

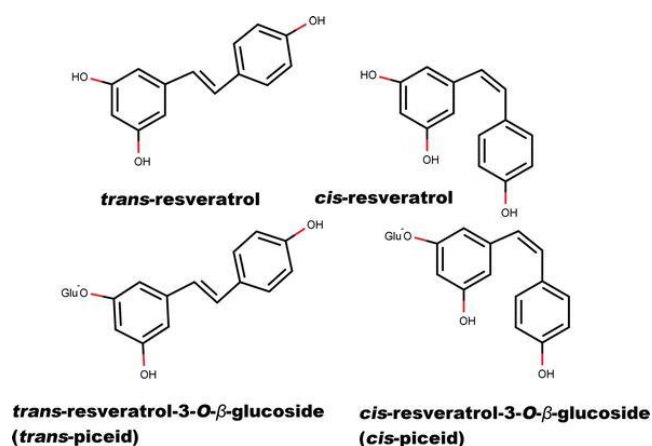


Figura 10: Struttura degli stilbeni presenti nell'uva.⁹⁰

Oltre al ruolo fisiologico nella pianta, il resveratrolo è oggetto di ampio interesse per le sue proprietà biologiche: numerosi studi ne evidenziano l'attività antiossidante e antinfiammatoria, nonché il potenziale effetto modulatore sul metabolismo energetico e sulla sindrome metabolica, contribuendo così al valore nutraceutico dei derivati dell'uva.³⁰

Sostanze aromatiche

I composti aromatici localizzati nella polpa e nella buccia dell'uva rivestono un'importanza determinante nella definizione del profilo sensoriale dell'uva, incidendo sia sull'aroma percepibile nel frutto fresco, sia sul potenziale aromatico che si manifesterà durante i processi di trasformazione enologica. Tali molecole sono responsabili del cosiddetto aroma primario varietale e rappresentano un patrimonio chimico che può essere ulteriormente modulato nel corso della vinificazione.

Dal punto di vista strutturale, queste sostanze si presentano sia in forma libera, volatile e percepibile a livello olfattivo, sia in forma legata a precursori non volatili, generalmente sotto forma di glicosidi. In quest'ultimo caso risultano inizialmente inattive dal punto di vista sensoriale: la liberazione dell'aroma avviene in seguito alla rottura dei tessuti dell'acino, durante la pigiatura o la macerazione, attraverso l'azione di enzimi endogeni della pianta o di enzimi microbici prodotti dai lieviti durante la fermentazione.³¹ Inoltre una quota di composti aromatici può essere rilasciata anche nella cavità orale grazie all'attività di enzimi batterici e salivari che idrolizzano i legami glicosidici contribuendo alla percezione retronasale del vino.

Tra le classi di molecole volatili più caratteristiche dell'uva figurano i monoterpeni, composti appartenenti alla famiglia dei terpenoidi e derivanti dalla via biosintetica degli isoprenoidi.

Essi sono particolarmente abbondanti nelle varietà aromatiche e rappresentano i principali responsabili delle note floreali e agrumate tipiche di alcuni vitigni, tra cui il Moscato bianco. Tra i monoterpeni maggiormente presenti troviamo il geraniolo, frequentemente a concentrazioni rilevanti, insieme ad altri composti come citronellolo, nerolo, linalolo e α -terpineolo, ciascuno caratterizzato da specifiche soglie di percezione olfattiva e contributi aromatici distinti.

Sulla base della concentrazione dei monoterpeni, i vitigni possono essere classificati in tre categorie principali:

- Varietà moscate, con contenuti generalmente compresi tra 4 e 6 mg/L;
- Varietà non moscate ma aromaticamente espressive, con concentrazioni superiori a 1 mg/L;
- Varietà non aromatiche, nelle quali il contenuto complessivo di monoterpeni è inferiore a 1 mg/L.

Questa classificazione riflette differenze genetiche e metaboliche che influenzano, in modo sostanziale, l'identità sensoriale dei vini ottenuti.^{32, 33}

Minerali

Un apporto minerale adeguato e bilanciato rappresenta un presupposto fondamentale per il corretto sviluppo fisiologico della vite, poiché incide direttamente sull'equilibrio vegeto-produttivo della pianta. Una nutrizione minerale ottimale consente infatti di evitare sia condizioni di eccessivo vigore vegetativo, sia il rischio di compromettere le qualità dell'uva.

Dal punto di vista quantitativo, i minerali costituiscono circa lo 0,2-0,6% del peso fresco dell'acino, ma nonostante la loro presenza relativamente modesta, svolgono funzioni essenziali nei processi biochimici e fisiologici della pianta, inclusi regolazione osmotica, attività enzimatica e mantenimento dell'equilibrio ionico. Tra gli elementi maggiormente rappresentati nel succo d'uva si annoverano potassio, sodio, ferro, fosfati e cloruri.

Il potassio è il catione predominante e rappresenta approssimativamente il 50-70% del totale dei cationi presenti nel mosto. Questo elemento svolge un ruolo cruciale nella regolazione dell'equilibrio acido-base e nel controllo del potenziale osmotico cellulare. Durante la maturazione dell'acino si osserva un progressivo incremento dell'accumulo di potassio, che può favorire la formazione di bitartrato di potassio attraverso la salificazione con l'acido tartarico. Tale processo determina una riduzione dell'acidità titolabile e un conseguente aumento del pH del succo.⁸

Un innalzamento eccessivo del pH rappresenta un fattore critico in ambito enologico, poiché può compromettere la stabilità microbiologica e chimica del vino, favorire fenomeni ossidativi e alterare l'equilibrio sensoriale complessivo. Pertanto, la gestione della nutrizione minerale, in particolare del potassio, assume un'importanza strategica per il mantenimento della qualità e della stabilità del prodotto finale.

1.2 PARAMETRI CHE POTREBBERO INFLUENZARE LA CRESCITA E LA COMPOSIZIONE DELL'UVA

La conoscenza approfondita dei parametri che indicano sulla qualità dell'uva rappresenta un presupposto imprescindibile per l'ottenimento di prodotti enologici di livello elevato. La vite è infatti il risultato di un sistema complesso in cui interagiscono fattori genetici, ambientali e agronomici, ciascuno dei quali contribuisce, con modalità e intensità differenti, alla definizione delle caratteristiche chimiche e sensoriali dell'acino.

Tra i fattori genetici rientrano le peculiarità delle diverse cultivar, che determinano differenze sostanziali nella composizione in zuccheri, acidi organici, composti fenolici e sostanze aromatiche, influenzando in modo diretto il potenziale enologico dell'uva.³⁴ Le caratteristiche varietali condizionano inoltre aspetti fisiologici quali vigoria, epoca di maturazione e risposta agli stress ambientali, contribuendo a delineare l'identità produttiva di ciascun vitigno.

I fattori ambientali comprendono invece condizioni pedoclimatiche in cui la vite è coltivata, tra cui la natura del suolo, il regime termico, l'intensità e la qualità della radiazione luminosa, nonché la disponibilità idrica. Tali variabili modulano i processi metabolici della pianta e incidono sull'accumulo dei principali metaboliti responsabili della qualità tecnologica e sensoriale dell'uva. Ad essi si affiancano i fattori agronomici, ovvero l'insieme delle pratiche colturali adottate dal viticoltore, come la gestione della chioma, il controllo della resa produttiva, l'irrigazione e le strategie di fertilizzazione, operazioni in grado di orientare l'equilibrio vegeto-produttivo della pianta e la composizione finale dell'acino.

Per descrivere l'insieme di queste interazioni, è stato introdotto il concetto di “terroir”, termine la cui accettazione si è progressivamente ampliata nel tempo. Secondo la definizione attualmente proposta dall'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), il terroir rappresenta il risultato della complessa interazione tra suolo, clima, morfologia del territorio, biodiversità e pratiche agricole ed enologiche, elementi che concorrono congiuntamente a conferire tipicità e unicità ai prodotti vitivinicoli di una determinata area.

Considerato che il presente elaborato si propone di approfondire uno specifico aspetto di questo sistema complesso, nel seguente capitolo verrà posta particolare attenzione ad uno di questi parametri nello specifico, ovvero il ruolo del suolo nella viticoltura, esaminandone le caratteristiche e l'impatto sulla fisiologia della vite e sulla composizione chimica dell'acino.

Il suolo

Vitis vinifera è una specie caratterizzata da un'elevata plasticità enologica, capace di adattarsi ad un ampio spettro di condizioni pedologiche. La notevole variabilità geomorfologica dell'Italia si traduce in una marcata eterogeneità dei suoli vitati, che comprendono substrati calcarei, argillosi, vulcanici, sabbiosi e ciottolosi.⁴ Ciascuna tipologia contribuisce in maniera specifica all'espressione vegeto-produttiva della vite, influenzando lo sviluppo radicale, la disponibilità idrica e minerale e, di conseguenza, l'identità qualitativa dell'uva.

Tra le proprietà fisiche del suolo, la tessitura rappresenta uno dei parametri più rilevanti. Essa dipende dalla dimensione relativa delle particelle minerali (sabbia, limo, argilla) e dalla loro organizzazione strutturale, determinando caratteristiche fondamentali, quali porosità, aerazione, capacità di ritenzione idrica e disponibilità di nutrienti. Suoli a tessitura equilibrata favoriscono un adeguato sviluppo dell'apparato radicale e un'efficiente regolazione degli scambi gassosi e idrici. Anche la temperatura del suolo riveste un ruolo significativo: nei contesti climatici caldi, terreni relativamente più freschi possono rallentare i processi di maturazione, incidendo sull'accumulo zuccherino e sulla sintesi dei composti aromatici. La temperatura è a sua volta influenzata dal colore del suolo, in quanto superfici più chiare riflettono una quota maggiore di radiazione solare, mentre quelle scure tendono ad assorbirla, determinando un maggior riscaldamento.³⁵

La fertilità chimica del terreno è strettamente correlata alla disponibilità di macro e microelementi essenziali. Tra i microelementi di particolare importanza per la vite si annoverano rame, ferro, manganese e zinco, generalmente presenti in quantità variabili nel suolo e coinvolti in numerosi processi enzimatici. I macroelementi, come potassio e magnesio, possono invece risultare limitanti in alcune condizioni pedologiche e richiedere integrazioni mirate tramite pratiche di fertilizzazione.³⁶

L'azoto rappresenta uno dei nutrienti più critici per l'equilibrio vegetativo della pianta. Un eccesso di disponibilità azotata può indurre una crescita vegetativa eccessiva, con conseguente ombreggiamento della chioma, diluizione dei metaboliti nell'acino e riduzione potenziale della qualità enologica, oltre a determinare effetti ambientali negativi legati alle emissioni di gas serra e alla lisciviazione dei nitrati. D'altra parte, una carenza di azoto limita la crescita e può influenzare negativamente la composizione del mosto, compromettendo anche il regolare svolgimento della fermentazione alcolica a causa di un'insufficiente disponibilità di azoto assimilabile dai lieviti.³⁵

Il suolo svolge inoltre un ruolo centrale nella regolazione della disponibilità idrica, fattore determinante per la qualità dell'acino.

L'acqua effettivamente disponibile per l'assorbimento radicale dipende dalla tessitura e dalla struttura del terreno: i suoli a grana fine presentano una maggior capacità di ritenzione idrica rispetto a quelli a grana grossolana. Tuttavia, nei terreni argillosi l'acqua può essere trattenuta con forze matriciali elevate e accumularsi in profondità, riducendone la frazione effettivamente accessibile alle radici.³⁷

Un ulteriore parametro di rilievo è la conducibilità idraulica, parametro che descrive la facilità con cui l'acqua si muove attraverso il profilo del suolo. Nel terreno grossolano, tale parametro è generalmente più elevato, favorendo un rapido drenaggio, ma può diminuire drasticamente in condizioni di siccità. Nei suoli fini, al contrario, la conducibilità è inferiore ma più stabile nel tempo. Di conseguenza, in ambienti aridi la gestione agronomica tende a privilegiare pratiche volte a incrementare la capacità di ritenzione idrica, mentre in contesti umidi l'obiettivo principale consiste nel prevenire ristagni eccessivi, migliorando il drenaggio e l'aerazione del suolo per garantire condizioni ottimali allo sviluppo radicale e alla qualità dell'uva.³⁵

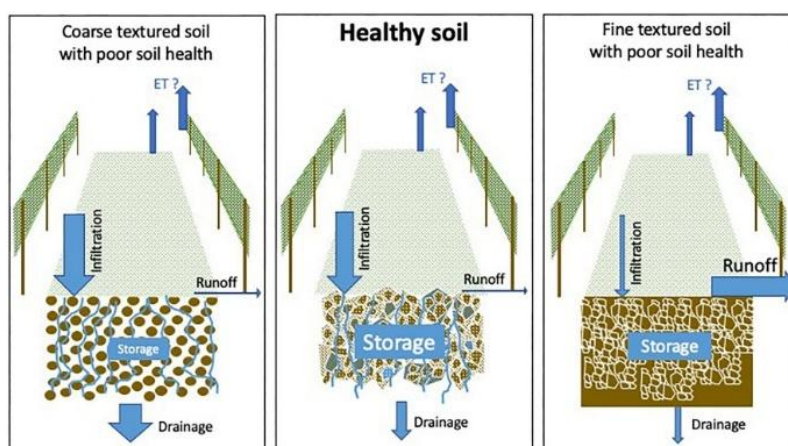


Figura 11: Confronto nel flusso d'acqua in vari tipi di suolo: a sinistra a tessitura grossolana e in cattive condizioni, al centro sano e ben strutturato, a destra a tessitura fine e in cattive condizioni.³⁸

Tecniche di lavorazione del terreno

Nel corso della storia, le tecniche di lavorazione del terreno hanno conosciuto un'evoluzione significativa: se in passato l'attività agricola si fondava su pratiche a ridotto impatto, predisposte al rispetto degli equilibri naturali e dei cicli biologici, con l'avvento dell'agricoltura intensiva si è assistito ad una profonda trasformazione dei sistemi colturali. Questo cambiamento è stato causato principalmente dalla necessità di far fronte alla crescente domanda alimentare e alla progressiva meccanizzazione del settore: infatti, l'impiego dei macchinari, la lavorazione frequente e profonda del terreno e l'uso diffuso di input chimici sono stati progressivamente associati a fenomeni di degradazione fisica, chimica e biologica del suolo.^{39, 40}

Agricoltura intensiva e *tillage*

Una delle pratiche più emblematiche dell'agricoltura intensiva è il *tillage*, termine che indica l'insieme delle operazioni meccaniche effettuate sul terreno prima e/o dopo la semina. L'obiettivo principale è creare condizioni favorevoli allo sviluppo delle colture, intervenendo sulla struttura del suolo per migliorarne l'aerazione e l'infiltrazione dell'acqua, oltre a consentire il controllo delle infestanti e la gestione dei residui colturali.⁴¹

La lavorazione del suolo si articola in due fasi distinte, la lavorazione primaria e la lavorazione secondaria.

La lavorazione primaria ha lo scopo di rompere e decompattare il terreno, operando a profondità variabili, generalmente comprese tra 10 e 90 cm. Viene eseguita mediante attrezzature pesanti, tra cui gli aratri: l'aratro a versorio rappresenta lo strumento più diffuso e versatile, adatto alla maggior parte delle tipologie di suolo. Per i terreni particolarmente compatti si può ricorrere all'aratro a scalpello, mentre per gli interventi più profondi si utilizza l'aratro da sottosuolo o il ripuntatore.

La lavorazione secondaria, invece, è finalizzata alla preparazione del letto di semina. Essa mira a sminuzzare ulteriormente le zolle, livellare la superficie, conservare l'umidità e contenere la crescita delle infestanti. Tra le attrezzature più impiegate rientrano i coltivatori, utilizzati per rompere le croste superficiali, e gli erpici, che frammentano e affinano il terreno. In alcuni casi si ricorre anche alla pacciamatura, pratica che prevede la copertura del suolo con materiale organico al fine di proteggerlo dagli agenti atmosferici e limitare lo sviluppo delle erbe infestanti.

Danni ambientali dovuti al *tillage*

L'agricoltura intensiva si è sviluppata in un contesto storico caratterizzato dalla percezione di una disponibilità pressoché illimitata di suolo agricolo; di conseguenza, le possibili ripercussioni a lungo termine dello sfruttamento intensivo non sono state inizialmente considerate. Tuttavia, l'utilizzo continuativo e poco sostenibile del terreno è stato progressivamente associato a fenomeni di degradazione, quali la riduzione della sostanza organica, l'erosione e il deterioramento della struttura del suolo, con effetti particolarmente marcati nelle regioni a clima caldo e piovoso.⁴²

Tra le problematiche più rilevanti rientra la compattazione del suolo, causata principalmente dal passaggio ripetuto di macchinari agricoli pesanti che esercitano pressioni elevate sulla superficie, determinando una deformazione degli strati superficiali e subsuperficiali. In ambito viticolo, tale fenomeno assume particolare importanza, in quanto condiziona lo sviluppo dell'apparato radicale della vite.

È stato infatti osservato che la compattazione comporta una riduzione della densità delle radici superficiali e una loro migrazione verso gli strati più profondi, spesso caratterizzati da minore disponibilità di nutrienti e ossigeno.⁴³ Questa redistribuzione radicale può tradursi in una diminuzione dell'efficienza di assorbimento degli elementi nutritivi, con potenziali ripercussioni sulla crescita della pianta e sulla qualità delle produzioni.

È stato inoltre documentato come la lavorazione intensiva del terreno possa esercitare un impatto negativo sulla componente biologica del suolo, alterando la biodiversità microbica e riducendo l'attività degli organismi edafici coinvolti nei processi di decomposizione della sostanza organica e nel riciclo di nutrienti. La perturbazione meccanica frequente compromette gli habitat microbici e può determinare una diminuzione della funzionalità biologica complessiva del suolo.⁴⁵

Un ulteriore aspetto critico è rappresentato dal fenomeno dell'erosione, processo attraverso il quale lo strato superficiale del terreno viene rimosso e trasportato altrove per effetto di agenti naturali, quali pioggia e vento, oppure a seguito di lavorazioni meccaniche ripetute. Lo strato asportato corrisponde generalmente alla porzione più fertile del suolo, ricca di sostanza organica, nutrienti e apparati radicali, e svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento della struttura e della stabilità del terreno.

A differenza dell'erosione idrica, legata prevalentemente a fattori naturali, l'erosione indotta dalle lavorazioni agricole è strettamente connessa all'uso ripetuto di macchinari e risulta quindi gestibile, in parte, attraverso pratiche agronomiche sostenibili. Tuttavia, essa viene spesso sottovalutata, poiché i suoi effetti diventano evidenti solamente quando il degrado è in fase avanzata.⁴⁶

Nel caso dei vigneti collinari, l'erosione meccanica costituisce un rischio particolarmente rilevante. La morfologia del terreno e la limitata larghezza delle interfile obbligano frequentemente a transitare con i mezzi agricoli sugli stessi percorsi, favorendo la progressiva asportazione di suolo. Inoltre, la pendenza accentua il deflusso superficiale delle acque meteoriche, incrementando la velocità di ruscellamento e aggravando ulteriormente i fenomeni erosivi.



Figura 12: Erosione del suolo in vigneti ad uno stadio di sviluppo diverso.⁴⁷

Alla fine degli anni Sessanta, negli Stati Uniti, la progressiva riduzione delle superfici coltivabili, unita a un rapido incremento dei prezzi dei prodotti agricoli, mise in luce i limiti del modello produttivo intensivo, evidenziandone la scarsa sostenibilità nel lungo periodo. Da questa considerazione, sono emersi nuovi orientamenti agronomici, volti alla conservazione del suolo e alla promozione di pratiche più sostenibili, capaci di coniugare produttività e tutela delle risorse naturali.⁴²

Agricoltura conservativa

L'agricoltura conservativa è definita come un sistema di gestione sostenibile, finalizzato a coniugare le esigenze produttive delle colture con la tutela delle risorse naturali, in particolare del suolo e dell'acqua.⁴⁸ Tuttavia, in letteratura il termine viene ancora oggi utilizzato in modo non univoco, generando ambiguità interpretative e rendendo complesso il confronto tra i risultati sperimentali.

Vengono comunemente ricondotte all'agricoltura conservativa diverse pratiche, tra cui:

- *No tillage*, che prevede l'assenza totale di lavorazioni meccaniche del terreno, il quale rimane coperto da residui colturali o da vegetazione erbacea permanente;
- *Minimum tillage*, contempla lavorazioni superficiali e mirate, volte a ridurre al minimo il disturbo della struttura del terreno;
- *Mulch tillage*, tecnica in cui il suolo viene mantenuto coperto da residui colturali distribuiti in superficie, con funzione protettiva verso gli agenti climatici e di conservazione dell'umidità;
- *Reduced tillage*, espressione più ampia e generica, che include le pratiche meno invasive rispetto alla lavorazione tradizionale.⁴⁹

L'agricoltura conservativa, inoltre, si fonda su tre principi cardine, ovvero la riduzione delle lavorazioni, la copertura permanente del suolo e la diversificazione colturale.

Il primo principio prevede la limitazione degli interventi meccanici al fine di preservare la struttura del suolo, mantenere il contenuto di sostanza organica, salvaguardare la fertilità e contrastare i fenomeni di erosione e perdita idrica. La riduzione del disturbo meccanico favorisce anche la conservazione della biodiversità microbica e dell'attività biologica del suolo.⁴⁵ Rispetto ai sistemi convenzionali, tali pratiche possono contribuire a mantenere la produttività nel lungo periodo, riducendo al contempo i costi energetici e operativi.

Il secondo principio consiste nel mantenimento di una copertura continua del terreno mediante residui colturali o colture di copertura. Lo strato superficiale, costituito da materiale organico ovvero foglie, paglia, sfalci erbacei, residui di coltivazione, oppure da materiale inorganico, come ghiaia, svolge una funzione protettiva contro l'erosione, limita l'evaporazione dell'acqua, attenua gli sbalzi termici e riduce la compattazione superficiale del terreno. Inoltre, la presenza di biomassa favorisce l'apporto e il sequestro di carbonio nel suolo, contribuendo alla mitigazione dei cambiamenti climatici.⁴⁸



Figura 13: Copertura vegetale coltivata a vite in Angiò, nella Valle della Loira.⁵⁰

Il terzo principio dell'agricoltura conservativa è rappresentato dalla rotazione colturale, pratica fondamentale per mantenere l'equilibrio biologico del suolo e prevenire l'accumulo di infestanti e patogeni tipicamente associati ai sistemi in monocoltura. Oltre a svolgere la funzione di controllo naturale, la rotazione contribuisce al miglioramento della struttura del suolo, favorisce l'infiltrazione dell'acqua, incrementa la copertura superficiale e riduce i fenomeni di compattazione.⁴⁸

Nelle coltivazioni perenni, come la vite, il cui ciclo produttivo può estendersi per 30-40 anni, la rotazione tradizionale non è applicabile. In questi contesti, il principio viene declinato in forme alternative, ad esempio attraverso la gestione differenziata delle interfile, alternando aree inerbite e lavorate al fine di incrementare la biodiversità e migliorare la funzionalità del suolo. Inoltre, in seguito all'espanto di un vecchio vigneto, è pratica comune lasciare il terreno a riposo per un determinato periodo, così da prevenire fenomeni di "stanchezza del suolo" e favorirne la rigenerazione biologica e strutturale.

Nonostante i numerosi vantaggi agronomici e ambientali associati al *no-tillage*, la sua diffusione ha evidenziato alcune criticità. Tra le principali si annoverano la possibile compattazione superficiale, la complessa gestione delle infestanti e una risposta produttiva non sempre superiore rispetto ai sistemi convenzionali. In diversi casi, infatti, non è stato osservato un incremento significativo della resa, se non in condizioni specifiche, come in ambienti aridi o soggetti a limitata disponibilità idrica.⁵⁰

Un aspetto paradossale riguarda la compattazione: l'assenza di lavorazioni può favorire la formazione di croste superficiali che ostacolano la penetrazione dell'acqua e limitano lo sviluppo radicale, soprattutto in suoli predisposti a tale fenomeno.

Anche la gestione delle infestanti risulta essere problematica: l'impiego ripetuto di erbicidi, in particolare formulati a base di glifosato, ha favorito nel tempo la selezione di specie resistenti, riducendo l'efficacia del controllo chimico.

Tra le possibili soluzioni si è proposta l'introduzione di colture di copertura, in grado di agire come barriera fisica o di esercitare effetti allelopatici nei confronti delle specie indesiderate. Tuttavia, la scelta delle specie idonee deve essere attentamente valutata in relazione al contesto pedoclimatico e paesaggistico.⁵¹

Alla luce di tali criticità, si è diffuso l'approccio della cosiddetta lavorazione strategica o occasionale, l'*occasional tillage*, che prevede interventi meccanici saltuari all'interno di un sistema prevalentemente orientato al *no-tillage*. Se applicata in modo mirato e non sistematico, questa pratica può contribuire al miglioramento delle condizioni fisiche del suolo senza comprometterne significativamente la fertilità. Le evidenze disponibili indicano che, se correttamente gestita, essa non determina riduzioni rilevanti del contenuto di carbonio e azoto, né dell'umidità o della stabilità strutturale, e non influisce negativamente sulla resa produttiva.⁵² È importante sottolineare che non si tratta di un ritorno alla lavorazione intensiva tradizionale, bensì di uno strumento da utilizzare con cautela, in modo da ottimizzare i benefici minimizzando i potenziali effetti negativi.

Tecniche innovative per una viticoltura sostenibile

Secondo le proiezioni dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), l'incremento demografico globale determinerà un aumento della domanda alimentare pari a circa il 70% entro il 2050. Tale scenario si inserisce in un contesto critico, caratterizzato dalla progressiva degradazione del suolo, riduzione della fertilità, cambiamenti climatici e crescente frequenza di eventi meteorologici estremi.⁵³

In ambito viticolo, le regioni mediterranee sono considerate tra le più vulnerabili: si prevede un aumento dei periodi di siccità prolungata, associati a temperature elevate e precipitazioni ridotte. Queste condizioni potrebbero incidere in modo significativo sulla qualità dell'uva e del vino, determinando nel lungo periodo una ridefinizione delle aree vocate alla viticoltura⁵⁴: ciò porta inevitabilmente all'adozione di strategie agronomiche per preservare l'equilibrio ambientale e la sostenibilità delle risorse naturali.

Per lungo tempo, il concetto di fertilità del suolo è stato limitato all'analisi delle sue proprietà chimiche e fisiche. Tuttavia questo approccio è risultato parziale, in quanto non considera il suolo come un ecosistema complesso e dinamico, in cui le componenti biologiche svolgono un ruolo cruciale.

In questo contesto assume particolare rilevanza la rizosfera, ovvero la porzione di suolo immediatamente circostante le radici, caratterizzata da una intensa attività biologica. Essa ospita una ricca comunità di microrganismi la cui composizione e attività sono influenzate dalle rizodeposizioni, costituite da amminoacidi, zuccheri, acidi organici e frammenti cellulari rilasciati dall'apparato radicale.⁵⁵

Rispetto al suolo non influenzato direttamente dalle radici (suolo *bulk*), la rizosfera presenta proprietà fisiche, chimiche e biologiche peculiari, che favoriscono lo sviluppo di una comunità microbica, detta rizomicrobioma. Le caratteristiche di tale microambiente possono essere considerate indicatori dello stato di salute della pianta e della qualità biologica del suolo.

La composizione del rizomicrobioma è determinata da molteplici fattori, tra cui la tipologia di suolo, le condizioni pedoclimatiche e il genotipo della pianta, che modula il profilo delle escrezioni radicali. Nel caso della vite, sia la cultivar, sia il portainnesto influenzano in modo significativo la struttura e la funzionalità della comunità microbica associata alle radici.⁵⁶

Negli ultimi anni si è diffuso un approccio innovativo, definito “ingegnerizzazione della rizosfera”, volto a modulare la microbiologia del suolo mediante l'inoculo di microrganismi benefici, quali batteri e funghi selezionati. In tale prospettiva, rivestono un ruolo centrale i funghi micorrizici arbuscolari (AMF), capaci di instaurare simbiosi mutualistiche con le radici, migliorando l'assorbimento di nutrienti e la tolleranza agli stress, e le comunità sintetiche o *Synthetic Communities*, (SynCom), ossia consorzi microbici progettati per ottimizzare specifiche funzioni enologiche e agronomiche.

Trattamento AMF

Le micorrize sono associazioni simbiotiche mutualistiche che si instaurano tra le radici delle piante vascolari e i funghi del suolo, rappresentando una delle interazioni più diffuse e antiche del regno vegetale. Studi condotti su oltre 3600 specie vegetali hanno evidenziato come l'80% sia in grado di formare simbiosi micorriziche, considerate determinanti per la colonizzazione delle terre emerse da parte delle piante.⁵⁷

Tra le diverse tipologie, un ruolo predominante è svolto dai funghi micorrizici arbuscolari (AMF), appartenenti al phylum *Glomeromycota*. Tra i generi maggiormente rappresentati figurano *Glomus*, *Rhizophagus*, *Funneliformis* e *Septoglomus*, ampiamente diffusi nei suoli agricoli.⁵⁸

Per comprendere il meccanismo d'azione degli AMF è necessario considerare il loro ciclo vitale. Questi funghi alternano una fase asimbiotica che ha inizio con la germinazione delle spore stesse. Tale processo è stimolato dagli essudati radicali della pianta ospite, tra cui gli strigolattoni, molecole segnale che inducono la ramificazione delle ife e ne favoriscono l'orientamento verso la radice. In assenza di una pianta ospite, la crescita fungina si arresta generalmente entro 30 giorni.

Quando avviene il riconoscimento molecolare tra fungo e radice, l'AMF sviluppa strutture specializzate denominate appressori, che consentono la penetrazione nell'epidermide radicale. Successivamente, il fungo colonizza i tessuti corticali, formando un micelio intraradicale costituito da ife, vescicole di riserva e arbuscoli, strutture altamente ramificate deputate allo scambio bidirezionale di nutrienti tra i due simbionti.⁵⁹

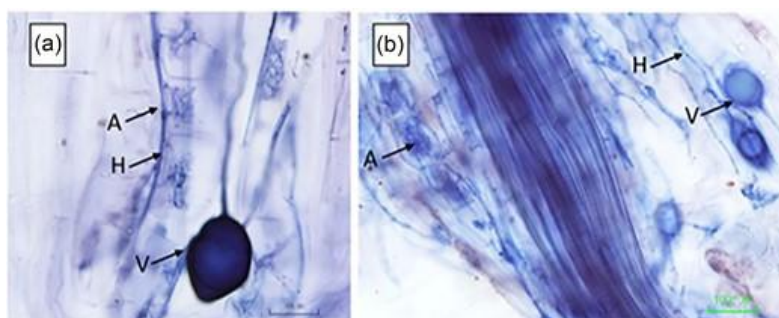


Figura 14: Radici di vite colorate con Tripian blue evidenziano la colonizzazione da funghi micorrizici arbuscolari (AMF). a) Da coltura su pianta ospite in condizioni controllate (“coltura a trappola”). b) Da campo. A: arbuscoli, H: ife, V: vescicola.⁶⁰

La relazione tra AMF e pianta è di tipo mutualistico: entrambi i partner traggono beneficio dall'associazione. I funghi micorrizici arbuscolari sono biotrofi obbligati, ovvero dipendono completamente dalla pianta per la sopravvivenza, ottenendo fotoassimilati sotto forma di zuccheri e lipidi. In cambio, forniscono nutrienti minerali e contribuiscono alla protezione della pianta da stress biotici e abiotici. Inoltre, le ife extraradicali possono connettere più piante tra loro, formando reti miceliali comuni che favoriscono la persistenza del fungo nel suolo.

Dal punto di vista agronomico, i benefici per la pianta sono rilevanti. Le ife fungine ampliano il volume di suolo esplorabile rispetto al solo apparato radicale, aumentando l'efficienza di assorbimento dei nutrienti.

È stato stimato che, in presenza di micorrizzazione, le piante possano ricevere oltre il 50% dell'azoto e più del 90% del fosforo acquisito, oltre a potassio, magnesio, zinco e acqua.^{39, 61} Questo miglioramento dello stato nutrizionale si traduce spesso in una maggior crescita vegetativa e, in alcuni casi, in un incremento dell'efficienza fotosintetica.

L'associazione micorrizica conferisce una maggior tolleranza agli stress abiotici come siccità e salinità del suolo. Quest'ultimo fattore, sebbene meno frequentemente discusso, può compromettere significativamente la crescita vegetale e lo sviluppo radicale.⁶² Tali aspetti risultano particolarmente rilevanti nei contesti mediterranei, dove i cambiamenti climatici stanno determinando condizioni più aride e periodi prolungati di scarsità idrica.^{54, 63}

Le micorrize contribuiscono anche alla difesa contro patogeni ed erbivori. Le piante in associazione con micorrize possono attivare più rapidamente risposte immunitarie e rilasciare composti volatili in grado di attirare antagonisti naturali degli insetti fitofagi. Inoltre, la connessione tra piante tramite reti miceliali comuni può facilitare la trasmissione di segnali di allarme in caso di attacco.

Un ulteriore aspetto cruciale riguarda l'influenza delle micorrize sulla comunità microbica della rizosfera: oltre alla simbiosi diretta con la pianta, gli AMF favoriscono l'arricchimento e la diversificazione del microbiota circostante, contribuendo alla stabilità e alla funzionalità dell'ecosistema suolo. Ciò rende tuttavia complesso distinguere tra gli effetti benefici direttamente attribuibili alle micorrize e quelli mediati indirettamente dalla modulazione del microbioma.⁵⁶

È importante sottolineare che l'interazione tra pianta e AMF non è sempre strettamente mutualistica. In condizioni di elevata disponibilità di nutrienti, in particolare fosforo e azoto, i benefici per la pianta possono ridursi. In tali situazioni, il fungo continua a richiedere carbonio all'ospite, senza fornire un vantaggio proporzionale, e la relazione può assumere caratteri prossimi al parassitismo, soprattutto quanto la pianta si trova in condizioni di stress fisiologico e non è in grado di sostenere il costo metabolico della simbiosi.⁶⁴

Applicazione e gestione degli inoculi di AMF in viticoltura

L'impiego degli AMF in viticoltura è documentato a partire dagli anni Novanta, sebbene i risultati ottenuti siano spesso variabili in base alle condizioni pedoclimatiche, alla tipologia del suolo e alle modalità di applicazione dell'inoculo. Gli inoculi di AMF sono costituiti da spore, frammenti di micelio o porzioni di radici già colonizzate, prodotti e assemblati in condizioni controllate, con l'obiettivo di incrementare la presenza e l'attività dei funghi micorrizici nel suolo agrario.

Le tecniche di applicazione possono differire in base alle esigenze agronomiche, alle caratteristiche del terreno e ai costi operativi. Nelle aziende vitivinicole italiane è frequente la distribuzione dell'inoculo direttamente nel foro di impianto, in prossimità dell'apparato radicale, in modo da favorire un rapido contatto tra fungo e radice. In altri contesti, a livello internazionale, è comune l'inoculazione in vivaio, mediante immersione delle radici in una sospensione contenente propaguli di AMF. Questa strategia consente di avviare precocemente la colonizzazione micorrizica, aumentando le probabilità di successo dopo il trapianto in campo.⁵⁸

Il successo dell'inoculazione dipende dalla corretta gestione del suolo. È fondamentale limitare le lavorazioni meccaniche intensive, che possono danneggiare la rete miceliale e alterare la biodiversità del microbiota. Analogamente, si raccomanda di ridurre l'impiego di fertilizzanti ad alto impatto e di evitare pratiche invasive come la fumigazione del terreno, oggi quasi completamente abbandonata.⁶⁵ Anche il *tillage* esercita un effetto negativo sugli AMF, poiché determina la frammentazione delle ife e la distruzione della rete micellare, con conseguente riduzione della biodiversità fungina.⁴⁵

Un ulteriore fattore determinante è rappresentato dal pH del suolo. I funghi micorrizici arbuscolari risultano generalmente sensibili a condizioni acide e mostrano una ridotta attività in terreni con pH inferiore a 5,5. Allo stesso tempo, anche valori eccessivamente alcalini possono limitarne lo sviluppo, sebbene non vi sia un consenso univoco in letteratura riguardo a una soglia superiore definita.⁶⁵

Trattamento SynCom

Il termine *SynCom* indica comunità microbiche sintetiche assemblate artificialmente in laboratorio, costituite da ceppi selezionati, ad esempio appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Bacillus* o altri microrganismi benefici, con l'obiettivo di ottenere consorzi controllati, riproducibili e funzionalmente definiti.

La prima fase di questo approccio consiste nella selezione di ceppi microbici idonei a promuovere il corretto sviluppo della pianta. Tali ceppi devono non solo essere funzionali, ma anche diversificati e complementari, in modo da costituire comunità in cui i microrganismi svolgano ruoli differenti ma sinergici. A questo scopo vengono adottati due principali approcci metodologici: *top-down* e *bottom-up*.

Nel primo caso si parte da una comunità microbica naturale associata alle radici della pianta. Attraverso analisi microbiologiche e molecolari, si identificano i membri più abbondanti e funzionalmente rilevanti, per poi ricostruire in laboratorio una versione semplificata e controllata della comunità originaria.

Nel secondo approccio, invece, si selezionano microrganismi sulla base di caratteristiche specifiche, quali la tolleranza alla siccità, la capacità di solubilizzare nutrienti o di promuovere la crescita vegetale. Successivamente essi vengono testati in diverse combinazioni, analizzando le interazioni tra le specie e individuando quelle che producono effetti sinergici ottimali. Il risultato è una comunità artificiale progettata in modo razionale. Attualmente, i due approcci tendono ad essere integrati: si individua inizialmente una comunità funzionale di riferimento e si procede poi all'analisi e all'ottimizzazione delle interazioni tra i suoi membri.⁶⁶

Le comunità microbiche selezionate vengono introdotte in sistemi sperimentali sterili, che consentono di simulare le interazioni tra piante *germ-free* e microrganismi in condizioni controllate. Tra i sistemi più utilizzati vi sono substrati a base di agar, argilla sterilizzata o dispositivi come i *flowPot*, che rappresentano un compromesso tra rigore sperimentale e somiglianza con le condizioni naturali. Il *flowPot* è un contenitore chiuso e sterile, riempito con materiale inerte, all'interno del quale le piante ricevono acqua e nutrienti tramite un sistema di irrigazione controllato, con flusso dal basso verso l'alto. Questo metodo consente di monitorare con precisione le interazioni pianta-microrganismi, valutandone gli effetti su crescita, nutrizione e risposta immunitaria in un ambiente semi-controllato.⁶⁷

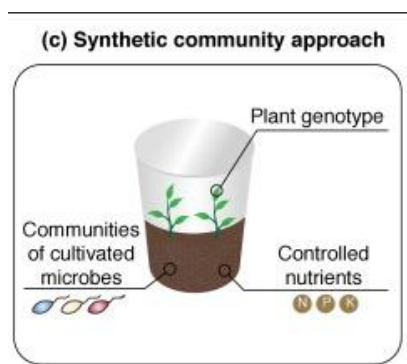


Figura 25: Sistema Flow Pot.⁶⁷

Una volta ottenuti risultati promettenti in laboratorio, le *SynCom* possono essere inoculate in pieno campo in modo da valutarne l'efficacia in condizioni reali, analizzando parametri della pianta quali crescita vegetativa, resa produttiva e risposte fisiologiche.⁶⁶ Tuttavia, uno dei principali limiti di questo approccio risiede nella ridotta stabilità ed efficacia delle comunità sintetiche in ambiente naturale, dove devono competere con il microbioma nativo del suolo e adattarsi a condizioni variabili di pH, temperatura, umidità e composizione chimico-fisica del terreno.

2. Scopo del lavoro

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito del progetto di ricerca "Micro4Life – Microbial solutions for climate-resilient viticulture and rice farming", finanziato dal programma AGER 3 – Bando "From soil to field". Tale progetto è stato finanziato a un consorzio di vari enti di ricerca (CNR, CREA, Università di Sassari e Università del Piemonte Orientale) e mira a sviluppare strategie agroecologiche innovative in grado di aumentare la resilienza delle principali colture agrarie di fronte ai cambiamenti climatici, garantendo al tempo stesso elevati standard qualitativi dei prodotti finali. L'approccio proposto si focalizza sullo studio delle dinamiche tra pianta, suolo e microbioma rizosferico, con l'obiettivo di individuare comunità microbiche sintetiche potenzialmente efficaci in caso di applicazioni mirate alle diverse colture.

Il progetto di tesi, svolto presso il Laboratorio di Chimica degli Alimenti del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università del Piemonte Orientale (DSF), ha come obiettivo la valutazione dell'effetto, sulla qualità dell'uva, da parte dell'inoculo di una comunità microbica sintetica (SynCom) e di funghi micorrizici arbuscolari (AMF) in una vigna, con particolare attenzione al profilo chimico e nutrizionale del frutto raccolto a completa maturazione.

I campioni da sottoporre ad analisi sono 18, tutti di uva Nebbiolo, relativi a tre differenti tesi sperimentali (Controllo, AMF e SynCom) e provenienti da tre replicati biologici. I campioni, inoltre, derivano da due modalità di gestione agronomica del suolo, *tillage* e *no-tillage*, selezionate per valutare l'impatto delle pratiche colturali sulle caratteristiche del frutto.

La prima fase dell'attività sperimentale prevede la determinazione della composizione centesimale dei campioni, comprendendo parametri quali umidità, pH, acidità titolabile, contenuto zuccherino e indice di maturazione. Successivamente sono previste analisi spettrofotometriche per la quantificazione dei polifenoli totali (metodo di Folin-Ciocalteu), dei flavonoidi totali (metodo all' AlCl_3), per la valutazione dell'attività antiossidante (metodi DPPH e FRAP), per la valutazione dell'attività antiradicalica (metodo ABTS), nonché per la determinazione degli antociani totali e monomerici (metodo a pH differenziale) e delle proantocianidine (metodo con cinnamaldeide). Completeranno il progetto le analisi mediante HPLC per la quantificazione e la caratterizzazione più dettagliata di zuccheri, acidi organici e polifenoli.

Infine, i risultati ottenuti saranno elaborati mediante analisi statistica con l'obiettivo di individuare eventuali differenze significative tra i trattamenti microbiologici o tra i sistemi di gestione del suolo adottati.

3. Materiali e Metodi

3.1 Campioni

I campioni di uva analizzati sono stati raccolti in data 2 ottobre 2024, una volta raggiunto il livello di maturazione ottimale per la vendemmia. L'area di provenienza dei campioni si trova nelle Langhe (Piemonte), presso il complesso vitivinicolo di Fontanafredda, situato nel comune di Serralunga d'Alba (CN), dove è presente un vigneto storico coltivato con Nebbiolo.



Figura 36: Vitigno presso il sito di Fontanafredda (CN).

Il vigneto preso in considerazione è suddiviso in due aree caratterizzate da differenti modalità di gestione agronomica:

- Campo lavorato (*tillage*), localizzato nella parte inferiore della parcella.
- Campo non lavorato (*no tillage*), situato nella parte superiore.



**Fontanafredda
Tillage**



**Fontanafredda
No-tillage**

Figura 47: Aree del vigneto di Fontanafredda

All'interno di ciascuna area sono stati identificati tre blocchi sperimentali, ciascuno dei quali sottoposto a uno dei seguenti trattamenti biologici:

- SynCom: inoculo con comunità microbica sintetica derivata dalla collezione ViMed-Biomebank. I ceppi selezionati, batteri endofiti della vite, sono stati isolati partendo da piante cresciute in ambienti semi-aridi o soggetti a siccità. Sono stati selezionati attraverso l'inclusione di tratti associati alla promozione della crescita delle piante e alla capacità di biocontrollo nei confronti di patogeni fungini del legno.

Tra i ceppi presenti figurano *Achromobacter xylosoxidans* (ceppo 19 VE 21-2), noto per una spiccata attività biocontrollante, *Pseudomonas fluorescens* (ceppo P-fluo), caratterizzato da tolleranza alla salinità, ceppi di *Streptomyces* spp. (Roots B4 e G-C WS B2) per la loro marcata attività antifungina, e *Serratia ficaria* (ceppo G-ML WS B10), selezionata per la sua capacità di adattarsi a condizioni saline e per il potenziale biocontrollo.

- AMF (*Arbuscular Mycorrhizal Fungi*): inoculo con un mix commerciale di funghi micorrizici arbuscolari, comprendente *Funneliformis mosseae* e *Rhizophagus irregularis* in rapporto 1:1 (produttore: INOQ, Germania).
- Controllo: assenza di trattamento, utilizzato come riferimento.

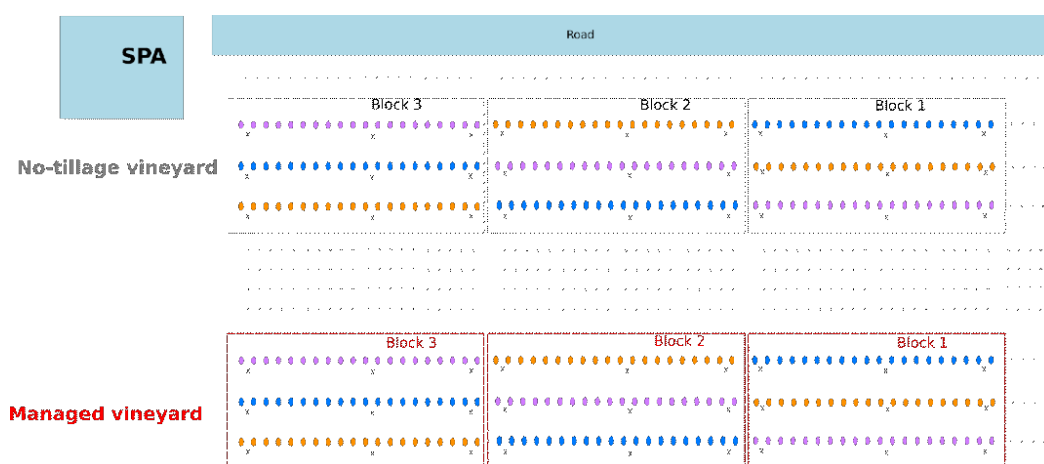


Figura 18: Combinazioni dei trattamenti biologici all'interno del vigneto con gestione *tillage* e *no-tillage* (sito di Fontafredda). I simboli colorati indicano le differenti condizioni sperimentali: rosa = SynCom, blu = controllo, arancione = AMF.

Tabella 1: Elenco dei campioni di uva (cv. Nebbiolo), con dettagli su conduzione suolo e trattamento biologico applicato.

Numero del campione	Varietà	Conduzione del suolo	Trattamento
1	Nebbiolo	Tillage	SynCom replica biologica 1
2	Nebbiolo	Tillage	Controllo replica biologica 1
3	Nebbiolo	Tillage	AMF replica biologica 1
4	Nebbiolo	Tillage	AMF replica biologica 2
5	Nebbiolo	Tillage	SynCom replica biologica 2
6	Nebbiolo	Tillage	Controllo replica biologica 2
7	Nebbiolo	Tillage	Controllo replica biologica 3
8	Nebbiolo	Tillage	AMF replica biologica 3
9	Nebbiolo	Tillage	SynCom replica biologica 3
10	Nebbiolo	No tillage	SynCom replica biologica 1
11	Nebbiolo	No tillage	Controllo replica biologica 1
12	Nebbiolo	No tillage	AMF replica biologica 1
13	Nebbiolo	No tillage	AMF replica biologica 2
14	Nebbiolo	No tillage	SynCom replica biologica 2
15	Nebbiolo	No tillage	Controllo replica biologica 2
16	Nebbiolo	No tillage	Controllo replica biologica 3
17	Nebbiolo	No tillage	AMF replica biologica 3
18	Nebbiolo	No tillage	SynCom replica biologica 3

Preparazione dei campioni

Per ciascun campione d'uva sono stati pesati 50 g alla bilancia tecnica (*Sartorius CP423S*) e lasciati scongelare a temperatura ambiente. Successivamente, l'uva è stata sottoposta a trattamento mediante un estrattore a centrifuga (*Centrika Ariete*) al fine di separare la frazione solida, ovvero semi e bucce, dal succo d'uva. I campioni ottenuti sono conservati in provetta di plastica da 50 mL (Figura 19).



Figura 19: Campioni ottenuti dopo la separazione della frazione solida rispetto al succo.

Il succo d'uva, così ottenuto, è stato utilizzato per le analisi riguardanti i parametri di acidità titolabile, pH, solidi solubili (°Brix) svolte nella medesima giornata.

L'umidità, invece, è stata determinata sul campione di uva tal quale.

3.2 Analisi di base

Umidità

Mediante l'utilizzo della bilancia analitica (*Precisa XB 220A*), sono stati pesati esattamente aliquote da 5 g di acini per ciascun campione, ponendoli su piattini in alluminio di cui si è precedentemente registrata la tara. Una volta scongelati sono stati tagliati a metà e posti in stufa (*WTB Binder*) per tutta la notte a 105°C. La mattina successiva, dopo raffreddamento (Figura 20), i piattini sono stati nuovamente pesati e il peso secco del campione è stato determinato per differenza rispetto alla tara.

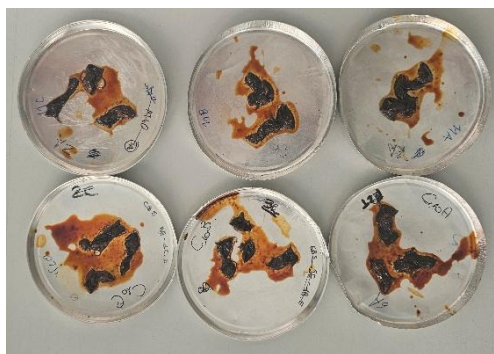


Figura 20: Campioni dopo una notte a 105° C in stufa

Il valore di umidità si calcola applicando le seguenti formule:

$$\%materia\ secca = \frac{peso\ secco(g)}{peso\ iniziale\ (g)} * 100$$

$$\%umidità = 100 - \%materia\ secca$$

Determinazione del pH e dell'acidità titolabile

Preparazione del campione: sono stati pesati 5 g di succo d'uva con bilancia tecnica (*Sartorius CP423S*) in una beuta da 250 mL. Successivamente sono stati aggiunti 50 mL di acqua distillata mediante un cilindro graduato.

Determinazione del pH: il pH del campione è stato misurato mediante pH-metro (*Mettler Toledo*), precedentemente calibrato con due soluzioni tampone a pH 7,00 ($\pm 0,01$) e a pH 4,00 ($\pm 0,01$).

La sonda è stata immersa nella beuta e la lettura è stata effettuata al raggiungimento della stabilità del segnale.

Determinazione dell'acidità titolabile: l'acidità titolabile è stata determinata mediante titolazione acido-base utilizzando una soluzione di NaOH 0,1N come titolante, in grado di neutralizzare gli acidi organici presenti nel succo d'uva.

La titolazione è stata condotta sotto agitazione costante mediante l'utilizzo di un agitatore magnetico (HARED) e di un'ancoretta, posta nella beuta, con monitoraggio continuo del pH fino al raggiungimento del punto di viraggio a pH 8,5 (Figura 21).

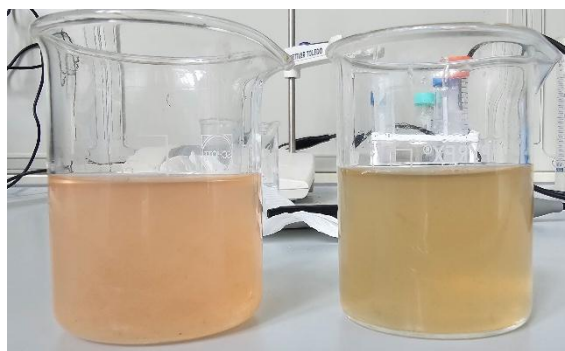


Figura 21: Viraggio del campione durante la titolazione: a sinistra prima dell'aggiunta di NaOH, a destra dopo il raggiungimento del punto di viraggio (pH 8,5).

Le analisi del pH e dell'acidità si effettuano in doppio.

L'acidità titolabile viene espressa per convenzione in percentuale di acido tartarico ed è ricavata mediante la formula:

$$\% \text{ acido tartarico} = \frac{V * N}{P} * K * 100$$

Dove:

- V = volume in mL di NaOH utilizzato;
- N = normalità della soluzione di NaOH (0,1 meq/mL);
- P = peso in g del campione;
- K = peso equivalente dell'acido tartarico (0,075g/meq)

Determinazione dei solidi solubili e dell'indice di maturazione

Il contenuto di solidi solubili è stato determinato mediante metodo rifrattometrico, basato sulla variazione dell'angolo di rifrazione della luce al suo passaggio in una soluzione zuccherina.

Prima di poter effettuare l'analisi, è necessario azzerare il rifrattometro utilizzando acqua distillata. Successivamente, sono stati prelevati 100 µL di succo e depositati sul prisma del rifrattometro (*Atago Hand Refractometer*, Figura 22) per effettuare la misurazione.

Lo strumento fornisce direttamente il risultato in °Brix.



Figura 22: Rifrattometro utilizzato nell'analisi dei solidi solubili

Per la determinazione dell'indice di maturazione, definito come il rapporto tra il contenuto in solidi solubili e il valore dell'acidità titolabile (*metodo 7.3.3*), è stata applicata la seguente formula:

$$\text{Indice di maturazione} = \frac{^{\circ}\text{Brix}}{\text{Acidità Titolabile}}$$

3.3 Analisi spettrofotometriche

Preparazione del campione per la valutazione della componente polifenolica solubile

Per ogni campione di uva sono stati pesati 60 g alla bilancia tecnica (Sartorius CP423S) e lasciati scongelare a temperatura ambiente. Successivamente, il campione è stato sottoposto alla procedura di preparazione descritta nel paragrafo 3.1.

Al succo ottenuto sono stati aggiunti 5 mL di etanolo assoluto, corrispondenti al 10% del volume totale di estrazione. In seguito, la frazione solida precedentemente separata è stata reintrodotta nel becher. Il contenuto è stato brevemente miscelato, sigillato tramite parafilm e lasciato macerare per 16 ore a 4°C.

Il giorno successivo, il campione macerato è stato inserito all'interno di due provette di plastica da 50 mL, cercando di mantenere una distribuzione il più possibile omogenea tra succo, bucce e semi. L'estratto è stato quindi sottoposto a centrifugazione a 7000 rpm per 15 minuti a 4°C (*Eppendorf Centrifuge 5804 R*). Il surnatante ottenuto è stato prelevato, posto in nuove provette da 50 mL, e ulteriormente centrifugato a 11000 rpm per 10 minuti a 4°C, al fine di chiarificare l'estratto. Il surnatante finale è stato prelevato e suddiviso in due provette da 15 mL: un'aliquota è stata conservata in freezer a -18°C per le successive analisi in HPLC, mentre la seconda è stata conservata in frigorifero a 4°C per un massimo di 4 giorni per le analisi spettrofotometriche (Figura 23).

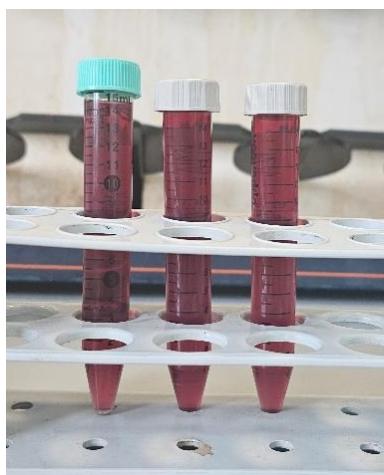


Figura 235: Campioni dopo doppia centrifugazione, destinati alle analisi spettrofotometriche.

Polifenoli totali

La quantificazione dei polifenoli totali è stata effettuata mediante il saggio di *Folin-Ciocalteu*. Tale metodo si basa sull'impiego di un reattivo ossidante, costituito da acido fosfotungstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e acido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) che, in ambiente alcalino, ottenuto con Na_2CO_3 5% p/v, reagisce con i gruppi riducenti dei composti polifenolici, determinandone l'ossidazione. La reazione comporta una variazione cromatica del reattivo con passaggio dal colore giallo al blu.

Preparazione della soluzione di Na_2CO_3 5% p/v: pesare 5 g di Na_2CO_3 alla bilancia analitica (*Precisa XB 220A*), portare in soluzione con acqua distillata in un matraccio da 100 mL.

Preparazione della soluzione standard di acido gallico (1 mg/mL): pesare alla bilancia analitica (*Precisa XR 205SM-DR*) esattamente 1 mg di acido gallico monoidrato in una provetta da centrifuga da 2 mL e solubilizzarlo in acqua in modo da ottenere una concentrazione finale di 1 mg/mL. Questa soluzione è stata utilizzata come standard per la costruzione della retta di taratura.

Preparazione della retta di taratura: per la preparazione della retta di taratura, in cuvette da 2 mL, sono stati aggiunti: 50 μL di reattivo di *Folin-Ciocalteu* e rispettivamente volumi crescenti (5, 10, 15, 20, 25 e 30 μL) della soluzione standard di acido gallico (1 mg/mL). Successivamente sono stati aggiunti 175 μL di soluzione di Na_2CO_3 al 5% p/v; infine, si è raggiunto il volume finale di 1450 μL con acqua distillata. Per ciascun punto della retta di taratura sono state allestite due cuvette. La media delle assorbanze di ciascun punto è stata utilizzata per costruire la retta di taratura (Figura 24), in cui sono stati messi in relazione l'assorbanza e i μg di acido gallico.

Per la preparazione del bianco sono stati aggiunti: 50 μL di reattivo di *Folin-Ciocalteu*, 20 μL di etanolo al 100%, 175 μL di Na_2CO_3 al 5% p/v, acqua distillata fino a un volume finale di 1450 μL .

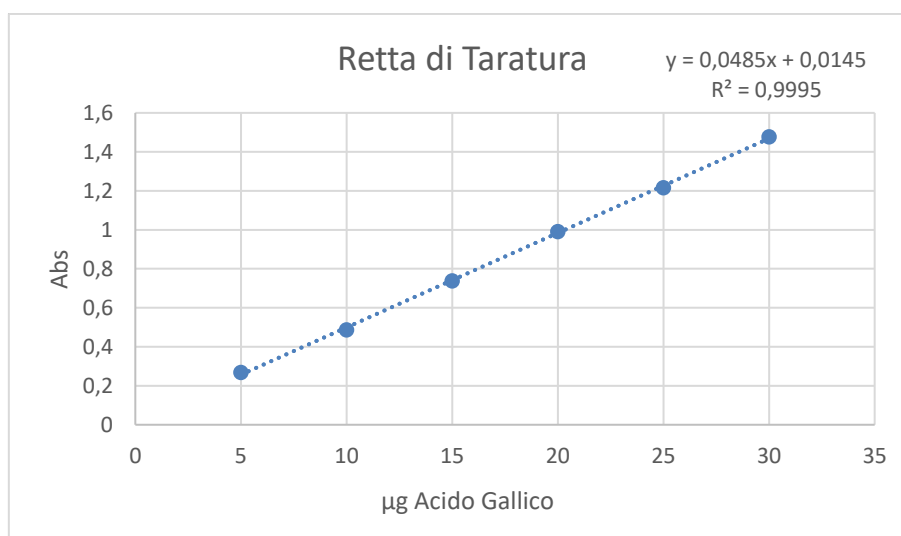


Figura 24: Retta di taratura utilizzata per quantificare i polifenoli totali

Preparazione delle cuvette di campione: per l'allestimento delle cuvette di campione, sono stati aggiunti 50 μL di reattivo di *Folin-Ciocalteu*, 20 μL di campione estratto, 175 μL di Na_2CO_3 al 5% p/v e si è portato a volume finale di 1450 μL con acqua distillata. L'analisi di ciascun campione è stata eseguita in triplicato.

Per la registrazione del dato misurare l'assorbanza dopo 1 ora dalla preparazione delle cuvette alla lunghezza d'onda di 760 nm.

I risultati sono espressi come mg di acido gallico equivalenti (mg GAE) per mL di estratto, tramite interpolazione lineare dei dati ottenuti nell'analisi con la retta di taratura dello standard di riferimento, un esempio della quale possiamo osservare in Figura 24, mentre in Figura 25 è riportato un esempio di cuvette predisposte per le analisi.

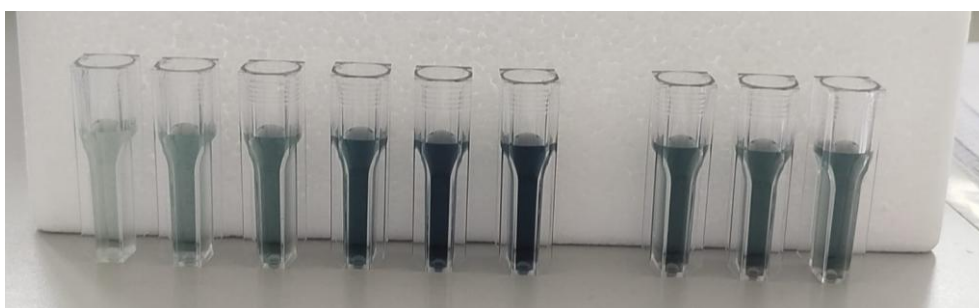


Figura 25: Retta di taratura e campioni per l'analisi dei polifenoli totali.

Flavonoidi totali

La determinazione dei flavonoidi totali è stata effettuata mediante un metodo colorimetrico basato sulla formazione di complessi colorati tra i flavonoidi e il cloruro di alluminio. Il reagente è in grado di formare complessi acidi stabili con il gruppo chetonico in posizione C4 e con i gruppi ossidrilici in posizione C3 e C5 di flavoni e flavonoli, nonché complessi acidi labili con i gruppi orto-diidrossilici presenti sull'anello A dei flavonoidi. I complessi così formati presentano una colorazione rossa, la cui assorbanza viene misurata mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 510 nm.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di NaNO_2 0,08 M: pesare 1,2 g di polvere e solubilizzare in 200 mL di acqua distillata.

Soluzione di AlCl_3 0,16 M: pesare 4,4 g di reagente e scioglierlo in 200 mL di acqua distillata.

Soluzione di NaOH 0,8 M: pesare 6,4 g di soda in pellet e sciogliere in 200 mL di acqua distillata. La procedura è stata effettuata sotto cappa, utilizzando l'agitatore magnetico (HARED) e mantenendo il contenitore in ghiaccio.

Procedura

Preparazione della retta di calibrazione: è stata preparata una soluzione di catechina alla concentrazione di 0,25 mg/mL in EtOH 10% v/v. In cuvetta sono stati inseriti volumi crescenti della soluzione standard preparata precedentemente (25 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L, 200 μ L), portando a volume finale di 450 μ L con etanolo al 10% v/v.

Successivamente, in ciascuna cuvetta, sono stati aggiunti nel seguente ordine:

- 450 μ L di NaNO_2 0,08 M, lasciando reagire per 5 minuti;
- 450 μ L di AlCl_3 0,16 M, con un tempo di reazione di 6 minuti;
- 450 μ L di NaOH 0,8 M, provvedendo a miscelare accuratamente la soluzione.

Il bianco è stato preparato utilizzando 450 μ L di EtOH 10% e aggiungendo i reagenti come precedentemente indicato.

L'assorbanza viene letta dopo 10 minuti e, non oltre i 30 minuti, alla lunghezza d'onda di 510 nm (Figura 26).

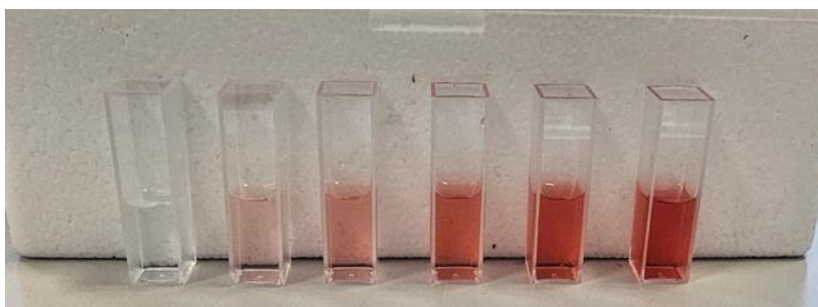


Figura 26: Bianco e punti della retta di taratura del saggio dell'alluminio cloruro

Preparazione dei campioni

A causa di problematiche legate alla formazione di particelle in sospensione, la reazione è stata condotta in provette da centrifuga da 2 mL, successivamente sottoposte a centrifugazione al fine di chiarificare la soluzione.

Per ogni campione sono state allestite tre provette, in cui è stato aggiunto un volume appropriato di estratto del campione e addizionato con EtOH 10% fino al volume di 450 μ L.

A tale soluzione si aggiungono nell'ordine:

- 450 μ L di NaNO_2 0,08 M, lasciando reagire per 5 minuti;
- 450 μ L di AlCl_3 0,16 M, con un tempo di reazione di 6 minuti;
- 450 μ L di NaOH 0,8 M, provvedendo a miscelare accuratamente la soluzione.

Un minuto prima del termine del tempo di incubazione, le provette sono state centrifugate mediante centrifuga *Eppendorf 5804R*, per un minuto a 1400 giri. Successivamente, il contenuto è stato trasferito in cuvette e l'assorbanza è stata misurata alla lunghezza d'onda di 510 nm.

Il contenuto totale di flavonoidi nella matrice analizzata è stato determinato interpolando i valori di assorbanza dei campioni sulla retta di calibrazione, ottenuta utilizzando lo standard di catechina. I risultati sono stati espressi come milligrammi di catechina equivalenti per millilitro di estratto (mg CE/mL).

Antociani totali e monomerici

Gli antociani monomerici presenti nell'uva mostrano una variazione reversibile della colorazione in funzione del pH: la forma colorata, corrispondente ai sali di ossonio, è predominante a pH 1,0, mentre la forma incolore emichetaleica è predominante a pH 4,5. La differenza di assorbanza misurata a 520 nm ai due valori di pH risulta proporzionale alla concentrazione degli antociani monomerici.

Gli antociani in forma polimerica, invece, non subiscono variazioni cromatiche in risposta al cambiamento di pH, e non vengono pertanto considerati nella determinazione, in quanto presentano valori di assorbanza sovrapponibili sia a pH 1,0, sia a pH 4,5.

Preparazione buffer a pH 1,0 (KCl 0,025 M): sono stati pesati 1,86 g di KCl e solubilizzati in circa 980 mL di acqua distillata. Portare la soluzione a pH 1,0 ($\pm 0,05$) utilizzando HCl 37% (p/p). Infine, portare a volume con acqua distillata in un matraccio da 1 L.

Preparazione buffer a pH 4,5 (CH₃COONa 0,4 M): sono stati pesati 54,4 g di CH₃COONa anidro e si sono solubilizzati in circa 960 mL di acqua distillata. Portare la soluzione a pH 4,5 ($\pm 0,05$) utilizzando HCl 37% (p/p). Infine, portare a volume con acqua distillata in un matraccio da 1 L.

Preparazione campioni a pH 1: per l'allestimento delle cuvette dei campioni è stato prelevato un volume adatto di estratto e portato a un volume finale di 1 mL con il buffer a pH 1. Far riposare le cuvette al buio per 15 minuti, prima della misurazione dell'assorbanza alla doppia lunghezza d'onda di 520 nm e 700 nm. L'analisi è stata effettuata in triplo per ciascun campione.

Preparazione campioni a pH 4,5: per l'allestimento delle cuvette dei campioni, prelevare il volume adatto di estratto e portare al volume finale di 1 mL con il buffer a pH 4,5. Far riposare le cuvette al buio per 5 minuti prima della misurazione dell'assorbanza alla lunghezza d'onda: 520 nm e 700 nm. L'analisi è stata effettuata in triplo per ciascun campione. (Figura 27).

Bianco: il bianco è stato preparato allestendo due cuvette contenenti 1 mL di soluzione di buffer di riferimento. I risultati ottenuti sono espressi in mg cianidina-3-glucoside equivalenti (C₃GE) su mL di estratto.

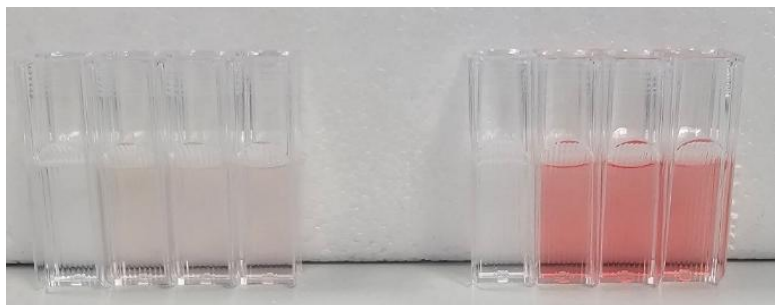


Figura 27: Antociani monomerici e totali

Proantocianidine totali

Per la determinazione delle proantocianidine è stato utilizzato il reagente 4-(dimetilammino) cinnamaldehyde (DMAC).

Preparazione dei reagenti

Preparazione del solvente per le proantocianidine (PAC): in un matraccio da 100 mL sono stati introdotti 75 mL di acetone, 24,5 mL di acqua deionizzata e 0,5 mL di acido acetico al 98% (v/v). La soluzione ottenuta può essere conservata in una bottiglia di plastica, a temperatura ambiente, per un anno.

Preparazione dell'etanolo acidificato: in una beuta da 250 mL, sono stati aggiunti 12,5 mL di acqua deionizzata, 75 mL di etanolo assoluto e successivamente sono stati aggiunti 12,5 mL di HCl al 36% (p/p) sotto cappa. Durante l'aggiunta dell'acido, la beuta è stata posta in un contenitore con ghiaccio per favorire il raffreddamento della soluzione.

Preparazione del reagente (DMAC) in etanolo acidificato: sono stati pesati circa 0,5 mg di DMAC in una provetta di plastica da 50 mL e successivamente sono stati aggiunti 50 mL di etanolo acidificato. La soluzione è stata omogeneizzata mediante vortex (Analog Vortex Mixer VWR) e conservata a -20 °C per un giorno al massimo.

Procedura:

Preparazione della soluzione standard di catechina (1 mg/mL): è stato pesato, alla bilancia analitica (*Precisa XR 205SM-DR*), esattamente 1 mg di catechina idrata in una provetta da centrifuga da 2 mL e solubilizzata in etanolo al 95% ottenendo una concentrazione finale di 1 mg/mL. Tale soluzione è stata utilizzata come standard per la costruzione della retta di taratura.

Preparazione della retta di taratura: dalla soluzione standard di catechina, sono stati prelevati volumi crescenti, 2,5 μL , 5 μL , 10 μL , 15 μL , 20 μL e trasferiti in 5 provette da 2 mL. In ogni provetta, è stato raggiunto il volume finale di 1 mL con il solvente PAC (rispettivamente 997,5 μL , 995 μL , 990 μL , 985 μL , 980 μL). Per ciascun punto della retta, in cuvetta sono stati aggiunti 840 μL di reagente DMAC e successivamente 280 μL di ciascuna soluzione preparata in precedenza. Le cuvette sono state lasciate in incubazione al buio per 20 minuti, dopodiché l'assorbanza è stata misurata mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 640 nm (Figura 28).

Per il bianco: il bianco è stato preparato allestendo due cuvette contenenti 280 μL di solvente PAC e 840 μL di reagente BL-DMAC.

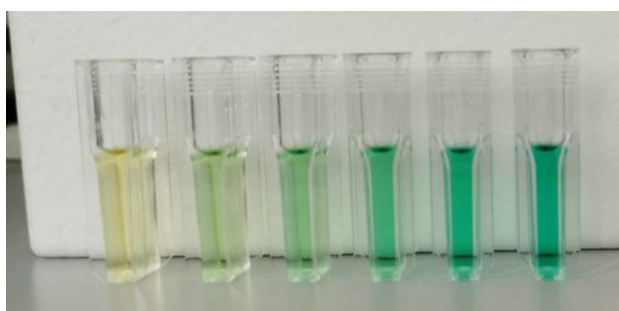


Figura 68: Cuvette di bianco e retta di taratura per il saggio DMAC.

Preparazione dei campioni: un volume di 20 μL di campione è stato prelevato e trasferito in una provetta da centrifuga da 2 mL, a cui successivamente è stato aggiunto il solvente PAC fino al raggiungimento di un volume finale di 300 μL . Da questa soluzione sono stati prelevati 280 μL e trasferiti in cuvetta, in cui sono stati precedentemente aggiunti 840 μL di reagente BL-DMAC. Le cuvette sono state poste al buio per 20 minuti prima della misurazione dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 640 nm. L'analisi è stata effettuata in triplo. I risultati ottenuti sono stati espressi come mg di catechina equivalenti per mL di estratto.

Attività antiradicalica

Per la determinazione dell'attività antiradicalica sono stati utilizzati due metodi spettrofotometrici:

- il metodo di quenching del radicale 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS^{•+});
- il test di neutralizzazione del radicale libero 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]).

Metodo ABTS^{•+}

In questo saggio spettrofotometrico, è stato utilizzato l'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico), un radicale cationico di colore verde che è in grado di ridursi a molecola incolore in presenza di sostanze riducenti.

Preparazione della soluzione di ABTS^{•+}

La soluzione madre di ABTS^{•+} è stata ottenuta miscelando 50 mL di una soluzione acquosa di perossidisolfato di potassio (662,3 mg/L) con 50 mL di una soluzione acquosa di ABTS^{•+} (3,8408 g/L). Successivamente, 2,3 mL della soluzione madre sono stati diluiti con 100 mL di etanolo assoluto. La soluzione diluita è lasciata a riposare al buio per una notte, al fine di consentire la completa formazione e stabilizzazione del radicale.

Prima dell'analisi, l'idoneità del reagente viene verificata misurando l'assorbanza di 1 mL di soluzione diluita di ABTS^{•+} a 734 nm, utilizzando etanolo come bianco. Il valore di assorbanza è considerato accettabile se compreso tra 0,680 e 0,720.

Preparazione della retta di calibrazione

Sono stati pesati 4,6 mg di Trolox in una provetta di plastica mediante bilancia analitica (Precisa XR 205SM-DR) ed è stata solubilizzata con etanolo assoluto per ottenere una soluzione standard alla concentrazione di 1 mg/mL. Di tale soluzione sono stati prelevati volumi crescenti (50 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL, 700 µL), e trasferiti in provetta di plastica da 2 mL e sono stati portati a un volume totale di 1 mL con etanolo. Per ciascun punto della retta, sono stati prelevati 10 µL di ciascuna soluzione e posti in cuvetta precedentemente caricata con 1 mL di soluzione diluita di ABTS^{•+}. Dopo incubazione al buio per 6 minuti, l'assorbanza è stata misurata a 734 nm (Figura 29).

Preparazione campioni

Sono state preparate opportune diluizioni dell'estratto in provetta da 2 mL, portando il volume finale a 200 µL mediante l'aggiunta di etanolo, ovvero il solvente di estrazione. In cuvetta sono stati aggiunti 1000 µL di soluzione diluita di ABTS^{•+} e 10 µL della relativa diluizione del campione.

Le cuvette sono state mantenute al buio per 6 minuti e successivamente è stata misurata l'assorbanza a 734 nm mediante spettrofotometro (*Shimadzu UV-1900*). L'analisi è stata eseguita in triplicato.

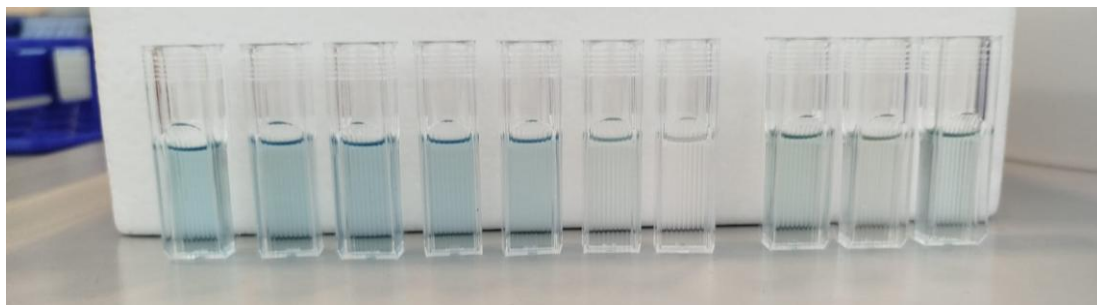


Figura 79: Retta di taratura e campioni per il saggio ABTS•+

La percentuale di inibizione viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ inibizione} = \frac{\text{Abs controllo} - \text{Abs campione}}{\text{Abs controllo}} * 100$$

Utilizzando l'equazione della retta è possibile determinare i µg di Trolox necessari per esprimere i risultati ottenuti in mg di Trolox equivalenti (TE) su mL di estratto (Figura 30).

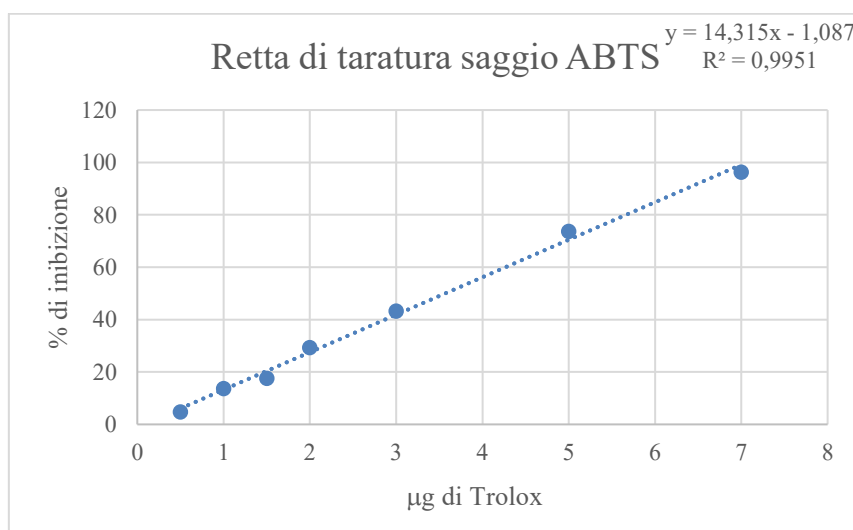


Figura 30: Esempio di retta di taratura utilizzata per l'analisi dell'attività anti-radicalica con ABTS•+

Metodo DPPH•+

Il potere antiradicalico è stato valutato anche mediante il saggio DPPH•, basato sulla reazione tra il campione in esame e il radicale stabile 2,2-difenil-1-picrilidrazilico. In presenza di composti con attività antiossidante, il DPPH• viene ridotto, determinando una variazione cromatica da viola a giallo, proporzionale alla capacità antiradicalica del campione.

Preparazione della soluzione di DPPH•

Sono stati pesati 2 mg di DPPH• in una provetta da 2 mL mediante bilancia analitica (Precisa XR 205SM-DR). A questi sono stati aggiunti 2 mL di metanolo (MeOH) e la soluzione è stata solubilizzata mediante vortex. Successivamente, la soluzione è stata successivamente trasferita quantitativamente in un matraccio volumetrico da 50 mL e portata a volume con MeOH.

L'idoneità della soluzione è stata verificata allestendo una cuvetta contenente 700 µL di MeOH e 700 µL di DPPH•, misurando l'assorbanza a 515 nm. Il valore è considerato accettabile se compreso tra 0,460 e 0,540; in caso contrario, la soluzione deve essere opportunamente diluita con MeOH fino al raggiungimento dell'intervallo previsto.

Il bianco è stato preparato utilizzando 1400 µL di MeOH.

Analisi dei campioni

Sono state preparate diluizioni dei campioni in modo tale da ottenere, in analisi, una percentuale di inibizione compresa tra il 40% e il 70%. Dopo alcune prove, la diluizione idonea è stata selezionata 1:200, ovvero 12 µL di campione portandoli a volume finale di 2400 µL con EtOH.

Dopo aver opportunamente diluito il campione, sono stati prelevati 700 µL di estratto diluito e trasferiti in una cuvetta, a cui sono stati aggiunti 700 µL di DPPH• (Figura 31).

Le cuvette sono state lette allo spettrofotometro dopo 30 minuti al buio, alla lunghezza d'onda di 515 nm.

La percentuale di inibizione è calcolata con la seguente formula:

$$\% \text{ inibizione} = \frac{\text{Abs controllo} - \text{Abs campione}}{\text{Abs controllo}} * 100$$

L'analisi è stata effettuata in triplo.

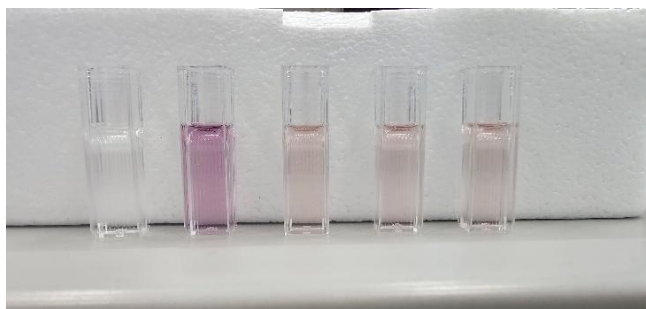


Figura 31: Controllo e campioni saggio DPPH•

Come per il saggio ABTS, anche per il DPPH viene utilizzata l'equazione della retta per determinare i μg di Trolox necessari per esprimere i risultati ottenuti in mg di Trolox equivalenti (TE) su mL di estratto.

Attività antiossidante

Per la valutazione dell'attività antiossidante è stato impiegato il saggio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), metodo spettrofotometrico basato sulla capacità dei composti antiossidanti di ridurre lo ione ferrico (Fe^{3+}) a ione ferroso (Fe^{2+}) in ambiente acido. La formazione del complesso Fe^{2+} -TPTZ determina lo sviluppo di una colorazione blu/viola, la cui intensità è proporzionale al potere riducente del campione.

Preparazione reagenti

Tampone acetato (pH =3,6):

- Acido acetico 0,6 M: sono stati diluiti 34,65 mL di acido acetico 99% in acqua distillata fino a un volume finale di 1 L.
- Acetato di sodio 0,6 M: sono stati sciolti 24,61 g di CH_3COONa in acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL.

Le due soluzioni sono state successivamente mescolate nella seguente proporzione: 463 mL di acido acetico e 37 mL di acetato di sodio, il tutto portato a volume finale di 500 mL con acqua.

Preparazione reattivo FRAP

Il reattivo FRAP è stato ottenuto miscelando:

- **Soluzione di TPTZ 10 mM:** sono stati pesati 0.01562 g di 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), disciolti in 5 mL di acqua distillata e acidificati con 17,6 μ L di HCl concentrato.
- **Soluzione di FeCl_3 20 mM:** sono stati pesati 0.027 g di FeCl_3 e solubilizzati in 5 mL di acqua distillata.

In una beuta schermata dalla luce con foglio di alluminio sono stati aggiunti 50 mL di tampone acetato, 5 mL di soluzione TPTZ e 5 mL di soluzione di FeCl_3 . Il reattivo, dopo essere stato mescolato, è stato mantenuto al buio fino al momento dell'utilizzo e impiegato nella stessa giornata di preparazione.

Preparazione della retta di taratura

La soluzione madre di Trolox (0,5 mg/mL) è stata ottenuta pesando 5 mg di Trolox e solubilizzandoli in 10 mL di metanolo assoluto e conservata a -20 °C. La soluzione diluita è stata preparata effettuando una diluizione 1:1, miscelando 5 mL della soluzione madre con 5 mL di MeOH.

Sono stati predisposti sette punti di calibrazione mediante aggiunta di volumi crescenti di soluzione diluita di Trolox (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 μ L), portando ciascuna soluzione a un volume finale di 500 μ L. Dopo l'aggiunta del reattivo FRAP, le cuvette sono state incubate al buio per 6 minuti, al termine dei quali è stata misurata l'assorbanza a 593 nm (Figura 32).

Per il bianco si utilizzano due cuvette contenenti 1550 μ L di acqua distillata.

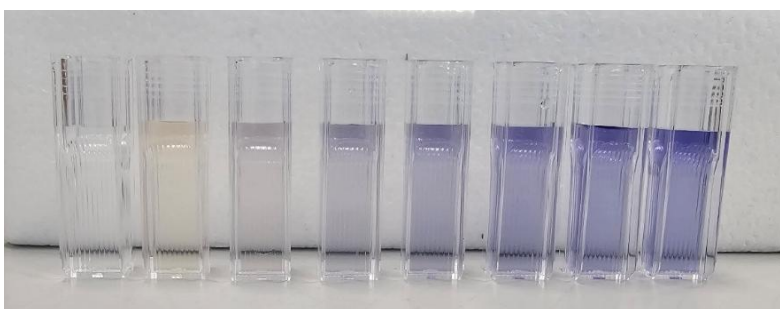


Figura 32: Bianco e retta di taratura del saggio FRAP

Preparazione dei campioni

I campioni sono stati diluiti in rapporto 1:20 con acqua distillata. Per ciascuna cuvetta sono stati prelevati 50 μ L di campione diluito, a cui sono stati aggiunti 1,5 mL di reattivo FRAP. Dopo l'incubazione al buio per 6 minuti, l'assorbanza è stata misurata a 593 nm mediante spettrofotometro (Shimadzu UV-1900).

I risultati sono espressi come mg di Trolox equivalenti (TE) su mL di estratto.

3.4 Analisi in HPLC

La cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa, accoppiata a un rilevatore a serie di diodi (RP-HPLC-DAD), rappresenta una tecnica analitica quali-quantitativa ampiamente impiegata per la caratterizzazione del profilo molecolare di matrici complesse.

Il sistema consente la separazione dei composti in base alla loro interazione con la fase stazionaria apolare e la fase mobile polare, permettendo al contempo la registrazione simultanea dello spettro di assorbimento UV-Vis degli analiti in funzione della lunghezza d'onda.

Tale approccio consente l'identificazione dei composti sulla base dei tempi di ritenzione e delle caratteristiche spettrali, nonché la loro quantificazione mediante opportune curve di calibrazione.

3.4.1 Composti polifenolici

Per la quantificazione delle varie componenti polifenoliche sono stati selezionati gli standard opportuni per costruire le rette di taratura. Gli standard di acidi fenolici utilizzati sono stati: acido gallico, acido protocatecuico, acido p-idrossi benzoico e acido cumarico. Le altre componenti polifenoliche analizzate sono state catechina, epicatechina, rutina, quercitina, miricetina, resveratrolo e luteolina.

Per ogni standard sono state preparate rette di taratura appropriate, utilizzando diluizioni seriali di una soluzione madre a 1000 ppm (1 mg/mL). Le concentrazioni utilizzate per le curve di calibrazione variavano da 0,1 ppm a un massimo di 50 ppm, opportunamente selezionate in base alle concentrazioni dei campioni.

Tabella 2: Equazione della retta e relativo coefficiente di determinazione (R^2) dei vari polifenoli analizzati.

Standard	Equazione della retta	R^2
<i>Acido gallico</i>	$y=7700,5x-8627$	0,9988
<i>Acido protocatecuico</i>	$y=4278,6x-2512,6$	0,9995
<i>Acido p-OH benzoico</i>	$y=3243,4x+932,85$	0,9999
<i>Acido cumarico</i>	$y=100036x-16832$	0,9982
<i>Catechina</i>	$y=1800,4x-3921,7$	0,998
<i>Epicatechina</i>	$y=1878,1x-3838,3$	0,9985
<i>Rutina</i>	$y=3355,8x-3558,5$	0,9994
<i>Quercitina</i>	$y=4844,6x-8992,8$	0,999
<i>Miricetina</i>	$y=4270,9x-17917$	0,9976
<i>Resveratrolo</i>	$y=14400x-17468$	0,9977
<i>Luteolina</i>	$y=18726x-2780,1$	0,9982

Sono stati prelevati 2 mL da ciascun campione, ossia le provette da 15 mL precedentemente congelate, e trasferiti in provetta da centrifuga. Successivamente è stata effettuata una centrifugazione per 4 minuti a 14000 rpm a 5°C. È stato prelevato 1 mL da ciascuna provetta e filtrato mediante filtri da siringa e inserito nel vial da HPLC.

L'analisi è stata effettuata in doppio per ciascun campione.

La strumentazione le condizioni impiegate per l'analisi degli zuccheri sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3: Strumentazione e condizioni impiegate per l'analisi delle componenti polifenoliche

Strumento	Shimadzu LC-20 A Prominence
Pompa	Pump System LC-20AB
Degasatore	DGU-20 A5
Integratore computerizzato	System Controller CBM-20°
Campionatore automatico	AUTO SAMPLER SIL-20°
Termostato per colonne	Column Oven CTO-20°
Colonna	Luna C18 (2) 100° 5µm 150x2mm Phenomenex
Pre-colonna	Security Guard Phenomenex
Temperatura colonna	35° C
Rilevatore	DAD detector SPD-M20A
Rilevazione	280-330 nm
Scansione	280-320 nm
Eluente A	Acqua/acido formico 0,1% v/v degassato in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti
Eluente B	Acetonitrile/acido formico 0,1% v/v degassato in bagno a ultrasuoni per 5 minuti
Volume di iniezione	5 µL
Flusso	0,4 mL/min
Durata	80 minuti

3.4.2 Zuccheri

Nell'analisi cromatografica sono stati impiegati i seguenti standard analitici: glucosio, fruttosio, arabinosio, saccarosio, stachiosio e raffiniosio.

Per ciascun composto è stata preparata una curva di calibrazione a partire da una soluzione madre di 1000 ppm (1 mg/mL). Le rette di taratura sono state ottenute mediante diluizioni seriali della soluzione madre, al fine di coprire un intervallo di concentrazioni adeguato alla quantificazione delle molecole nei campioni.

Le concentrazioni usate per la costruzione delle rette di taratura sono state: 1000, 500, 250, 100 ppm. Le rette sono state ottenute riportando l'area del picco cromatografico in funzione della concentrazione dello standard, e utilizzate, per la quantificazione dei corrispondenti analiti nei campioni, mediante interpolazione lineare.

Tabella 4: Equazione della retta e coefficiente di determinazione (R^2) dei vari zuccheri analizzati.

Standard	Equazione della retta	R^2
<i>Glucosio</i>	$y=75984x-588,51$	1
<i>Fruttosio</i>	$y=72384x+790,54$	0,9999
<i>Arabinosio</i>	$y=65472x+1471,4$	1
<i>Saccarosio</i>	$y=88019x-3167,3$	0,9963
<i>Stachiosio</i>	$y=44508x-163,69$	0,9999
<i>Raffiniosio</i>	$y=73340x-797,64$	0,9999

La strumentazione e le condizioni impiegate per l'analisi degli zuccheri sono riportate nella Tabella 5.

Tabella 5: Strumentazione e condizioni impiegate per l'analisi degli zuccheri

Strumento	Shimadzu LC-20 A Prominence
Pompa	Pump System LC-20AB
Degasatore	DGU-20 A5
Integratore computerizzato	System Controller CBM-20°
Campionatore automatico	AUTO SAMPLER SIL-20°
Termostato per colonne	Column Oven CTO-20°
Colonna	Rezex RPM Monosaccharide Pb2+ 300x7.8 mm Phenomenex
Pre-colonna	Security Guard Phenomenex
Temperatura colonna	75 °C
Temperatura detector	40 °C
Rilevatore	DAD detector SPD-M20A
Eluente	Acqua ultra-pura degassata in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti
Metodo eluizione	Separazione Isocratica
Volume di iniezione	5 µL
Flusso	0,6 mL/min
Durata	50 minuti

Una volta ottenute le rette di taratura, si sono preparati i campioni.

Sono stati pesati 10 g di acidi di ciascun campione e lasciati scongelare. Una volta scongelati, i campioni sono stati omogeneizzati mediante l'utilizzo dell'*Ultra-turrax T25 (Basic IKA WERKE)*. Dal campione, sono stati prelevati 5 g a cui sono stati aggiunti 25 mL di acqua ultra-pura in provetta da 50 mL.

A questo punto, i campioni sono stati inseriti per 30 minuti nell'Orbital Shaking in modo da sospendere nel modo più efficiente possibile il campione. Successivamente è stata effettuata una centrifugazione per 7 minuti a 10000 rpm a 5°C.

È stato prelevato il surnatante e le provette contenenti il campione sono state conservate una in frigorifero, mentre l'altra è stata congelata in quanto utilizzata per l'analisi in HPLC degli acidi organici.

Una volta ottenuto il campione, è necessario individuare la diluizione corretta per l'iniezione in HPLC: nel caso degli zuccheri, dopo alcune prove, la diluizione scelta è stata 1:20, ovvero 50 µL di ciascun campione e 950 µL di acqua in un vial da HPLC.

L'analisi è stata effettuata in doppio per ciascun campione.

3.4.3 Acidi Organici

Come per le analisi precedenti, anche per la caratterizzazione degli acidi organici dapprima sono state preparate le soluzioni standard, ovvero soluzioni di acido tartarico, acido malico e acido succinico.

Per l'acido tartarico sono state preparate due soluzioni madri di 1500 ppm (1,5 mg/1 mL) e due soluzioni madre di 1000 ppm (1 mg/1 mL). Da quest'ultima sono state effettuate alcune diluizioni seriali:

- Diluizione 1:1 prelevando 500 µL di soluzione madre (1000 ppm) a cui sono stati aggiunti 500 µL di acqua ultra-pura. In questo modo si ottiene la soluzione 500 ppm.
- Diluizione 1:10 prelevando 100 µL di soluzione madre 1000 ppm a cui sono stati aggiunti 900 µL di acqua ultra-pura. In questo modo si ottiene la 100 ppm.

Dalla soluzione 500 ppm è stata preparata un'ulteriore diluizione: prelevando 500 µL a cui sono stati aggiunti 500 µL del solvente di estrazione, si è ottenuta la soluzione a 250 ppm.

Riassumendo, per l'acido tartarico avremo 1500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm e 100 ppm.

Per l'acido malico e l'acido tartarico è stata effettuata una procedura differente: per prima cosa è stata preparata una soluzione madre 1000 ppm (1 mg/1 mL) in doppio. Da questa è stata ottenuta la 200 ppm, effettuando una diluizione 1:5, prelevando 200 µL a cui sono stati aggiunti 800 µL di solvente; da questa si è ottenuta la soluzione diluita 1:10, prelevando 100 µL a cui sono stati aggiunti 900 µL di solvente; infine è stata effettuata un'ulteriore diluizione, la 1:2, prelevando 50 µL a cui sono stati aggiunti 950 µL di solvente.

Dalla soluzione madre 1000 ppm è stata effettuata infine una diluizione 1:4, prelevando 25 µL di soluzione madre a cui sono stati aggiunti 775 µL di solvente.

Tabella 6: Equazione della retta e coefficiente di determinazione (R^2) dei vari acidi organici analizzati.

Standard	Equazione della retta	R^2
<i>Acido tartarico</i>	$y=4509x-17805$	0,9951
<i>Acido malico</i>	$y=2339,9x-79,7$	1
<i>Acido succinico</i>	$y=2055,1x-6778,3$	0,9854

La strumentazione e le condizioni impiegate per l'analisi degli acidi organici sono riportate nella Tabella 7.

Tabella 7: Strumentazione e condizioni impiegate per l'analisi degli acidi organici

Strumento	Shimadzu LC-20 A Prominence
Pompa	Pump System LC-20AB
Degasatore	DGU-20 A5
Integratore computerizzato	System Controller CBM-20°
Campionatore automatico	AUTO SAMPLER SIL-20°
Termostato per colonne	Column Oven CTO-20°
Colonna	Adamas C18 AQ 250x4.6x5
Temperatura colonna	40 °C
Rilevatore	DAD detector SPD-M20A
Rilevazione	210 nm
Eluente A	H ₂ SO ₄ 10 mM
Metodo eluizione	Isocratico
Volume di iniezione	5 µL
Flusso	0,5 mL/min
Durata	80 minuti

Per l'analisi, sono stati utilizzate le medesime soluzioni ottenute per l'analisi in HPLC degli zuccheri.

Sono stati prelevati 2 mL da ciascun campione, ossia le provette da 15 mL precedentemente congelate, e trasferiti in provetta da 2 mL. Successivamente è stata effettuata una centrifugazione per 4 minuti a 14000 rpm a 5°C. È stato prelevato 1 mL da ciascuna provetta e filtrato mediante filtri da siringa durante l'inserimento nel vial da HPLC.

L'analisi è stata effettuata in doppio per ciascun campione.

3.5 Analisi statistica

I risultati di tutte le analisi sono espressi come media $\pm$ deviazione standard (DS). Per quanto riguarda le analisi di base (composizione centesimale), le determinazioni sono state eseguite in triplo per l'umidità e in doppio per pH, gradi Brix e acidità titolabile, nell'arco della stessa giornata analitica. Per ciascun campione sono stati pertanto ottenuti due o tre valori sperimentali, successivamente impiegati per l'elaborazione statistica.

Nel caso delle analisi spettrofotometriche, i dati sono stati raccolti in tre giornate analitiche distinte. Per ciascun giorno è stata calcolata la media delle repliche tecniche, ottenendo così tre valori medi indipendenti per ciascun campione, utilizzati per il confronto statistico.

Per le analisi effettuate mediante cromatografia HPLC, i dati sono stati raccolti effettuando analisi in doppio. Per ciascun campione i valori risultanti dalle analisi sono stati utilizzati per il confronto statistico.

L'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante analisi della varianza (ANOVA) a una via; il confronto multiplo tra le medie è stato eseguito mediante test post-hoc di Tukey.

I risultati ottenuti sono infine stati analizzati mediante analisi delle componenti principali (*Principal Component Analysis*, o PCA) e l'analisi di correlazione Pearson.

Le analisi statistiche sono state eseguite sfruttando il software R (versione 4.1.2), utilizzando il pacchetto *laercio* per l'applicazione del test di Tukey, per lo svolgimento di PCA è stato utilizzato il pacchetto *FactoMiner*, mentre per l'analisi di correlazione Pearson il pacchetto *pgrmess*.

4. Risultati e discussione

Premessa

Per garantire una lettura chiara e sistematica dei dati raccolti, l'analisi dei risultati sarà articolata in tre fasi distinte.

In una prima fase verranno presentati e confrontati i dati relativi ai 18 campioni nel complesso, con l'obiettivo di garantire una visione d'insieme del dataset, individuare pattern ricorrenti o valori anomali e definire il range di distribuzione dei parametri analizzati.

Successivamente, l'attenzione sarà focalizzata sul confronto tra i trattamenti biologici applicati ai campioni, ossia Controllo, SynCom e AMF, al fine di evidenziare eventuali differenze significative attribuibili all'effetto del trattamento stesso.

Infine, i campioni saranno analizzati in funzione della gestione agronomica del suolo, distinguendo tra quelli provenienti dal campo sottoposto a lavorazione meccanica, campo *tillage*, e quelli raccolti nel campo gestito in assenza di lavorazione, *no-tillage*, così da valutare l'influenza delle pratiche colturali sulle variabili considerate.

Questa tipologia di approccio sarà applicata per tutti i parametri determinati.

L'analisi statistica è stata condotta al fine di valutare la significatività dell'effetto dei trattamenti biologici e delle pratiche agronomiche sui parametri qualitativi analizzati.

4.1. Analisi di base

La fase iniziale dell'analisi sperimentale è stata dedicata alla definizione della composizione centesimale dei campioni, considerando cinque parametri fondamentali: umidità, pH, acidità titolabile, contenuto di solidi solubili e indice di maturazione. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 8.

Tabella 8: Contenuto d'acqua, di solidi solubili (SS), valori di acidità totale (TA), pH e indice di maturazione (SS/TA) dei campioni analizzati; per ogni colonna lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Conduzione del suolo	Umidità (%)	pH	SS (°Brix)	TA (% acido tartarico)	Indice di maturazione (SS/TA)
1-SynCom	Tillage	77,92 ± 4,32 ^a	3,60 ± 0,00 ^{ghi}	22,5 ± 0,21 ^e	0,49 ± 0,01 ^{bcde}	46,5 ^{efgh}
2-Controllo	Tillage	78,00 ± 1,24 ^a	3,57 ± 0,01 ⁱ	22,1 ± 0,00 ^g	0,51 ± 0,02 ^{abcd}	43,6 ^{gh}
3-AMF	Tillage	76,60 ± 3,40 ^a	3,75 ± 0,00 ^{abcd}	23,4 ± 0,14 ^d	0,43 ± 0,00 ^f	53,8 ^{abc}
4-AMF	Tillage	74,48 ± 0,55 ^a	3,70 ± 0,03 ^{bcdef}	24,0 ± 0,14 ^a	0,46 ± 0,03 ^{def}	52,8 ^{abcd}
5-SynCom	Tillage	74,19 ± 0,55 ^a	3,70 ± 0,00 ^{bcdef}	24,0 ± 0,14 ^a	0,43 ± 0,00 ^f	55,4 ^a
6-Controllo	Tillage	76,30 ± 0,42 ^a	3,68 ± 0,00 ^{cdefg}	23,5 ± 0,00 ^b	0,46 ± 0,01 ^{def}	51,5 ^{abcde}
7-Controllo	Tillage	75,51 ± 0,32 ^a	3,58 ± 0,05 ^{hi}	23,4 ± 0,00 ^c	0,48 ± 0,00 ^{cdef}	48,9 ^{cdef}
8-AMF	Tillage	74,69 ± 0,23 ^a	3,64 ± 0,02 ^{fghi}	24,0 ± 0,00 ^a	0,44 ± 0,01 ^{ef}	54,4 ^{ab}
9-SynCom	Tillage	75,07 ± 0,08 ^a	3,64 ± 0,03 ^{fghi}	24,0 ± 0,14 ^a	0,54 ± 0,00 ^a	44,1 ^{fgh}
10-SynCom	No Tillage	76,85 ± 1,06 ^a	3,74 ± 0,01 ^{abcd}	21,8 ± 0,00 ⁱ	0,49 ± 0,01 ^{bcde}	46,5 ^{efgh}
11-Controllo	No Tillage	75,08 ± 0,86 ^a	3,75 ± 0,01 ^{abc}	22,1 ± 0,00 ^g	0,47 ± 0,02 ^a	48,5 ^{defg}
12-AMF	No Tillage	75,29 ± 0,84 ^a	3,76 ± 0,00 ^{abc}	22,0 ± 0,00 ^h	0,50 ± 0,01 ^{abcd}	44,9 ^{fgh}
13-AMF	No Tillage	76,20 ± 0,13 ^a	3,69 ± 0,04 ^{efgh}	21,4 ± 0,00 ^k	0,46 ± 0,00 ^{def}	49,2 ^{bcdef}
14-SynCom	No Tillage	76,94 ± 0,22 ^a	3,75 ± 0,03 ^{bcde}	21,0 ± 0,00 ^l	0,50 ± 0,00 ^{abcd}	45,2 ^{fgh}
15-Controllo	No Tillage	75,87 ± 0,6 ^a	3,78 ± 0,01 ^{ab}	20,9 ± 0,00 ^m	0,54 ± 0,02 ^a	42,0 ^h
16-Controllo	No Tillage	75,95 ± 1,18 ^a	3,66 ± 0,01 ^{defg}	21,0 ± 0,14 ^l	0,53 ± 0,00 ^{ab}	42,3 ^h
17-AMF	No Tillage	75,93 ± 1,51 ^a	3,74 ± 0,10 ^{efgh}	21,5 ± 0,00 ^j	0,52 ± 0,01 ^{abc}	43,6 ^{gh}
18-SynCom	No Tillage	74,48 ± 0,88 ^a	3,82 ± 0,00 ^a	22,4 ± 0,00 ^f	0,52 ± 0,00 ^{abc}	43,2 ^{gh}

Umidità

Per i 18 campioni analizzati, i valori di umidità si collocano all'interno di un intervallo ben definito: il minimo registrato è pari al 74,2% del campione 5-SynCom, mentre il massimo raggiunge il 78,0% del campione 2-Controllo. Nel complesso, i dati risultano coerenti con quanto riportato in letteratura in merito al contenuto idrico dell'acino d'uva.⁶⁸

Nonostante la variabilità osservata, l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative considerando l'intero insieme dei campioni. Analogamente, il confronto tra i trattamenti biologici ha mostrato che né l'applicazione di SynCom, né quella di AMF hanno determinato variazioni statisticamente significative rispetto al gruppo di controllo.

L'unica differenza è emersa nel confronto tra i campioni provenienti dal suolo lavorato (*tillage*) e non lavorato (*no-tillage*), limitatamente al gruppo di Controllo, mentre nei gruppi AMF e SynCom non sono state rilevate differenze significative rispetto alla lavorazione del suolo (Figura 33). Per quanto riguarda il gruppo di Controllo, si osserva comunque una discrepanza attribuibile all'elevata variabilità interna. In particolare, il campione 2 presenta una percentuale di umidità sensibilmente più elevata, mentre il campione 11 mostra un valore nettamente inferiore.

Poiché tale differenza riguarda esclusivamente due campioni appartenenti al solo gruppo Controllo, è plausibile ipotizzare che essa sia riconducibile alla variabilità di campionamento o a differenti stadi di maturazione degli acini, piuttosto che a un effetto sistematico legato alla gestione del suolo.

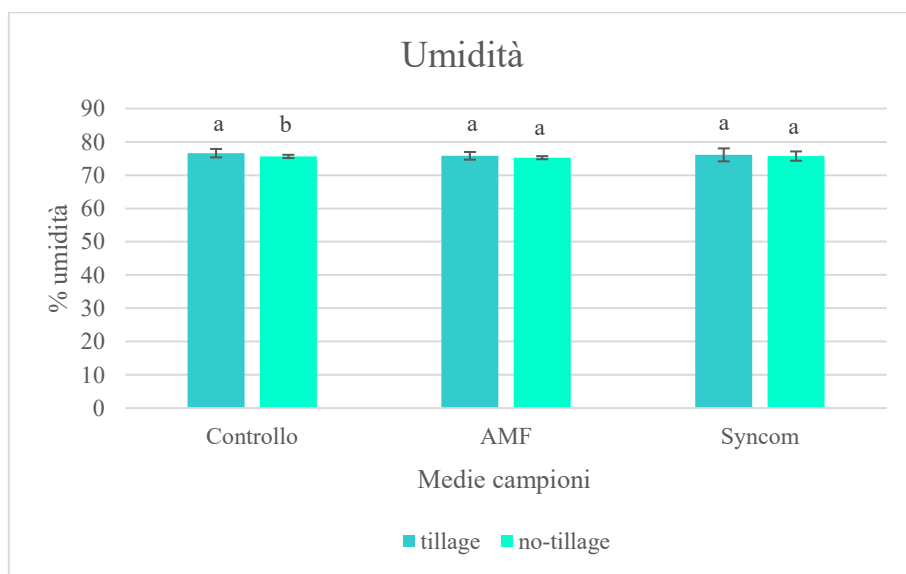


Figura 33: Valori medi di umidità dei campioni in relazione ai metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*) e distinti in base agli inoculi microbiologici.

Per quanto riguarda l'inoculo con AMF, la letteratura riporta che alcuni cultivar, come *Tempranillo* e *Cabernet Sauvignon*, mostrano una migliore risposta alla siccità in seguito alla micorrizzazione, evidenziando un miglioramento dello stato idrico della pianta e una maggior efficienza nell'uso dell'acqua.^{69, 70}

In merito alla gestione del suolo, l'ipotesi di un suo impatto sul contenuto idrico trova riscontro in letteratura. Come discusso nel paragrafo 1.2, il suolo non lavorato, *no tillage*, presenta teoricamente una maggior capacità di trattenere l'acqua, grazie alla presenza di residui colturali in superficie, che riducono l'evaporazione e migliorano la struttura del terreno. Tuttavia, tale effetto può essere limitato da altri fattori, come la compattazione del suolo, che ostacola l'infiltrazione e l'accumulo dell'acqua; di conseguenza non sempre si osservano benefici evidenti in termini di disponibilità idrica per la pianta.

I risultati ottenuti rappresentano un punto di partenza, ma richiedono ulteriori approfondimenti sperimentali. In prospettiva, sarebbe utile integrare l'analisi con parametri fisiologici aggiuntivi, quali il potenziale idrico fogliare e la fotosintesi netta, al fine di ottenere una comprensione più ampia e integrata della risposta della pianta ai diversi trattamenti.

pH

Il pH rappresenta un indicatore fondamentale della qualità dell'uva, in particolare considerando le cultivar destinate alla vinificazione. Esso è determinato principalmente dal contenuto di acidi organici, soprattutto acido tartarico, di cui l'uva Nebbiolo è naturalmente ricca. Oltre alla componente genetica, il pH può essere influenzato da diversi fattori agronomici, come l'irrigazione, l'esposizione solare, lo stress idrico e le caratteristiche del suolo.

Il Nebbiolo è noto per la sua marcata acidità naturale, che generalmente si traduce in valori di pH compresi tra 3,10 e 3,40. I valori riscontrati nei campioni analizzati risultano coerenti con quanto riportato in letteratura, sebbene leggermente superiori rispetto a tale intervallo.⁶⁸ In particolare, il valore minimo registrato è pari a 3,57 nel campione 2, mentre il massimo lo raggiunge il campione 18, con un valore pari a 3,82.

L'analisi statistica condotta sull'insieme dei campioni, riportata in tabella 8, ha evidenziato la presenza di differenze significative, soprattutto tra i due campioni citati precedentemente, mentre i restanti campioni sono relativamente omogenei tra loro.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Sono stati analizzati i valori medi dei gruppi Controllo, AMF e SynCom coltivati in condizioni di *tillage*, evidenziando differenze statisticamente significative tra i vari trattamenti (Figura 34).

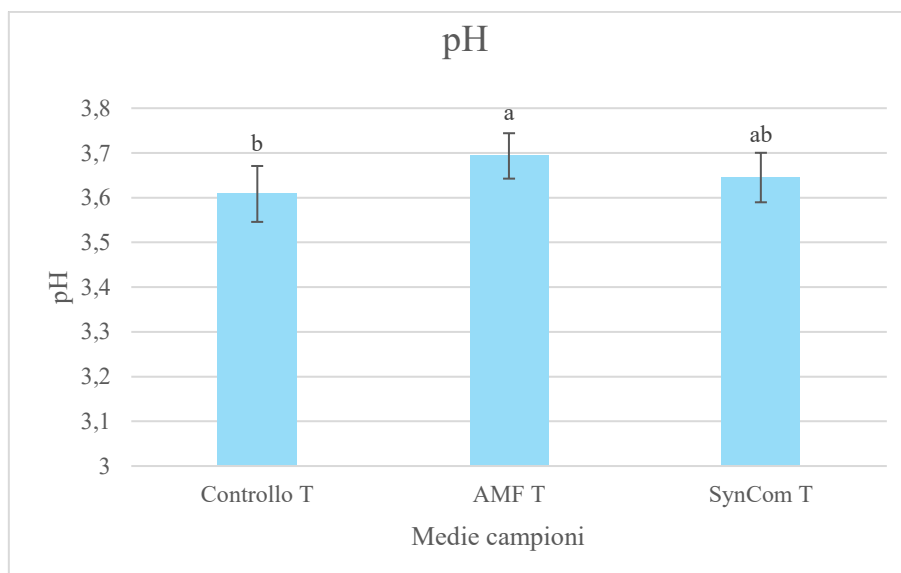


Figura 34: Valori medi di pH in base ai trattamenti in campo a *tillage*

In particolare, il gruppo AMF, con un pH medio pari a 3,69 risulta significativamente differente rispetto al gruppo di Controllo, che presenta un valore medio di 3,61. Al contrario, il gruppo SynCom, con un pH medio di 3,64, non mostra differenze significative, collocandosi in una posizione intermedia e risultando statisticamente simile sia al Controllo, sia al trattamento con AMF.

Per quanto riguarda invece i campioni coltivati in condizioni di *no-tillage*, non sono emerse differenze significative tra i gruppi. Il Controllo presenta il valore medio più elevato di 3,76 mentre AMF e SynCom mostrano valori medi rispettivamente di 3,69 e 3,73, senza che tali differenze risultino statisticamente rilevanti.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

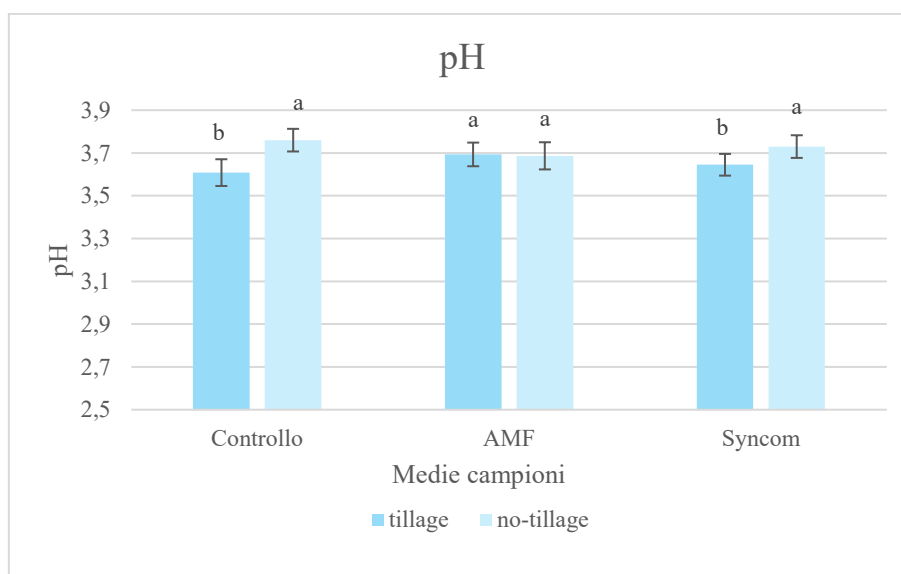


Figura 85: Valori medi di pH del succo in relazione ai metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*) suddivisi per trattamenti microbiologici (Controllo, AMF, SynCom).

Analizzando la Figura 35, nel gruppo Controllo si osserva un aumento statisticamente significativo del pH nel passaggio da suolo *tillage*, in cui troviamo un valore pari a 3,61, a *no-tillage*, con un valore di 3,73. Questo andamento risulta coerente con quanto riportato in letteratura, dove la gestione *no-tillage* è spesso associata a valori di pH più elevati nel mosto.

In uno studio condotto su cultivar come *Ruby Cabernet* e *Merlot*, è stato evidenziato che vigneti provenienti da sistemi *no-tillage* presentano un pH del succo superiore rispetto a quelli coltivati in suoli lavorati. Tuttavia, gli autori sottolineano che in alcuni casi tali differenze non risultano statisticamente significative, suggerendo che l'aumento del pH possa dipendere anche da ulteriori fattori agronomici e ambientali.⁷¹

Un comportamento analogo è stato riscontrato nel gruppo SynCom, che mostra un incremento del pH da 3,65 a 3,77 nel passaggio da *tillage* a *no-tillage*. L'andamento parallelo rispetto al Controllo suggerisce che l'effetto del trattamento SynCom sul pH sia difficilmente distinguibile da quello legato esclusivamente alla gestione del suolo. Inoltre, la letteratura attuale non fornisce ancora evidenze specifiche su un impatto diretto delle comunità microbiche sintetiche sul pH del frutto; per questo motivo, il confronto con il gruppo Controllo risulta fondamentale per interpretare correttamente la risposta osservata.

Diversamente, i campioni trattati con AMF mostrano un incremento più contenuto, da 3,69 a 3,73, non statisticamente significativo, suggerendo una possibile capacità della colonizzazione micorrizica di mitigare l'effetto della gestione del suolo sul pH. Questo comportamento è coerente con quanto riportato in letteratura, secondo cui il successo dell'inoculo di AMF è favorito da una gestione del suolo poco invasiva, in modo da consentire lo sviluppo della rete miceliare. Una rete fungina ben strutturata può infatti migliorare l'assorbimento di nutrienti ed elementi minerali, quali potassio, magnesio e calcio, che influenzano direttamente il pH del frutto e la sintesi degli acidi organici.⁴⁵

Acidità titolabile

L'acidità titolabile rappresenta uno dei parametri fondamentali nella valutazione della qualità dell'uva, in quanto influisce direttamente sul gusto, sulla stabilità microbiologica e sull'equilibrio complessivo del vino. Questo valore esprime la quantità totale di acidi organici presente nell'uva, in particolare acido tartarico e acido malico, ed è generalmente riportato in percentuale rispetto ad un acido di riferimento; nel presente studio è stato calcolato come acido tartarico, il più abbondante nell'uva.

L'analisi dei campioni (Tabella 8) ha evidenziato una certa variabilità nei valori rilevati, con un intervallo compreso tra 0,44% e 0,55%. Il valore massimo, ossia 0,55%, è stato osservato nel campione 15, mentre i valori minimi, 0,44%, sono stati registrati nei campioni 3, 5 e 9.

L'analisi statistica ha messo in evidenza la presenza di gruppi significativamente differenti, in particolare in corrispondenza dei campioni che presentano i valori estremi, mentre i restanti campioni sono caratterizzati da una maggiore omogeneità.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Confrontando i valori medi dei gruppi di trattamento coltivati in suolo *tillage*, non sono emerse differenze statisticamente significative. Il gruppo SynCom presenta il valore medio più elevato, ossia 0,49% di acido tartarico, molto simile al Controllo, con un valore di 0,48%, mentre il gruppo AMF è caratterizzato da un valore inferiore, pari a 0,44%.

La riduzione osservata nei campioni trattati con AMF risulta coerente con quanto riportato in letteratura, dove è descritta una diminuzione dell'acido malico nell'uva micorrizzata, attribuita a un'intensificazione della respirazione cellulare indotta dagli AMF. Questo processo comporterebbe un maggior consumo di acido malico, con conseguente riduzione dell'acidità complessiva.⁷²

Analogamente, anche nei campioni coltivati in suolo *no-tillage* non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i gruppi. Il Controllo e il SynCom presentano valori medi molto vicini, rispettivamente a 0,51% e 0,50% di acido tartarico, mentre il gruppo AMF mantiene valori leggermente inferiori, pari a 0,49%.

Nel complesso, i dati non evidenziano un effetto marcato o statisticamente dimostrabile dei trattamenti biologici sull'acidità titolabile, pur suggerendo una lieve tendenza alla riduzione nei campioni micorrizzati.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

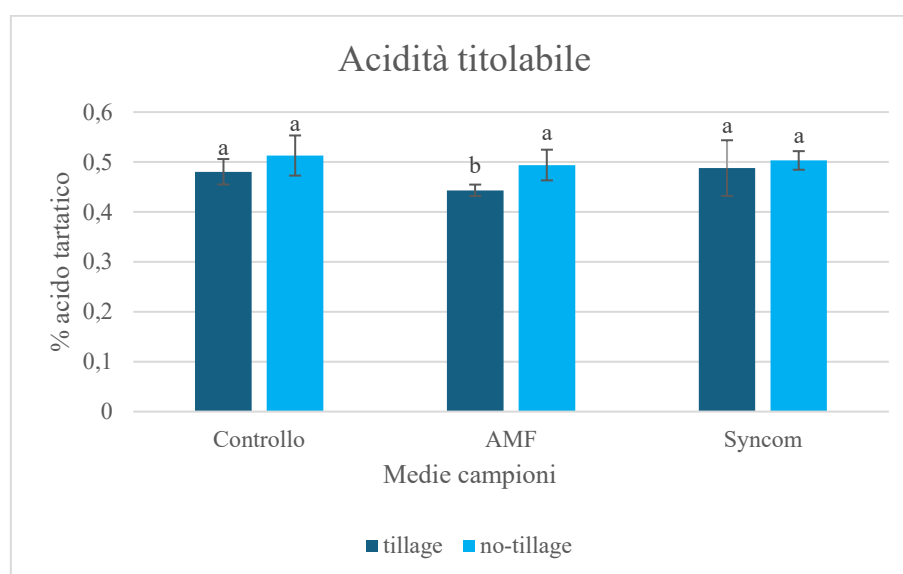


Figura 36: Valori medi di percentuale di acidità titolabile dei campioni in relazione ai metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*) suddivisi per trattamenti microbiologici (Controllo, AMF, SynCom).

Per quanto riguarda il confronto tra campo lavorato, *tillage*, e non lavorato, *no-tillage*, riportato in Figura 36, emerge un valore medio di acidità titolabile più elevato, per tutti i gruppi, nelle condizioni di *no-tillage*. Tuttavia, la differenza risulta statisticamente significativa esclusivamente nel gruppo AMF.

Questo andamento potrebbe essere interpretato ipotizzando una minore efficienza della simbiosi micorrizica in suoli non disturbati, dove la rete fungina potrebbe incontrare maggiori difficoltà nell'instaurare una colonizzazione efficace o nel modulare il metabolismo della pianta in modo marcato. Di conseguenza, in tali condizioni, l'effetto degli AMF sull'acidità potrebbe risultare meno stabile o meno prevedibile.

I dati ottenuti nei suoli non lavorati risultano, tuttavia, in parziale contrasto con una parte della letteratura, in quanto l'acidità titolabile è spesso riportata come più elevata in condizioni di *tillage*. In particolare, si ipotizza che la lavorazione del suolo possa influenzare la traspirazione e la dinamica di maturazione dell'uva, due fattori strettamente correlati alla degradazione dell'acido malico.⁷¹ Una minor degradazione di tale acido durante la maturazione contribuirebbe, infatti, al mantenimento di livelli più elevati di acidità titolabile.

Solidi solubili

Il parametro dei solidi solubili, espresso in °Brix, rappresenta un indicatore fondamentale per valutare il contenuto zuccherino dell'uva. Questo valore riflette principalmente la concentrazione di zuccheri semplici, quali glucosio e fruttosio, ma può includere anche altri composti solubili presenti nel succo. Nell'uva destinata alla vinificazione, i valori ottimali si collocano generalmente tra 21,0 e 25,0 °Brix, valori a cui si valuta il momento di raccolta dell'uva.

L'analisi dei campioni (Tabella 8) ha evidenziato un'elevata variabilità dei dati: l'elaborazione statistica ha identificato 13 gruppi distinti su un totale di 18 campioni. Il valore minimo registrato è pari a 20,9 °Brix del campione 15, mentre il massimo raggiunge il valore di 24,0 °Brix, che caratterizza i campioni 3, 5 e 9.

Nel complesso, i valori risultano coerenti con quanto riportato in letteratura per il Nebbiolo, confermando che i campioni analizzati si collocano tutte nel range atteso per questa cultivar.⁶⁸

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Per quanto riguarda il confronto tra i valori medi dei gruppi Controllo, AMF e SynCom coltivati su suolo *tillage*, non sono emerse differenze statisticamente significative. Tuttavia, si osserva un contenuto zuccherino mediamente più elevato nei gruppi trattati, in particolare nel gruppo AMF, con valore medio di 23,8 °Brix e nel gruppo SynCom, con valore medio di 23,5 °Brix, rispetto al Controllo, con un valore di 23,0 °Brix. Sebbene tali differenze non risultino supportate da significatività statistica, esse appaiono comunque degne di attenzione e potrebbero suggerire una tendenza positiva legata ai trattamenti biologici.

Un andamento analogo si riscontra nei campioni coltivati in suolo *no-tillage*. Anche in questo caso il gruppo Controllo presenta un valore medio più basso, pari a 21,3 °Brix, mentre AMF e SynCom mostrano valori leggermente superiori, rispettivamente pari a 21,6 e 21,7 °Brix. Tuttavia, anche in questa condizione, non sono state rilevate differenze statisticamente significative, e, pertanto, non è possibile attribuire con certezza un effetto diretto dei trattamenti biologici sul contenuto di solidi solubili.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

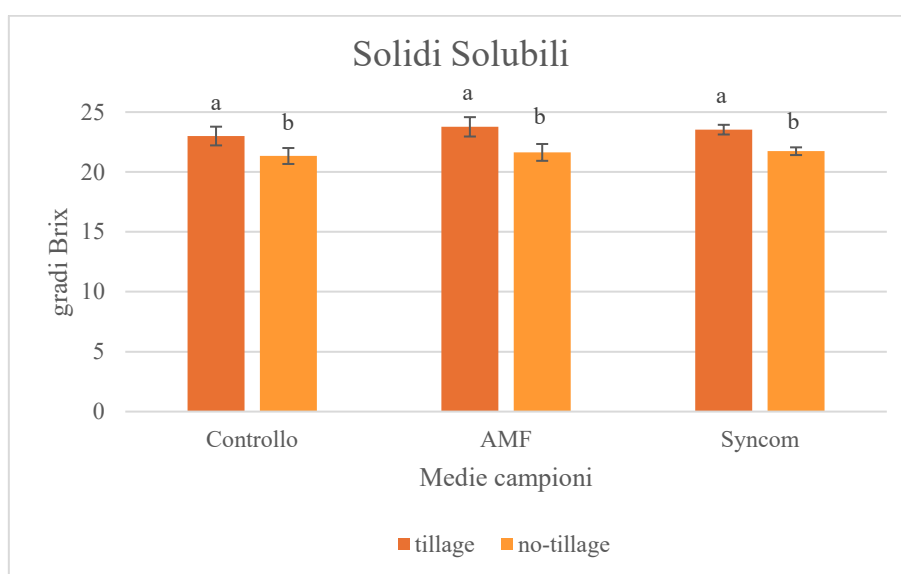


Figura 97: Valori medi di solidi solubili (espressi in °Brix) dei campioni in relazione ai metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*) suddivisi per trattamenti microbiologici (Controllo, AMF, SynCom).

Nella Figura 37 si osserva come i campioni coltivati nel campo lavorato, *tillage*, presentino un contenuto di solidi solubili significativamente superiore rispetto a quelli provenienti dal campo non lavorato, *no tillage*, indipendentemente dal trattamento biologico applicato. Questi risultati trovano riscontro in letteratura, dove in diversi casi è riportato un contenuto zuccherino inferiore nei vigneti gestiti in modalità *no-tillage*. Tuttavia, la correlazione tra *tillage* e incremento degli zuccheri non è sempre lineare: alcuni studi non hanno evidenziato differenze significative, suggerendo che i benefici della lavorazione emergano solamente in particolari condizioni ambientali o in specifiche annate.⁷¹

Analizzando nel dettaglio l'interazione tra trattamenti biologici e gestione del suolo, emerge che il valore medio dei solidi solubili nei campioni trattati con AMF in terreno *tillage* è pari a 23,6 °Brix, mentre nel terreno *no-tillage* scende a 21,7 °Brix, con una differenza di circa 2,2 °Brix.

Un andamento simile si osserva anche per il trattamento SynCom, con una differenza di circa 1,8 °Brix tra le due gestioni. Sebbene anche il gruppo Controllo mostri una riduzione nel passaggio da *tillage* a *no-tillage*, questa risulta più contenuta, con una riduzione di 1,7 °Brix.

Nel complesso, tali dati suggeriscono un possibile ruolo attivo di SynCom e AMF su questo parametro, in particolare nelle condizioni di suolo lavorato.

Gli studi disponibili sulla vite indicano che l'inoculo di AMF può influenzare il contenuto di solidi solubili totali in modo non sempre omogenea e fortemente dipendente dalle condizioni ambientali. Ad esempio, nella cultivar *Cabernet Sauvignon*, l'uva trattata con AMF ha mostrato un aumento dei valori di °Brix nel primo anno di sperimentazione, ma una riduzione nel secondo.⁷² Questi risultati suggeriscono che gli AMF possano effettivamente incidere sul contenuto zuccherino, ma che l'effetto sia modulato da altri fattori, come quelli genetici, ambientali e agronomici.

Per quanto riguarda le SynCom, al momento non sono disponibili riferimenti specifici al loro effetto sul contenuto zuccherino dei frutti. I dati ottenuti in questo studio rappresentano pertanto un primo contributo che integra parametri qualitativi, come i solidi solubili, nella valutazione dell'impatto delle comunità microbiche sintetiche sulla vite. In prospettiva di studi futuri, sarà utile ampliare le analisi includendo, oltre ai parametri qualitativi, anche quelli comunemente valutati quali resa, biomassa, resistenza alle malattie, al fine di ottenere una visione completa dell'impatto agronomico dei vari trattamenti biologici correlati con quelli del terreno.

Indice di maturazione

L'indice di maturazione, calcolato come rapporto tra solidi solubili, ovvero i °Brix, e l'acidità titolabile, rappresenta un parametro chiave per l'uva destinata alla vinificazione. Esso descrive infatti l'equilibrio tra componente zuccherina e acidità, ed è uno dei principali determinanti della qualità sensoriale percepita nel vino. In generale, valori più contenuti, compresi tra 30 e 40, sono considerati ideali per vini bianchi freschi e aromatici, mentre valori più elevati, intorno a 45-60, sono tipicamente associati a vini rossi più strutturati, come quelli ottenuti dal Nebbiolo.

L'analisi dei campioni ha evidenziato una variabilità significativa dell'indice di maturazione, con valori compresi tra 42,0 del campione 15 e 55,4 del campione 5, risultando complessivamente coerenti con l'intervallo atteso per la cultivar considerata.

Anche in questo caso l'analisi statistica ha permesso di distinguere più gruppi, come si può vedere dalla Tabella 8; tuttavia, tali differenze non risultano correlate ai trattamenti applicati, suggerendo che la variabilità osservata sia attribuibile ad altri fattori, quali le condizioni microambientali o il diverso grado di maturazione degli acini al momento del campionamento.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Confrontando i valori medi dell'indice di maturazione nei gruppi coltivati in suolo *tillage*, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i trattamenti; tuttavia, il gruppo AMF presenta un valore medio più elevato, nello specifico 53,7, rispetto ai gruppi SynCom e Controllo, valori rispettivamente pari a 48,7 e 48,0. Ciò suggerisce una possibile tendenza verso un maggior equilibrio zuccheri/acidità nei campioni micorrizzati, sebbene non supportata da significatività statistica.

Un andamento analogo si osserva nei campioni coltivati in suolo *no-tillage*, dove non si rilevano differenze significative tra i gruppi. Anche in questo caso, i trattamenti biologici mostrano valori medi leggermente superiori rispetto al Controllo: AMF registra un valore pari a 45,9 e SynCom 45,0 mentre il Controllo si attesta a 44,3.

Nel complesso, pur in assenza di differenze statisticamente significative, si evidenzia una tendenza costante nei trattamenti AMF, e in misura minore in quello con SynCom, a presentare un indice di maturazione più elevato rispetto al Controllo, suggerendo un potenziale effetto dei trattamenti sull'equilibrio tra contenuto zuccherino e acidità.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

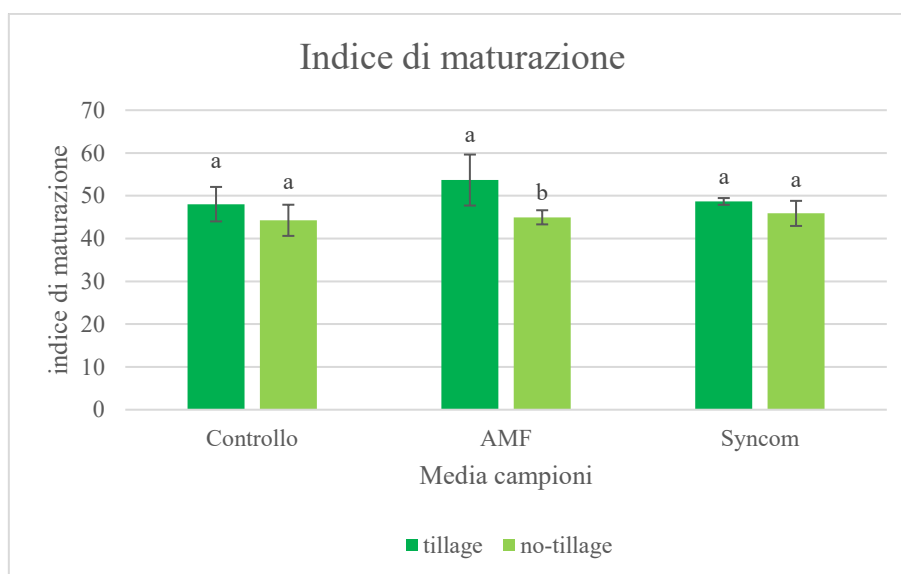


Figura 38: Valori medi dell'indice di maturazione dei campioni in relazione ai metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*) suddivisi per trattamenti microbiologici (Controllo, AMF, SynCom).

Il confronto tra i sistemi di gestione del suolo, riportato nella Figura 38, evidenzia un valore medio dell'indice di maturazione più elevato nel campo *tillage* rispetto al *no tillage*, rispettivamente 50,1 e 45,0.

Tale differenza risulta coerente con le tendenze precedentemente osservate per i solidi solubili (°Brix) e per l'acidità titolabile (TA). Tuttavia, nonostante questo scarto, i dati non evidenziano differenze statisticamente significative nei gruppi Controllo e SynCom.

Diversamente, nei campioni provenienti da viti trattate con AMF, si osserva una riduzione più marcata dell'indice di maturazione nel passaggio da *tillage* a *no-tillage*, pari a circa 7,8 punti. Questo andamento può essere attribuito all'effetto combinato di un maggior contenuto zuccherino in condizioni *tillage* e di una più elevata acidità titolabile nei *no-tillage*.

Tale risultato appare coerente con quanto discusso per i singoli parametri: la gestione *no-tillage*, favorendo la conservazione della rete miceliare, può influenzare l'assorbimento dei nutrienti e, indirettamente, il metabolismo della pianta, con ripercussioni sull'equilibrio tra zuccheri e acidi. Nel complesso, l'interazione tra gestione del suolo e trattamento AMF sembra incidere in modo più evidente sull'indice di maturazione rispetto agli altri trattamenti considerati.

4.2. Analisi della componente polifenolica

Per ottenere indicazioni sul contenuto di polifenoli totali, flavonoidi, antociani totali e monomerici, procianidine, nonché per valutare il potere antiossidante dell'uva analizzata, sono state eseguite specifiche analisi spettrofotometriche.

Per semplificare il confronto tra i campioni, tutti i risultati sono stati espressi in mg/mL riferiti all'estratto, anziché in mg/g di sostanza secca come comunemente riportato in letteratura. Tale scelta metodologica è giustificata dal fatto che i valori di umidità nei campioni risultano tra loro comparabili, rendendo quindi appropriato l'utilizzo di un'espressione dei dati riferita direttamente all'estratto, senza introdurre distorsioni nell'interpretazione dei risultati.

Polifenoli totali

Tabella 9: Contenuto in polifenoli totali, espressi in mg di acido gallico / mL di estratto; lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Conduzione del suolo	Polifenoli totali
1-SynCom	Tillage	0,68± 0,04 ^{gh}
2-Controllo	Tillage	0,67± 0,01 ^j
3-AMF	Tillage	0,74± 0,04 ^{defg}
4-AMF	Tillage	0,71± 0,03 ^{efgh}
5-SynCom	Tillage	0,74± 0,01 ^{efghij}
6-Controllo	Tillage	0,69± 0,02 ^{fgh}
7-Controllo	Tillage	0,77± 0,02 ^{cdef}
8-AMF	Tillage	0,72± 0,02 ^{defgh}
9-SynCom	Tillage	0,78± 0,01 ^{cdef}
10-SynCom	No Tillage	0,68± 0,03 ^{fgh}
11-Controllo	No Tillage	0,94± 0,01 ^a
12-AMF	No Tillage	0,80± 0,01 ^{bcd}
13-AMF	No Tillage	0,76± 0,05 ^{defg}
14-SynCom	No Tillage	0,77± 0,06 ^{cdef}
15-Controllo	No Tillage	0,64± 0,02 ^h
16-Controllo	No Tillage	0,85± 0,02 ^{abc}
17-AMF	No Tillage	0,81± 0,01 ^{bcd}
18-SynCom	No Tillage	0,87± 0,01 ^{ab}

Nella Tabella 9 sono riportati i risultati dell'analisi quantitativa dei polifenoli totali, espressi come mg di acido gallico per mL di estratto. Le analisi hanno evidenziato una marcata variabilità tra i campioni, riconducibile alle differenti combinazioni di trattamento biologico e gestione del suolo.

Le concentrazioni rilevate variano da un minimo di 0,64 mg/mL del campione 15, appartenente al gruppo di Controllo, ad un massimo di 0,94 mg/mL del campione 11, sempre facente parte del gruppo Controllo, indicando un'ampia dispersione di valori all'interno del dataset. Nonostante ciò, i dati ottenuti risultano coerenti con quanto riportato in letteratura per estratti ottenuti con metodiche simili³⁷, presentando anzi un contenuto polifenolico leggermente superiore. Il valore massimo osservato può essere attribuito ad una maggior esposizione delle radiazioni UV e a condizioni di stress idrico, fattori noti per stimolare la sintesi di metaboliti secondari, tra cui i composti fenolici.

Il gruppo Controllo mostra la più elevata variabilità interna, includendo sia il valore minimo, sia quello massimo dell'intero insieme di campioni. Tale dispersione appare particolarmente accentuata nei campioni provenienti dal suolo non lavorato, *no-tillage*, probabilmente a causa di una maggior eterogeneità intraterreno e di una minor uniformità del suolo in assenza di lavorazioni meccaniche.

Al contrario, i campioni trattati con inoculo di funghi micorrizici arbuscolari, AMF, presentano una maggior omogeneità, collocandosi in un intervallo più ristretto, compreso tra 0,71 e 0,81 mg/mL, suggerendo una possibile stabilizzazione del metabolismo fenolico indotta dalla simbiosi micorrizica.

Per quanto riguarda il trattamento SynCom, i dati evidenziano una buona uniformità tra i campioni, ad eccezione del campione 18 che risulta statisticamente differente rispetto agli altri.

Attualmente non sono ancora disponibili in letteratura studi specifici sull'effetto dell'inoculo di SynCom applicato alla vite. Tuttavia, ricerche condotte su altre specie vegetali forniscono indicazioni interessanti. In uno studio recente, l'applicazione di una comunità microbica sintetica su *Salvia miltiorrhiza*, una pianta medicinale, ha portato ad un significativo aumento nella produzione di acidi fenolici, in particolare acido rosmarinico e acido salvianolico. Tale effetto è stato associato sia a una maggiore resistenza alle patologie, sia alla stimolazione diretta della via biosintetica dei composti fenolici.⁷⁴

Analogamente, un'altra ricerca ha riportato che l'inoculazione di una SynCom composta da ceppi di *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* su *Malus hupehensis*, ossia una varietà di melo, ha determinato un incremento della sintesi di polifenoli nei frutti.⁷³

Sebbene questi risultati provengano da colture differenti rispetto alla vite, essi appaiono promettenti e suggeriscono che l'impiego di SynCom potrebbe rappresentare una strategia sostenibile per migliorare il profilo polifenolico anche in frutti come l'uva, aprendo prospettive interessanti per ulteriori approfondimenti sperimentali.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Sono stati analizzati i valori medi dei campioni provenienti da suolo lavorato, *tillage*, suddivisi in base ai trattamenti biologici, ossia Controllo, AMF, SynCom. I risultati mostrano valori leggermente superiori nei campioni trattati con AMF e SynCom, rispettivamente 0,72 mg/mL e 0,73 mg/mL, rispetto al gruppo di Controllo, il quale presenta un valore di 0,71 mg/mL. Poiché tali differenze non risultano statisticamente significative, non è possibile attribuire ai trattamenti biologici un effetto positivo certo sul contenuto di polifenoli totali in queste condizioni.

Per quanto riguarda le medie dei campioni provenienti dal suolo non lavorato, *no-tillage*, si osserva un andamento opposto: il gruppo Controllo presenta il valore medio più elevato, pari a 0,81 mg/mL, mentre i gruppi AMF e SynCom mostrano valori leggermente inferiori, pari a 0,79 mg/mL. Anche in questo caso, tuttavia, l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i trattamenti.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

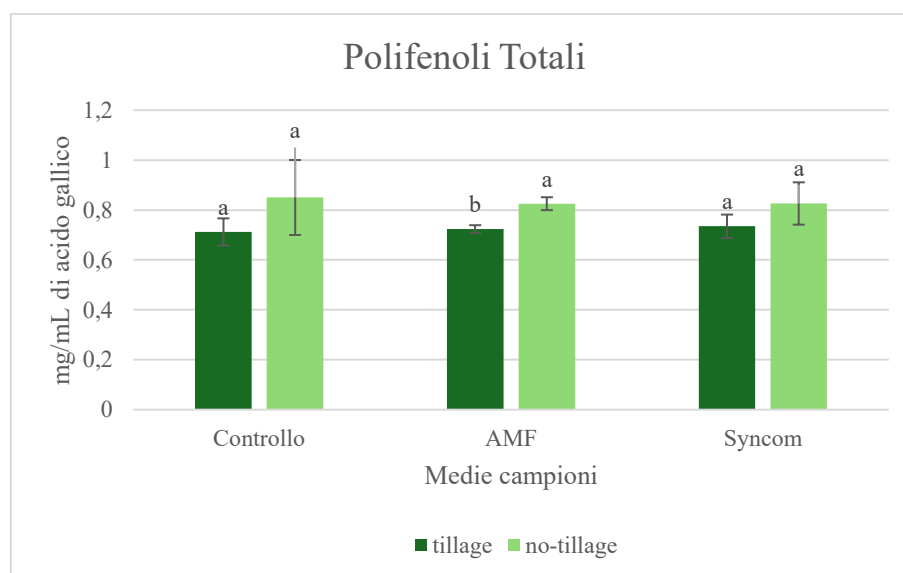


Figura 109: Valori medi di polifenoli totali in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e ai metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*). Lettere diverse evidenziano differenze significative ($p < 0,05$) tra *tillage* e *no tillage* per ogni trattamento microbiologico.

Dalla Figura 39 emerge che i campioni provenienti da suolo non lavorato, *no-tillage* presentano, per ciascun trattamento, valori medi di polifenoli totali più elevati, intorno a 0,80 mg/mL rispetto a quelli coltivati in un suolo lavorato, *tillage*, che si attestano a valori di 0,72 mg/mL. Questo dato suggerisce un possibile incremento della sintesi fenolica nella porzione di vigneto non lavorata, un fenomeno parzialmente confermato dalla letteratura.

Recenti studi sui sistemi *no-tillage* associati all'impiego di *cover crop*, ossia colture di copertura non destinate alla produzione commerciale, hanno evidenziato un aumento della concentrazione dei composti fenolici fino al 30-40%. Tale incremento potrebbe essere attribuito a una maggior competizione idrica e nutrizionale tra le piante, in grado di indurre una condizione di stress fisiologico che stimola la sintesi di metaboliti secondari.⁷¹

Al contrario, in alcune varietà, come *Chardonnay*, è stata la lavorazione del suolo a determinare un incremento dei composti polifenolici, probabilmente in risposta allo stress indotto dalla maggior ossigenazione del terreno conseguente alla manipolazione meccanica. Tuttavia, in altre varietà coltivate nelle medesime condizioni pedoclimatiche, come *Xynisteri*, non si sono registrate variazioni significative nel contenuto fenolico.⁷⁵ Nel complesso, gli autori di questa sperimentazione concordano sul fatto che il contenuto di composti fenolici dipenda non solo dalla gestione del suolo, ma anche e soprattutto, da fattori climatici, dall'annata e dalla specifica cultivar.

È interessante notare che l'unico confronto che ha evidenziato una differenza statisticamente significativa riguarda i campioni trattati con AMF tra campo non lavorato e lavorato. Questo risultato trova supporto in letteratura, dove si attribuisce agli AMF un effetto stabilizzante sulla produzione e la qualità dell'uva.⁶¹ Inoltre, il dato conferma quanto discusso nell'articolo citato, in cui viene specificato che l'inoculo di AMF tende ad avere maggior successo in suoli meno disturbati meccanicamente, che consentono il mantenimento dell'integrità dell'apparato radicale e lo sviluppo ottimale della rete miceliare.

Flavonoidi

I flavonoidi rappresentano una classe di polifenoli di fondamentale importanza sia dal punto di vista sensoriale (colore, gusto e aroma), sia da quello tecnologico, in quanto contribuiscono alla stabilità del vino. La loro classificazione è stata approfondita nel paragrafo 3.3.2.

Tabella 10: Contenuto in flavonoidi totali espressi in mg di catechina / mL di estratto; lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	Flavonoidi Totali
1-SynCom	Tillage	0,19± 0,01 ^{bcdef}
2-Controllo	Tillage	0,20± 0,02 ^{bcd}
3-AMF	Tillage	0,20± 0,03 ^{bcd}
4-AMF	Tillage	0,14± 0,01 ^g
5-SynCom	Tillage	0,23± 0,02 ^{ab}
6-Controllo	Tillage	0,16± 0,02 ^{efg}
7-Controllo	Tillage	0,14± 0,01 ^g
8-AMF	Tillage	0,16± 0,01 ^{fg}
9-SynCom	Tillage	0,22± 0,01 ^{cdef}
10-SynCom	No Tillage	0,68± 0,0 ^{abc}
11-Controllo	No Tillage	0,16± 0,01 ^{efg}
12-AMF	No Tillage	0,20± 0,01 ^{bcdef}
13-AMF	No Tillage	0,18± 0,0 ^{cdef}
14-SynCom	No Tillage	0,17± 0,01 ^{defg}
15-Controllo	No Tillage	0,20± 0,02 ^{bcdef}
16-Controllo	No Tillage	0,22± 0,01 ^{abc}
17-AMF	No Tillage	0,21± 0,01 ^{bc}
18-SynCom	No Tillage	0,25± 0,02 ^{bc}

La quantificazione è stata effettuata utilizzando il saggio dell'alluminio cloruro e in Tabella 10 sono riportati i risultati espressi come mg di catechina per mL di estratto.

Le concentrazioni rilevate variano da un minimo di 0,14 mg/mL dei campioni 4 e 7 ad un massimo di 0,25 mg/mL del campione 18. Nel complesso, la maggior parte dei valori risulta piuttosto omogenea, con alcune eccezioni. I dati ottenuti sono anche in questo caso coerenti con quanto riportato in letteratura per estratti ottenuti con metodologie simili.³⁷

Il gruppo Controllo mostra una variabilità interna moderata, incluso in un intervallo compreso tra 0,14 e 0,21 mg/mL di estratto.

Tale variabilità è presente in entrambi i sistemi di gestione del suolo, dato interessante se confrontato con quanto osservato per i polifenoli totali, per i quali nel suolo *tillage* si era evidenziata una minor dispersione dei valori.

Il gruppo AMF mostra una bassa variabilità in entrambe le condizioni di gestione del suolo. L'analisi statistica presenta differenze numeriche tra i campioni, ma non significative dal punto di vista statistico. In particolare, nel sistema *tillage* i valori risultano più omogenei rispetto al gruppo Controllo, suggerendo una possibile stabilizzazione della produzione di flavonoidi indotta dalla micorrizzazione.

Infine, il gruppo SynCom mostra un valore medio leggermente superiore rispetto al Controllo, attestandosi intorno a 0,18 mg/mL, pur senza evidenziare differenze statisticamente significative.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Confrontando i valori medi dei gruppi coltivati in suolo *tillage*, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i trattamenti. Il gruppo di Controllo presenta il valore medio più basso (0,17 mg/mL), mentre il gruppo AMF registra il valore medio più elevato (0,19 mg/mL); il gruppo SynCom si colloca in posizione intermedia (0,18 mg/mL).

Sebbene tali differenze non siano supportate da significatività statistica, i risultati possono essere incoraggianti per entrambi i trattamenti biologici, AMF e SynCom. Tuttavia, la variabilità interna osservata suggerisce una limitata ripetibilità delle repliche biologiche, aspetto che meriterebbe ulteriori approfondimenti sperimentali.

Un andamento analogo si riscontra nei campioni coltivati nel suolo *no-tillage*, dove non sono state rilevate differenze significative tra i gruppi. In questo caso, il gruppo SynCom risulta il più ricco di flavonoidi, con un valore medio di 0,21 mg/mL, mostrando anche una bassa variabilità interna. Il gruppo AMF presenta un valore medio pari a 0,20 mg/mL, superiore rispetto al Controllo, con un valore di 0,19 mg/mL, pur evidenziando una maggior dispersione dei valori tra i campioni.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

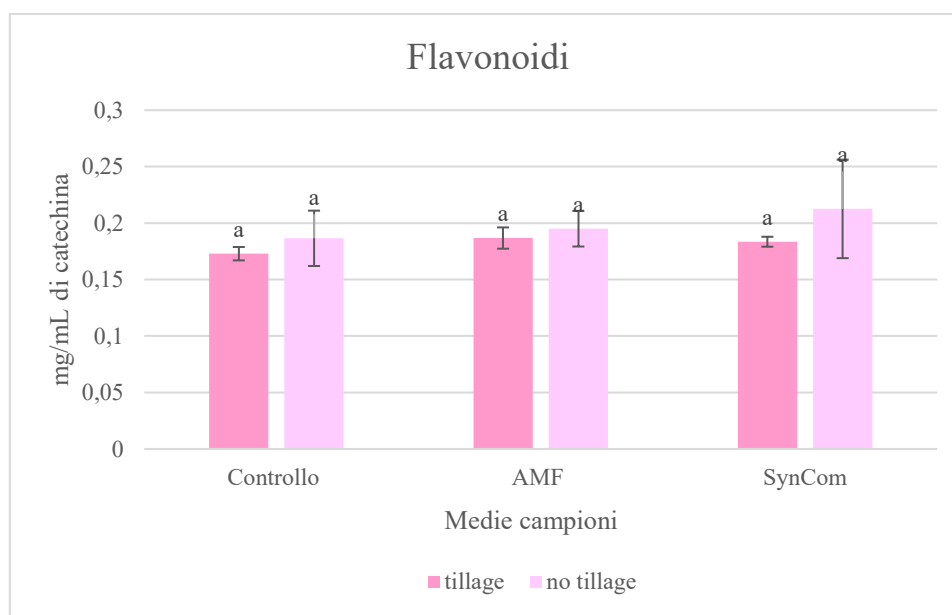


Figura 40: Valori medi di flavonoidi in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

Nella Figura 40 è riportato il confronto tra i campioni provenienti da suolo lavorato, *tillage*, e quelli da suolo non lavorato, *no-tillage*. I valori medi dei flavonoidi risultano leggermente superiori nei campioni *no-tillage*, con un valore medio di 0,19 mg/mL, rispetto a quelli *tillage*, aventi un valore medio di 0,18 mg/mL, per tutti i trattamenti, ossia Controllo, AMF e SynCom, sebbene queste differenze non siano statisticamente significative. Questa tendenza suggerisce comunque un potenziale vantaggio della gestione non lavorata del suolo, che potrebbe favorire un maggior accumulo di flavonoidi.⁷¹

La differenza osservata nel trattamento con AMF può essere attribuita a una recente introduzione dell'inoculo, circa sei mesi prima della vendemmia, in un vigneto con circa 10 anni di impianto.

I risultati sono coerenti con la letteratura, che evidenzia come i funghi micorrizici arbuscolari (AMF) necessitino di condizioni tipiche del *no-tillage* per integrarsi efficacemente nell'apparato radicale. In alcuni studi, l'inoculo di AMF ha determinato un incremento di flavonoli, flavan-3-oli e antociani, ovvero molecole appartenenti alla classe dei flavonoidi, con effetti particolarmente evidenti nella prima annata, durante la quale è stato osservato anche un aumento significativo della quercetina-glucoronide, oltre che delle altre molecole analizzate. Nell'annata successiva, pur registrandosi ancora un incremento, l'effetto è risultato meno marcato, suggerendo che la variabilità sia maggiormente influenzata dall'annata piuttosto che dal trattamento stesso.⁷⁶

Per quanto riguarda il gruppo SynCom, la letteratura disponibile è ancora limitata; tuttavia, alcuni studi suggeriscono un possibile aumento dei composti fenolici e delle antocianidine, sottogruppo dei flavonoidi, in seguito all'applicazione di comunità microbiche sintetiche, ad esempio, in *Salvia mitiorrhiza*.⁷⁴

Antociani Totali e Monomerici

Gli antociani costituiscono un parametro fondamentale per la valutazione della qualità cromatica dell'uva destinata alla vinificazione. Durante il processo di vinificazione, questi composti vengono estratti dalla buccia e trasferiti al mosto, dove vanno incontro a diverse trasformazioni chimiche che influenzano direttamente l'intensità, la tonalità e la stabilità del colore nel tempo. Oltre al loro ruolo nella determinazione del colore, gli antociani contribuiscono in modo significativo anche al profilo organolettico e al potere antiossidante del prodotto finale.

Nel presente studio sono stati determinati in due categorie:

- Antociani totali, che rappresentano il contenuto complessivo di tutte le forme presenti nel campione, comprese quelle polimeriche o legate ad altri composti;
- Antociani monomerici, che indicano la frazione libera e non polimerizzata, responsabile della colorazione immediata e caratterizzata da un'attività antiossidante diretta.

Tabella 11: Contenuto di antociani totali e monomerici espressi in mg di C3GE/mL; per ogni colonna lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	Antociani totali	Antociani monomerici
1-SynCom	Tillage	$0,11 \pm 0,01^g$	$0,11 \pm 0,01^f$
2-Controllo	Tillage	$0,12 \pm 0,01^{fg}$	$0,12 \pm 0,01^{def}$
3-AMF	Tillage	$0,14 \pm 0,01^{efg}$	$0,14 \pm 0,01^{cde}$
4-AMF	Tillage	$0,15 \pm 0,01^{de}$	$0,14 \pm 0,01^{cde}$
5-SynCom	Tillage	$0,15 \pm 0,01^{cde}$	$0,14 \pm 0,01^{cde}$
6-Controllo	Tillage	$0,15 \pm 0,01^{def}$	$0,14 \pm 0,01^{bcde}$
7-Controllo	Tillage	$0,14 \pm 0,00^{def}$	$0,13 \pm 0,00^{def}$
8-AMF	Tillage	$0,14 \pm 0,00^{def}$	$0,12 \pm 0,01^{def}$
9-SynCom	Tillage	$0,16 \pm 0,01^{bcde}$	$0,14 \pm 0,01^{cde}$
10-SynCom	No Tillage	$0,16 \pm 0,01^{bcde}$	$0,14 \pm 0,01^{cde}$
11-Controllo	No Tillage	$0,17 \pm 0,01^{bcd}$	$0,15 \pm 0,01^{bcd}$
12-AMF	No Tillage	$0,15 \pm 0,02^{def}$	$0,13 \pm 0,01^{def}$
13-AMF	No Tillage	$0,15 \pm 0,00^{cde}$	$0,13 \pm 0,01^{def}$
14-SynCom	No Tillage	$0,16 \pm 0,00^{bcde}$	$0,14 \pm 0,00^{bcde}$
15-Controllo	No Tillage	$0,13 \pm 0,00^{efg}$	$0,12 \pm 0,00^{ef}$
16-Controllo	No Tillage	$0,18 \pm 0,01^{bc}$	$0,17 \pm 0,01^{bc}$
17-AMF	No Tillage	$0,18 \pm 0,01^b$	$0,17 \pm 0,01^{ab}$
18-SynCom	No Tillage	$0,22 \pm 0,01^a$	$0,20 \pm 0,01^a$

Osservando la Tabella 11 emerge innanzitutto come i valori degli antociani totali e monomerici risultino molto simili tra loro e, in alcuni casi, quasi sovrapponibili. Questo dato è coerente con la tipologia di campioni analizzati, trattandosi di uva appena raccolta, nella quale i processi di copigmentazione risultano ancora limitati. Inoltre, i valori ottenuti sono in linea con quanto riportato in letteratura per il Nebbiolo, cultivar nota per il suo profilo relativamente povero di antociani.⁸¹

Per entrambi i parametri, il valore minimo rilevato è pari a 0,11 mg/mL del campione 1, mentre il valore massimo risulta essere 0,22 mg/mL per gli antociani totali e di 0,20 mg/mL per gli antociani monomerici, entrambi riferiti al campione 18. L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative solamente in alcuni campioni a valori estremi, mentre la maggior parte dei dati non presenta scostamenti statisticamente rilevanti.

I campioni del gruppo Controllo mostrano una marcata variabilità nel contenuto di antociani: per gli antociani totali i valori sono compresi tra 0,12 e 0,18 mg/mL, mentre per quelli monomerici tra 0,12 e 0,16 mg/mL. Ciò suggerisce che, in assenza di trattamenti biologici, la pianta sia comunque in grado di accumulare antociani ma in modo meno stabile e prevedibile, poiché tali composti sono fortemente influenzati dalle condizioni pedoclimatiche.

I campioni trattati con AMF evidenziano, rispetto al controllo, una certa omogeneità interna, mentre i campioni trattati con SynCom mostrano una variabilità più accentuata, indicando una risposta meno uniforme al trattamento.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Confrontando i valori medi dei gruppi coltivati in un suolo non lavorato, *no-tillage*, suddivisi in base ai trattamenti Controllo, AMF e SynCom, per quanto riguarda gli antociani totali, il gruppo SynCom presenta un valore medio leggermente superiore, pari a 0,18 mg/mL, rispetto ai gruppi AMF e Controllo, entrambi a 0,16 mg/mL. Tuttavia, tale differenza non risulta statisticamente significativa. Anche per gli antociani monomerici si osserva un andamento simile: SynCom registra un valore medio di 0,16 mg/mL, AMF di 0,15 mg/mL e il Controllo di 0,13 mg/mL.

Per quanto riguarda i campioni provenienti dal suolo *tillage*, si sono rilevati valori medi intorno a 0,15 mg/mL nell'analisi degli antociani totali, senza evidenziare differenze statisticamente significative. La stessa tendenza si osserva per gli antociani monomerici, che mostrano valori medi pari a circa 0,13 mg/mL per ciascun trattamento.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

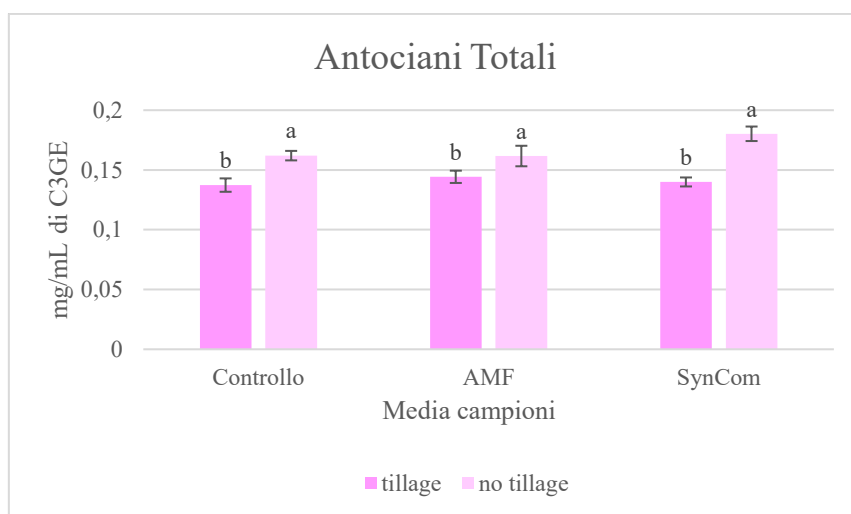


Figura 41: Valori medi di antociani totali in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

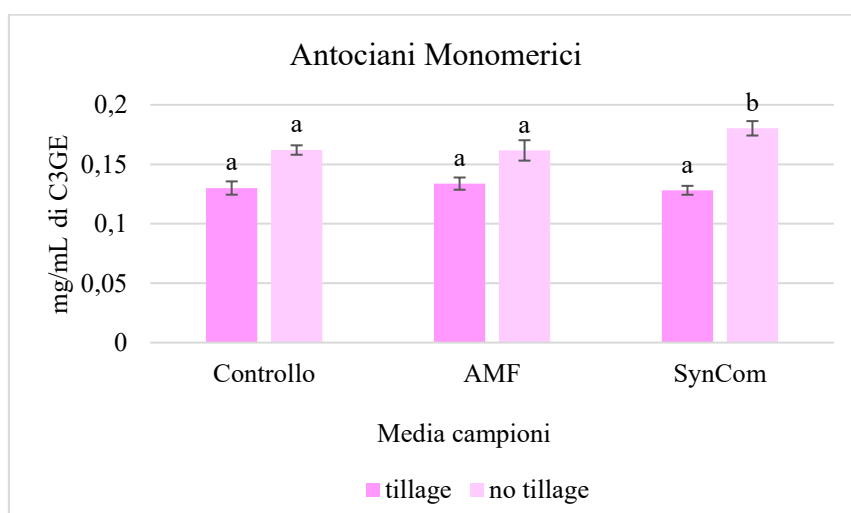


Figura 42: Valori medi di antociani monomerici in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

Dal confronto tra suolo *tillage* e suolo *no-tillage*, riportato in Figura 41, emerge una differenza significativa a favore del *no-tillage*, evidenziata dalla media complessiva dei diversi trattamenti, 0,17 mg/mL contro un valore di 0,14 mg/mL. La stessa tendenza si osserva in Figura 42, ossia con i dati di antociani monomerici, con valori medi pari a 0,15 mg/mL nel *no-tillage* e 0,13 mg/mL nel *tillage*.

Questi risultati suggeriscono un possibile effetto positivo della gestione non lavorata del suolo sulla sintesi dei metaboliti secondari, aspetto già emerso nei saggi precedenti.

Tuttavia, la letteratura riporta dati non univoci: numerosi studi, condotti sia in Italia sia all'estero, indicano che l'effetto del *no-tillage*, associato a *cover crop*, sulla sintesi degli antociani è altamente variabile e dipende da molteplici fattori, tra cui condizioni pedoclimatiche, annata e genotipo. In alcune ricerche è stato evidenziato come pratiche agronomiche non convenzionali, tra cui la pacciamatura con leguminose o l'inerbimento, possano influenzare positivamente la sintesi degli antociani nel medio-lungo termine, mentre nel breve periodo gli effetti risultano meno evidenti. Ciò è attribuibile alla necessità di una progressiva modificazione delle condizioni del suolo e della risposta fisiologica della vite.^{82, 83}

Nel complesso, il trattamento AMF sembra stimolare l'accumulo di antociani in modo più consistente rispetto al controllo, sebbene con una certa variabilità tra le repliche. Questo dato potrebbe indicare una risposta non completamente stabile della pianta, come riportato anche in letteratura. In alcuni studi condotti sulla *cultivar Merlot*, l'inoculo di AMF non ha modificato il contenuto totale di antociani delle bacche, ma è stata osservata una correlazione positiva tra il grado di colonizzazione micorrizica e la concentrazione di specifiche molecole, in particolare cianidine e peonidine. Tuttavia, nello stesso studio è stato evidenziato come il contenuto in antocianine sia maggiormente influenzato dallo stato idrico e dall'annata piuttosto che dal trattamento biologico.^{70, 72}

I dati ottenuti suggeriscono inoltre che le comunità microbiche sintetiche (SynCom) possano esercitare un effetto positivo e potenzialmente più riproducibile sull'accumulo degli antociani, ipotesi supportata anche dalla letteratura. Uno studio condotto sulle fragole ha mostrato che l'inoculo con batteri promotori della crescita vegetale determina un aumento della concentrazione di antociani, attribuito alla modulazione dell'espressione di un enzima chiave nella loro biosintesi, la fenilalanina ammonio-liasi (PAL). Inoltre, tali microrganismi possono migliorare la disponibilità di nutrienti e influenzare il bilancio ormonale della pianta, creando condizioni favorevoli all'accumulo di metaboliti secondari.⁸⁴

Proantocianidine

Le proantocianidine, note anche come tannini condensati, appartengono alla classe dei flavonoidi polimerici e sono costituite da unità di flavan-3-oli legate tra loro attraverso specifici legami interflavinici.

Dal punto di vista enologico, questi composti rivestono un ruolo fondamentale: contribuiscono alla sensazione di astringenza e alla struttura del vino, partecipano ai processi di stabilizzazione del colore durante l'invecchiamento e possiedono un marcato potere antiossidante.

La loro quantificazione è stata effettuata mediante il saggio DMAC (p-dimetilamino cinnamaldeide), un metodo particolarmente sensibile nei confronti dei monomeri e degli oligomeri a basso grado di polimerizzazione, ovvero le procianidine. Tale saggio risulta meno efficace nella determinazione dei polimeri più complessi, che sono tipicamente presenti nei vini sottoposti a lunghi periodi di invecchiamento.

Tabella 12: Concentrazioni di proantocianidine espresse in mg di catechina / mL di estratto; per ogni colonna lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	Proantocianidine
1-SynCom	Tillage	$0,16 \pm 0,01^f$
2-Controllo	Tillage	$0,17 \pm 0,01^{ef}$
3-AMF	Tillage	$0,16 \pm 0,00^f$
4-AMF	Tillage	$0,17 \pm 0,02^{cdef}$
5-SynCom	Tillage	$0,18 \pm 0,01^{def}$
6-Controllo	Tillage	$0,15 \pm 0,01^f$
7-Controllo	Tillage	$0,19 \pm 0,01^{bcde}$
8-AMF	Tillage	$0,17 \pm 0,00^{def}$
9-SynCom	Tillage	$0,17 \pm 0,00^{def}$
10-SynCom	No Tillage	$0,18 \pm 0,00^{cdef}$
11-Controllo	No Tillage	$0,26 \pm 0,00^a$
12-AMF	No Tillage	$0,20 \pm 0,00^{bcd}$
13-AMF	No Tillage	$0,20 \pm 0,01^{bcd}$
14-SynCom	No Tillage	$0,22 \pm 0,06^b$
15-Controllo	No Tillage	$0,16 \pm 0,00^f$
16-Controllo	No Tillage	$0,25 \pm 0,02^a$
17-AMF	No Tillage	$0,21 \pm 0,01^b$
18-SynCom	No Tillage	$0,22 \pm 0,01^b$

I risultati del saggio DMAC, riportati nella Tabella 12, evidenziano una marcata variabilità tra i campioni analizzati: il valore massimo è pari a 0,26 mg/mL relativo al campione 11, mentre il minimo è rappresentato dal campione 6 con un valore di 0,15 mg/mL. Questa variabilità è stata confermata anche dall'analisi statistica.

Nel complesso, i valori ottenuti risultano inferiori a quelli riportati in letteratura, i quali riportano valori di 0,5-4 mg/mL, soprattutto considerando che l'uva Nebbiolo è nota per essere particolarmente ricca in proantocianidine. Tale discrepanza potrebbe essere attribuita al diverso protocollo di estrazione adottato: nello studio citato, infatti, è stato utilizzato come solvente il metanolo ad una percentuale più elevata; il metanolo è un solvente generalmente più efficace nell'estrazione delle proantocianidine.⁸⁵

Il gruppo Controllo mostra un'elevata variabilità interna, con un range compreso tra 0,15 e 0,26 mg di catechina equivalenti/mL di estratto. Questa tendenza risulta particolarmente accentuata nei campioni provenienti dal suolo *no-tillage*, dove si osservano nei campioni 11 e 16 i due valori più elevati di tutto il dataset. Al contrario, il campione 15 presenta uno dei valori più bassi, pari a 0,16 mg/mL.

Il gruppo AMF evidenzia invece una bassa variabilità sia in condizioni di *tillage* sia di *no-tillage*, con valori medi simili a quelli del Controllo.

Il gruppo SynCom, analogamente al Controllo, è caratterizzato da una certa disomogeneità: i campioni 14 e 18 mostrano valori più elevati e simili, circa 0,22 mg/mL, mentre il campione 10 presenta un valore più contenuto, 0,18 mg/mL, comparabile a quelli osservati nei campioni *no-tillage*.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Dal confronto dei valori medi dei gruppi Controllo, AMF e SynCom coltivati in suolo *tillage* non emergono differenze statisticamente significative. Tutti e tre i trattamenti presentano lo stesso valore medio, pari a 0,17 mg di catechina per mL di estratto, indicando un'assenza di effetto specifico dei trattamenti in questa condizione di gestione del suolo.

Anche per il confronto tra i valori medi dei campioni coltivati in un suolo *no-tillage* non sono state riscontrate differenze statisticamente significative, poiché i valori medi risultano molto simili tra loro: 0,22 mg/mL per il gruppo Controllo, 0,21 mg/mL per il gruppo AMF e 0,20 mg/mL per il gruppo SynCom.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che i trattamenti biologici applicati non abbiano determinato variazioni rilevanti nel contenuto di proantocianidine a parità di tempo di maturazione.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

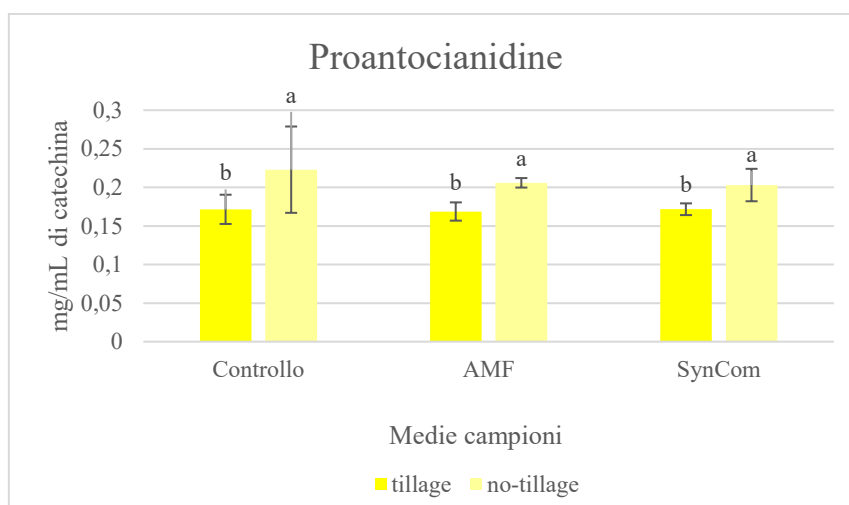


Figura 43: Valori medi di proantocianidine in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e ai metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

Dal confronto tra i campioni coltivati in *tillage* e *no-tillage*, riportato in Figura 43, emergono differenze statisticamente significative. In particolare, il suolo non lavorato determina valori medi più elevati per tutti i trattamenti: la media complessiva passa infatti da 0,17 mg/mL nel *tillage* a 0,21 mg/mL nel *no-tillage*.

Questo risultato suggerisce un effetto positivo della gestione conservativa del suolo sull'accumulo di proantocianidine. Sebbene in letteratura siano limitati gli studi specificamente focalizzati sulle proantocianidine in sistemi *no-tillage*, diverse ricerche riportano che pratiche di gestione conservativa possono favorire, più in generale, la sintesi dei composti fenolici. Ad esempio, in studi condotti sulla varietà di uva *Royal* è stato osservato un incremento del contenuto totale di composti fenolici in condizioni di gestione meno invasiva del suolo, suggerendo un possibile effetto positivo anche sui tannini.⁷⁶ Nel complesso, i dati ottenuti sembrano confermare che il *no-tillage* possa creare condizioni favorevoli all'accumulo di metaboliti secondari, tra cui le proantocianidine, probabilmente attraverso una modulazione dello stato nutrizionale e dello stress fisiologico della pianta.

Attività antiradicalica

La valutazione dell'attività antiradicalica del campione è stata effettuata utilizzando due saggi spettrofotometrici:

- il metodo di quenching del radicale *2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico)* (ABTS^{•+})
- il test di neutralizzazione di un radicale libero (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*, DPPH[•]).

Tabella 13: Attività antiossidante, determinata con metodi ABTS e DPPH, dati espressi in mg di TE per mL di estratto; per ogni colonna lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	ABTS	DPPH
1-SynCom	Tillage	1,21± 0,04 ^f	1,36±94,6 ^{bc}
2-Controllo	Tillage	1,58± 0,01 ^{bcd}	1,31±91,47 ^c
3-AMF	Tillage	1,32±0,04 ^{def}	1,47±54,4 ^{abc}
4-AMF	Tillage	1,48± 0,03 ^{cdef}	1,54±54,8 ^{abc}
5-SynCom	Tillage	1,48±0,01 ^{cdef}	1,53±148,9 ^{abc}
6-Controllo	Tillage	1,22±0,02 ^{ef}	1,61±107,2 ^{ab}
7-Controllo	Tillage	1,61±0,01 ^{bcd}	1,38±91,5 ^{bc}
8-AMF	Tillage	1,52±0,02 ^{bcd}	1,39±72,5 ^{bc}
9-SynCom	Tillage	1,57± 0,01 ^{bcd}	1,35±113,2 ^{bc}
10-SynCom	No Tillage	1,55± 0,01 ^{bcd}	1,41±128,7 ^{bc}
11-Controllo	No Tillage	2,05± 0,00 ^a	1,69±27,4 ^a
12-AMF	No Tillage	1,81± 0,01 ^{ab}	1,54±25,9 ^{abc}
13-AMF	No Tillage	1,62± 0,01 ^{bcd}	1,36±92,6 ^{bc}
14-SynCom	No Tillage	1,63± 0,01 ^{bc}	1,45±53,6 ^{abc}
15-Controllo	No Tillage	1,49± 0,02 ^{cdef}	1,28±53,6 ^c
16-Controllo	No Tillage	1,75± 0,02 ^{abc}	1,37±77,0 ^{bc}
17-AMF	No Tillage	1,63± 0,01 ^{bc}	1,29±34,9 ^c
18-SynCom	No Tillage	1,70± 0,01 ^{bc}	1,44±117,5 ^{abc}

Attività radicalica analizzata mediante il saggio ABTS

Per quanto riguarda i risultati nel test dell'ABTS, i risultati, presentati in Tabella 13, evidenziano una discreta variabilità tra i campioni analizzati. Il valore massimo rilevato è pari a 2,05 mg/mL del campione 11, mentre il minimo è di 1,21 mg/mL rappresentato dal campione 1. Le differenze tra questi valori estremi risultano statisticamente significative, mentre la maggior parte dei campioni presenta dati relativamente omogenei.

I valori ottenuti sono coerenti con quanto riportato in letteratura, dove per l'uva è indicato un intervallo compreso tra 0,7 e 2 mg TE/mL di estratto, in funzione delle condizioni sperimentali adottate.⁷⁷

Il gruppo Controllo mostra un'elevata variabilità interna, con valori compresi tra 1,22 e 2,01 mg/mL. Tale variabilità risulta particolarmente marcata nei campioni provenienti dal suolo *no-tillage*, probabilmente a causa della minor omogeneità del terreno, che può determinare differenze nella disponibilità di nutrienti e nell'assorbimento radicale.

Al contrario, i campioni trattati con AMF evidenziano una buona uniformità in entrambe le modalità di gestione del suolo. Anche il gruppo SynCom mostra una variabilità contenuta, soprattutto nei campioni coltivati in *no-tillage*, suggerendo una risposta più stabile al trattamento in condizioni di suolo non lavorato.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

I campioni provenienti da suolo lavorato, *tillage*, sono stati suddivisi in tre gruppi in base ai trattamenti applicati, ossia Controllo, AMF e SynCom. Le medie dei valori ottenuti risultano piuttosto omogenee: il gruppo Controllo presenta un valore pari a 1,47 mg/mL, leggermente superiore rispetto al gruppo AMF, di 1,44 mg/mL, e al gruppo SynCom, 1,42 mg/mL. Tuttavia, tali differenze non risultano statisticamente significative e, pertanto, non è possibile attribuire un vantaggio specifico ai trattamenti biologici in questa condizione di gestione del suolo.

Anche nei campioni provenienti dal suolo *no-tillage*, si osserva un valore medio più elevato nel gruppo Controllo, pari a 1,75 mg/mL, rispetto ai gruppi AMF e SynCom, con valori rispettivamente di 1,69 e 1,63 mg/mL. Anche in questo caso, però, le differenze non sono statisticamente significative, confermando che il trattamento biologico non ha determinato effetti rilevanti sull'attività antiossidante misurata con il saggio ABTS.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

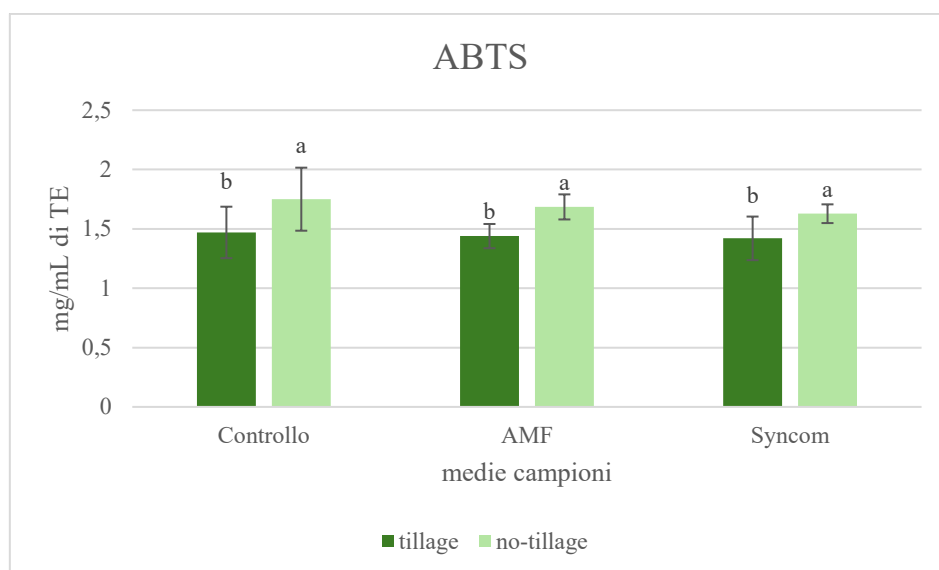


Figura 44: Valori medi di attività radicalica con il metodo ABTS in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

Dal confronto tra campo *tillage* e *no-tillage*, riportato in Figura 44, emerge una tendenza costante di valori più elevati per l'attività antiossidante nei campioni coltivati in *no-tillage*, indipendentemente dal trattamento applicato. Questa tendenza è stata evidenziata anche dall'analisi statistica, che ha evidenziato una differenza significativa tra i due sistemi di gestione del suolo.

Tali risultati appaiono in contrasto con alcuni studi precedenti, in cui era stato osservato un incremento di composti polifenolici in condizioni di campo lavorato. Ad esempio, una ricerca ha riportato un aumento significativo del contenuto fenolico e di stilbeni, tra cui resveratrolo, in varietà coltivate in *tillage*, specialmente quando la lavorazione era combinata con specifici fertilizzanti organici, come l'uso residui di broccoli tritati.⁷⁶ Al contrario, alcuni studi hanno evidenziato che sistemi integrati come ORG+, ossia biologico associato al *no-tillage*, possano incrementare il contenuto di composti antiossidanti, in particolar modo di fenoli e acido ascorbico, in differenti specie ortofrutticole. Inoltre, tali effetti sembrano incrementarsi nel tempo, suggerendo l'importanza di studi pluriennali per una valutazione completa.⁷⁸

Per quanto riguarda il trattamento AMF, i risultati ottenuti mostrano incrementi meno marcati rispetto a quanto riportato in letteratura. In uno studio condotto su una varietà di pomodoro (*Solanum lycopersicum*), l'inoculo con funghi micorrizici arbuscolari ha determinato un incremento dell'attività enzimatica antiossidante, con un aumento fino al 66% dell'attività di catalasi e ascorbato perossidasi, rispetto al controllo.⁷⁹

Tali evidenze suggeriscono che AMF possano stimolare i sistemi antiossidanti in diverse specie vegetali; tuttavia, l'entità dell'effetto dipende fortemente dalla specie fungina coinvolta, dalle condizioni ambientali e dalle interazioni con il microbiota del suolo.

Per quanto concerne il gruppo SynCom, sebbene la letteratura specifica per la vite sia ancora limitata, risultati analoghi sono stati osservati in altre colture. In particolare, in una mela inoculata con SynCom è stato riportato un incremento dell'attività antiossidante.⁷³ Analogamente, in arachide, l'applicazione di una SynCom composta da tre ceppi di *Bacillus* ha migliorato le difese contro i patogeni, stimolando vie metaboliche associate alla sintesi di molecole antiossidanti.⁸⁰

Nel complesso, questi dati supportano l'ipotesi che le comunità microbiche sintetiche possano modulare la biosintesi dei metaboliti secondari; tuttavia, l'efficacia del trattamento sembra fortemente condizionata dal contesto pedoclimatico e dalla durata dell'applicazione.

Attività radicalica analizzata mediante il saggio DPPH

L'attività antiradicalica dei campioni è stata valutata anche mediante il saggio DPPH, esprimendo i risultati come mg di Trolox equivalenti. I risultati evidenziano una variabilità dei valori compresa approssimativamente tra 1,25 e 1,70 mg TE/mL di estratto, indicando differenze tra i differenti trattamenti.

I valori ottenuti dalle analisi purtroppo risultano inferiori rispetto ai range riscontrati in letteratura: infatti, valori registrati su *cultivar* differenti di uva, ossia *Primitivo*, *Negroamaro* ad esempio, sono molto più elevati, compresi tra 3,05 e 6,28 mg TE/mL di estratto.

Questa non concordanza con i dati presenti in letteratura potrebbe avere numerose spiegazioni: ad esempio, a causa delle differenti varietà analizzate, in quanto nel presente studio la varietà studiata è Nebbiolo; una differente modalità di lavorazione del campione; differente modalità di estrazione e variazioni nel calcolo dei risultati, basandosi su curve di calibrazioni differenti che non tengono in debita considerazione il profilo di tipo “dose/effetto” di questo saggio.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Per quanto riguarda il gruppo Controllo, abbiamo come range di valori un massimo pari a 1,69 mg TE/mL di estratto del campione 11 e un minimo di 1,28 mg TE/mL di estratto del campione 15, entrambi appartenenti al suolo no-tillage, mentre quelli appartenenti al suolo tillage presentano una minor variabilità. Anche se tra i due valori estremi c'è una differenza statisticamente significativa, all'interno del gruppo non sono state evidenziate differenze significative tra i vari campioni.

I campioni appartenenti al gruppo SynCom presentano valori intermedi rispetto al gruppo Controllo, con una variabilità moderata. A differenza dei campioni del gruppo controllo, la maggior variabilità tra valori la troviamo nei campioni provenienti dal suolo *tillage*.

Nel caso del gruppo AMF, i campioni *no-tillage* presentano valori generalmente più elevati rispetto ai corrispondenti del suolo *tillage*, indicando un potenziale effetto stimolante dell'inoculo micorrizico sulla produzione o conservazione dei composti ad attività antiossidante. Tuttavia, anche in questo caso non si osservano differenze statisticamente significative.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

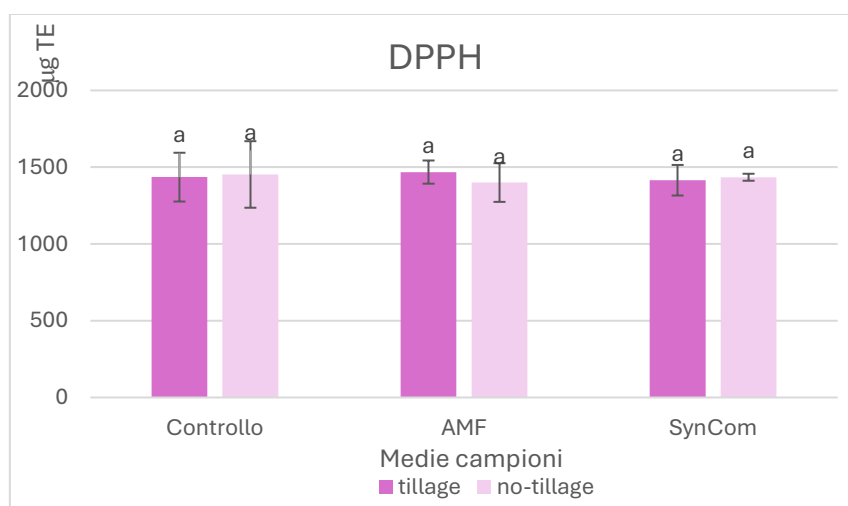


Figura 115: Valori medi di attività radicalica con il metodo DPPH in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

Nel confronto tra campo *tillage* e *no-tillage*, riportato in Figura 45, emerge la tendenza di valori più elevati di attività antiossidante nei campioni coltivati in modo *no-tillage*, ad esclusione del gruppo AMF, in cui i valori sono leggermente più elevati nel terreno *tillage*. Dall'analisi statistica, queste differenze non sono risultate statisticamente significative.

In tutti i gruppi non sembra infatti incidere né il trattamento biologico, né il trattamento del suolo, in quanto i risultati medi si discostano relativamente poco. Ad esempio, questo potrebbe esser causato dal ridotto tempo intercorso tra introduzione dell'inoculo e raccolta del campione.

Attività antiossidante: inibizione dell'ossidazione del ferro

Nella valutazione del potere antiossidante è importante anche per comprendere la capacità di contrastare lo stress ossidativo, fenomeno coinvolto in numerosi processi fisiologici e patologici delle piante.

Per quantificare l'attività antiossidante in questo contesto, è stato utilizzato il metodo FRAP, il quale valuta la capacità riducente mediante la riduzione da Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Tabella 14: Attività antiossidante determinata con metodo FRAP, dati espressi in mg di TE per mL di estratto; lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	FRAP- Potere antiossidante
1-SynCom	Tillage	$1,46 \pm 0,12^{\text{cdefg}}$
2-Controlllo	Tillage	$1,37 \pm 0,04^{\text{efg}}$
3-AMF	Tillage	$1,37 \pm 0,03^{\text{efg}}$
4-AMF	Tillage	$1,44 \pm 0,12^{\text{defg}}$
5-SynCom	Tillage	$1,67 \pm 0,14^{\text{bcde}}$
6-Controlllo	Tillage	$1,42 \pm 0,06^{\text{defg}}$
7-Controlllo	Tillage	$1,67 \pm 0,14^{\text{bcde}}$
8-AMF	Tillage	$1,37 \pm 0,11^{\text{efg}}$
9-SynCom	Tillage	$1,47 \pm 0,12^{\text{cdefg}}$
10-SynCom	No Tillage	$1,79 \pm 0,08^{\text{bc}}$
11-Controlllo	No Tillage	$2,35 \pm 0,24^{\text{a}}$
12-AMF	No Tillage	$1,91 \pm 0,17^{\text{b}}$
13-AMF	No Tillage	$1,38 \pm 0,04^{\text{efg}}$
14-SynCom	No Tillage	$1,33 \pm 0,01^{\text{fg}}$
15-Controlllo	No Tillage	$1,30 \pm 0,02^{\text{g}}$
16-Controlllo	No Tillage	$1,82 \pm 0,06^{\text{b}}$
17-AMF	No Tillage	$1,71 \pm 0,07^{\text{bcd}}$
18-SynCom	No Tillage	$1,63 \pm 0,03^{\text{bcdef}}$

I risultati del saggio FRAP riportati in Tabella 14, evidenziano un intervallo di valori piuttosto ampio: il minimo rilevato è pari a 1,30 mg di TE per mL di estratto nel campione 15, mentre il massimo raggiunge il valore di 2,35 mg di TE per mL di estratto nel campione 11. Ad eccezione di questi valori estremi, la maggior parte dei campioni non mostra differenze statisticamente significative, analogamente a quanto osservato nel saggio dell'ABTS.

I valori ottenuti risultano superiori rispetto a quelli riportati in letteratura per diverse varietà d'uva (range: 0,15-1,5 mg/mL).⁷⁷

Tale differenza può essere attribuita sia alle caratteristiche intrinseche dell'uva Nebbiolo, sia alle specifiche condizioni pedoclimatiche dell'area di coltivazione, che possono influenzare significativamente la sintesi e l'accumulo di composti ad attività antiossidante.

Nel gruppo Controllo, si osserva una buona omogeneità di valori nei campioni provenienti dal suolo *tillage*, mentre nel *no tillage* si registra un'elevata variabilità, includendo sia il valore minimo sia il valore massimo dell'intero dataset. Al contrario, il gruppo AMF mostra una bassa variabilità nel campo non lavorato, tendenza condivisa anche dal gruppo SynCom, suggerendo una risposta più uniforme al trattamento biologico in condizioni di gestione conservativa del suolo.

Comparazione tra trattamenti biologici applicati ai campioni

Per quanto riguarda il confronto tra i differenti trattamenti nel suolo *tillage*, i valori medi non evidenziano differenze statisticamente significative. Tuttavia, si osserva che il gruppo SynCom presenta il valore medio più elevato, pari a 1,67 mg/mL, mentre il gruppo AMF il valore medio più basso, ossia 1,39 mg/mL. È inoltre interessante notare come il gruppo SynCom sia caratterizzato da una deviazione standard contenuta, elemento che suggerisce una buona riproducibilità tra i campionamenti.

Analogamente, anche nei campioni provenienti dal suolo *no-tillage*, non emergono differenze significative tra i trattamenti. In questo caso, il gruppo Controllo mostra il valore medio più alto, ossia 1,83 mg/mL, mentre AMF e SynCom presentano valori inferiori, rispettivamente 1,67 e 1,58 mg/mL.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

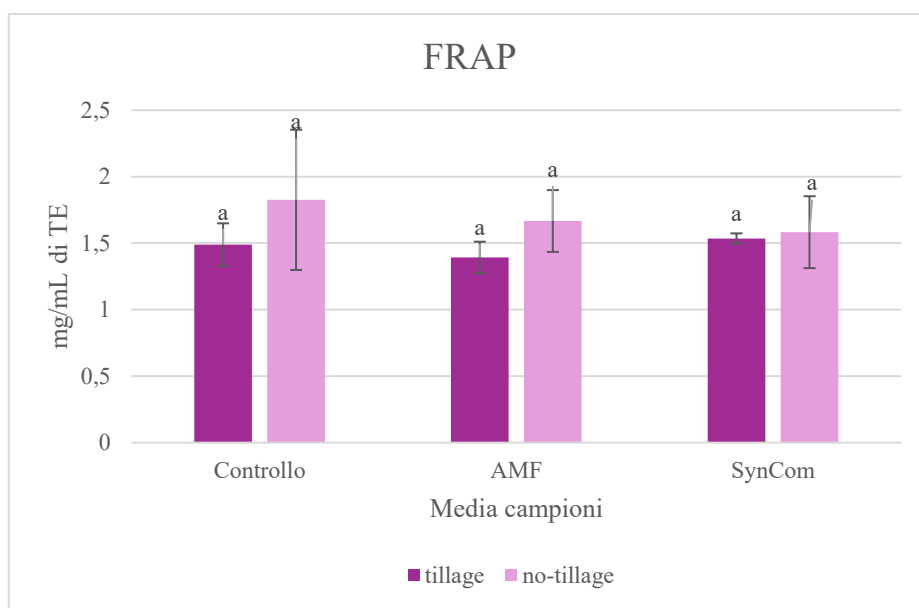


Figura 46: Valori medi di attività antiossidante con il metodo FRAP in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

In Figura 46, il confronto tra campo lavorato, *tillage*, e non lavorato, *no-tillage*, conferma una maggiore attività antiossidante nei campioni coltivati in condizioni di *no-tillage*, indipendentemente dal trattamento applicato. Questa tendenza risulta particolarmente evidente nel gruppo Controllo, dove si osserva un incremento pari a +0,36 mg/mL. Nei gruppi AMF e SynCom, l'aumento è meno marcato.

Tuttavia, nel gruppo Controllo, la variabilità dei dati risulta piuttosto ampia, suggerendo che il sistema *no-tillage* possa effettivamente stimolare la sintesi di molecole ad attività antiossidante, ma con risposte meno omogenee tra i campioni. Come già evidenziato, questa disomogeneità potrebbe essere legata alla minore uniformità del suolo non lavorato, che può determinare condizioni microambientali differenti all'interno del vigneto.⁷⁶

I risultati ottenuti indicano inoltre come il trattamento con AMF non abbia determinato un incremento significativo del potere antiossidante rispetto al Controllo. Tale osservazione risulta essere parzialmente in accordo con la letteratura, secondo cui l'effetto dei funghi micorrizici arbuscolari sull'attività antiossidante dipende non solo dall'inoculo stesso, ma anche dall'interazione con il microbiota del suolo e dalle condizioni ambientali specifiche.²¹

4.3 ANALISI IN HPLC

Per una caratterizzazione fine dei campioni, si è proceduto con metodiche di analisi che permettono di quantificare le singole molecole presenti nel campione estratto. A tal riguardo, sono state effettuate tre analisi in HPLC, le quali hanno permesso di identificare, separare e quantificare i principali polifenoli, zuccheri e acidi organici presenti nell'uva.

Composti polifenolici

Le analisi per separare e quantificare i polifenoli hanno permesso la determinazione di una serie di molecole di interesse: acido gallico, acido protocatecuico, acido p-cumarico, acido p-OH benzoico, (classe degli acidi benzoici); catechina e epicatechina, per la classe dei flavanoli; rutina, quercitina, miricetina, tra i flavonoli; resveratrolo tra gli stilbeni. La letteratura conferma la presenza di questi composti come polifenoli presenti nell'uva in quantità rilevanti.⁹²

Per la discussione saranno analizzate le singole classi di polifenoli, ponendo l'attenzione principalmente sui composti maggioritari e minoritari.

I valori riportati in Tabella 15 sono espressi in mg/Kg di campione: alcuni saranno indicati come *fresh weight*, mentre altri come *dry weight*: questa scelta è stata presa per poter confrontare i dati relativi alle analisi con quelli riscontrabili in letteratura.

Acidi benzoici.

Tabella 15: Concentrazioni dei principali acidi benzoici, espressi in mg/Kg, determinati tramite HPLC; lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	Acido Gallico (DW)	Acido Protocatecuico (DW)	Acido para-OH benzoico (FW)	Acido para-cumarico (FW)
1 SynCom	Tillage	10,483±0,166 ^{cde}	67,556±0,150 ^{abc}	8,702±0,743 ^a	0,732±0,112 ^a
2 Controllo	Tillage	10,742±0,570 ^{cd}	71,995±1,043 ^{ab}	8,777±0,394 ^a	0,579±0,015 ^{abcd}
3 AMF	Tillage	10,963±0,356 ^{abcd}	64,445±3,999 ^{abcde}	8,012±1,398 ^a	0,598±0,007 ^{abcd}
4 AMF	Tillage	8,913±0,290 ^{fg}	62,096±0,357 ^{bcdef}	9,588±0,143 ^a	0,527±0,039 ^{bcd}
5 SynCom	Tillage	9,280±0,137 ^{ef}	63,815±0,384 ^{bcde}	9,798±0,246 ^a	0,683±0,032 ^{ab}
6 Controllo	Tillage	9,142±0,109 ^{ef}	54,679±5,725 ^{ef}	8,729±0,994 ^a	0,496±0,046 ^{cd}
7 Controllo	Tillage	7,592±0,087 ^g	43,054±0,058 ^g	8,333±0,712 ^a	0,535±0,014 ^{bcd}
8 AMF	Tillage	9,601±0,089 ^{def}	56,779±3,676 ^{cdef}	9,883±1,119 ^a	0,537±0,006 ^{bcd}
9 SynCom	Tillage	8,530±0,581 ^{fg}	66,533±2,763 ^{abcd}	10,751±0,917 ^a	0,603±0,029 ^{abcd}
10 SynCom	No Tillage	11,412±0,316 ^{abc}	62,509±0,039 ^{bcde}	9,331±1,425 ^a	0,542±0,041 ^{bcd}
11 Controllo	No Tillage	12,347±0,068 ^a	55,715±4,192 ^{def}	10,956±1,547 ^a	0,624±0,027 ^{abc}
12 AMF	No Tillage	12,189±0,616 ^{ab}	75,488±5,848 ^a	10,092±0,063 ^a	0,467±0,037 ^{cd}
13 AMF	No Tillage	9,202±0,122 ^{ef}	61,466±0,751 ^{bcdef}	9,175±0,574 ^a	0,499±0,029 ^{cd}
14 SynCom	No Tillage	11,223±0,156 ^{abc}	50,753±1,212 ^{fg}	8,421±0,116 ^a	0,529±0,002
15 Controllo	No Tillage	10,471±0,172 ^{cde}	58,337±1,308 ^{cdef}	9,115±0,488 ^a	0,459±0,022 ^d
16 Controllo	No Tillage	11,381±0,069 ^{abc}	56,833±0,304 ^{cdef}	9,342±0,264 ^a	0,674±0,007 ^{ab}
17 AMF	No Tillage	10,843±0,737 ^{bcd}	59,634±4,265 ^{cdef}	9,341±0,679 ^a	0,583±0,019 ^{abcd}
18 SynCom	No Tillage	10,427±0,368 ^{cde}	64,887±0,113 ^{abcd}	9,991±0,727 ^a	0,597±0,062 ^{abcd}

I risultati dell'analisi effettuata per quantificare gli acidi benzoici, riportati in Tabella 15, presentano alcune differenze statisticamente significative. Il composto che risulta maggioritario è l'acido protocatecuico, mentre l'acido p-cumarico è, tra i quattro acidi benzoici, quello minore. L'acido protocatecuico presenta le maggiori differenze: infatti, il campione 7, appartenente al gruppo Controllo, ha il valore minimo (43,054 mg/Kg sul secco), mentre il campione 12, facente parte del gruppo AMF, ha il valore massimo (ossia 75,488 mg/Kg sul secco).

Gli altri due acidi, gallico e p-OH benzoico, si collocano a valori intermedi rispetto agli altri due acidi, con livelli abbastanza simili: infatti, l'acido gallico presenta un range di valori compresi tra 7,592 mg/Kg sul secco del campione 7, del gruppo Controllo, e 12,347 mg/Kg sul secco del campione 11, sempre del gruppo Controllo; l'acido p-OH benzoico, invece, non mostra differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda l'acido p-cumarico, la variabilità interna risulta minore, anche se con alcune differenze significative: infatti, il range di valori va da 0,459 mg/Kg (sul fresco) del campione 15 (Controllo), a 0,732 mg/Kg (sul fresco) del campione 1 (SynCom).

Questi valori trovano riscontro in letteratura: infatti, in alcuni studi vengono riportati i medesimi quattro principali acidi benzoici presenti nell'uva. Alcuni studi riportano il contenuto di questi acidi come *dry weight*, tra cui uno studio che ha analizzato la componente polifenolica di 10 differenti varietà di uva da vino. In questo lavoro, l'acido protocatecuico viene indicato come acido benzoico maggioritario, in un range di valori tra 8,5-328,7 mg/Kg e l'acido gallico compreso tra 7,3-151,9 mg/Kg;⁹³ quindi i valori ottenuti rientrano pienamente in questi range.

Per quanto riguarda gli altri due acidi, alcuni studi li hanno riportati sul *fresh weight*: in un lavoro, basato sulla quantificazione di 10 varietà di uva è stato dosato l'acido p-OH benzoico in un range 10,57-23,1 mg/Kg, mentre l'acido p-cumarico tra 0,52 e 1,21 mg/Kg.⁹⁴ anche in questo caso, tranne alcune eccezioni, i dati sono coerenti con questi range.

Comparazione trattamenti biologici applicati ai campioni

Per quanto riguarda il confronto tra i trattamenti, nel terreno *tillage* si riscontrano differenze statisticamente significative per gli acidi gallico, p-cumarico e protocatecuico.

Per quanto riguarda l'acido protocatecuico le differenze tra i campioni sono parzialmente significative: infatti, tra i vari campioni il valore maggiore è relativo al campione 2, appartenente al gruppo controllo, pari a 71,995 mg/Kg, mentre il valore minore è rappresentato dal campione 7, sempre del Controllo, pari a 43,05 mg/Kg. I campioni del gruppo SynCom non mostrano differenze tra di loro, come pure quelli micorrizati.

L'acido cumarico, invece, mostra un andamento più stabile in ciascun gruppo di campioni, con un leggero aumento di valori per quanto riguarda il trattamento SynCom. Stesso discorso vale per l'acido gallico, in cui però sono i campioni con il trattamento AMF a presentare valori leggermente superiori rispetto agli altri gruppi. Per l'acido p-OH benzoico, non si registrano differenze significative tra i campioni.

Per quanto riguarda invece il terreno *no-tillage*, l'unico acido che presenta differenze significative è l'acido p-cumarico: questo composto è presente in quantità maggiore nei campioni del gruppo Controllo, mentre quelli trattati con SynCom e AMF mostrano valori simili.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

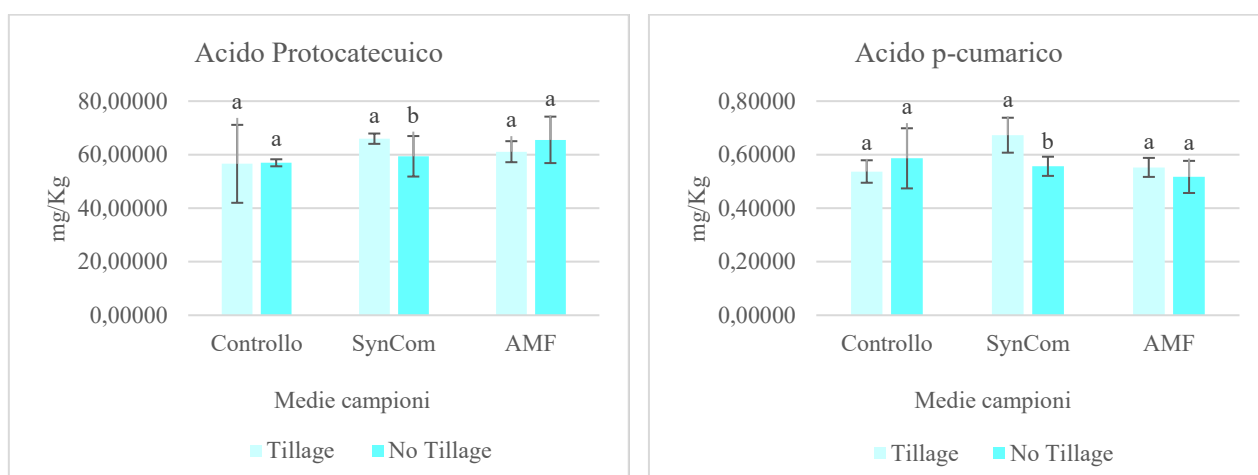


Figure 47: Valori medi di acido protocatecuico e di acido cumarico in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

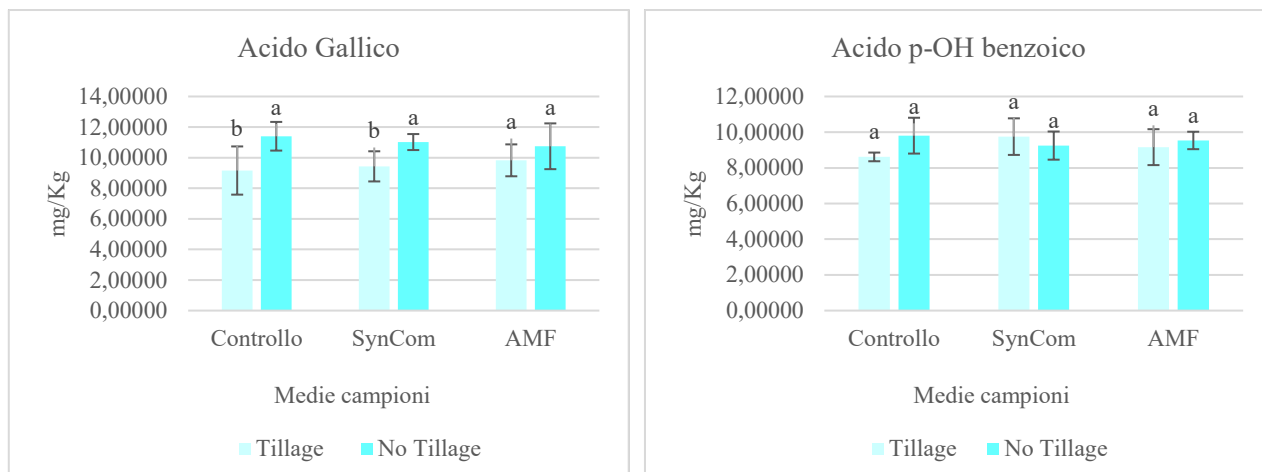


Figura 48: Valori medi di acido gallico e di acido p-idrossi-benzoico in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e ai metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

Nelle Figure 47 e 48 sono riportati i confronti tra i valori medi dei campioni tra campo lavorato e non lavorato. In questo caso, i campioni del campo *no-tillage* presentano valori medi della classe degli acidi benzoici superiori in quasi tutti i trattamenti: alcuni studi hanno evidenziato come i campioni provenienti dal campo *no-tillage* siano caratterizzati da un aumento dei valori di acidi benzoici nel frutto.⁹⁵

Ad esclusione dell'acido gallico, gli altri tre acidi presentano una concentrazione media superiore quando vi è un abbinamento tra la lavorazione del terreno e gli inoculi di SynCom: infatti, nei campioni derivanti da terreno *tillage*, i valori di questi acidi sono superiori rispetto a quelli derivanti dal *no-tillage*. Poiché in letteratura non sono presenti dati in merito, può sicuramente essere interessante analizzare in modo approfondito la relazione tra lavorazione del terreno e inoculo di comunità microbiche.

I campioni soggetti a trattamento con AMF, ad esclusione dell'acido p-cumarico, presentano valori superiori: questo è riscontrabile anche in letteratura, dove si è notato un aumento di questi composti fenolici in piante micorrizzate.⁹⁶

Passando ai flavanoli, i valori sono riportati in Tabella 16, espressi in mg/Kg (sul secco).

Tabella 16: Concentrazioni dei principali flavanoli espressi in mg/Kg; lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	Catechina (DW)	Epicatechina (DW)
1 SynCom	Tillage	82,152±5,787 ^{abc}	53,665±0,142 ^a
2 Controllo	Tillage	92,605±0,256 ^a	61,100±5,171 ^a
3 AMF	Tillage	81,813±0,578 ^{abc}	51,380±1,119 ^a
4 AMF	Tillage	65,442±0,427 ^{bcde}	38,988±1,182 ^a
5 SynCom	Tillage	71,668±5,057 ^{abcde}	45,974±7,090 ^a
6 Controllo	Tillage	70,612±8,477 ^{abcde}	41,129±8,662 ^a
7 Controllo	Tillage	53,307±1,167 ^e	54,613±1,006 ^a
8 AMF	Tillage	63,515±9,280 ^{bcde}	40,276±5,834 ^a
9 SynCom	Tillage	58,598±4,590 ^{de}	46,218±2,658 ^a
10 SynCom	No Tillage	61,336±7,542 ^{cde}	39,432±10,610 ^a
11 Controllo	No Tillage	80,280±7,245 ^{abcd}	53,295±14,010 ^a
12 AMF	No Tillage	74,297±11,244 ^{abcde}	56,923±15,630 ^a
13 AMF	No Tillage	56,495±4,055 ^e	33,186±4,062 ^a
14 SynCom	No Tillage	70,397±1,180 ^{abcde}	37,012±1,072 ^a
15 Controllo	No Tillage	58,085±1,443 ^{de}	39,279±6,129 ^a
16 Controllo	No Tillage	85,261±0,119 ^{ab}	61,093±0,825 ^a
17 AMF	No Tillage	67,922±8,760 ^{bcde}	54,257±5,433 ^a
18 SynCom	No Tillage	71,309±2,200 ^{abcde}	49,055±7,535 ^a

I risultati delle analisi effettuate, sono relativi ai due principali flavanoli presenti nell'uva, ossia catechina ed epicatechina. Per quanto riguarda la catechina, i valori mostrano differenze statisticamente significative: abbiamo il valore massimo nel campione 2, appartenente al gruppo Controllo (92,605 mg/Kg), mentre il valore minimo è del campione 7, sempre appartenente al gruppo Controllo (53,307 mg/Kg).

I valori relativi all'epicatechina, invece, non mostrano differenze statisticamente significative: il range dei dati è compreso tra 33,186 mg/Kg del campione 13 (AMF) e 61,100 mg/Kg del campione 2 (Controllo).

In letteratura, studi, in cui è stata analizzata la componente polifenolica di 10 differenti varietà di uva da vino, riportano un contenuto di flavanoli, sul peso secco, compreso tra 21,5 e 966 mg/Kg per quanto riguarda la catechina, mentre per l'epicatechina sono compresi tra 4,1 e 734 mg/Kg, quindi un range assai ampio.⁹³

Comparazione trattamenti biologici applicati ai campioni

Per quanto riguarda il confronto tra i trattamenti, nel terreno *tillage* si registrano differenze statisticamente significative per entrambi i composti, mentre nel terreno *no-tillage* si registrano differenze significative solamente per la catechina.

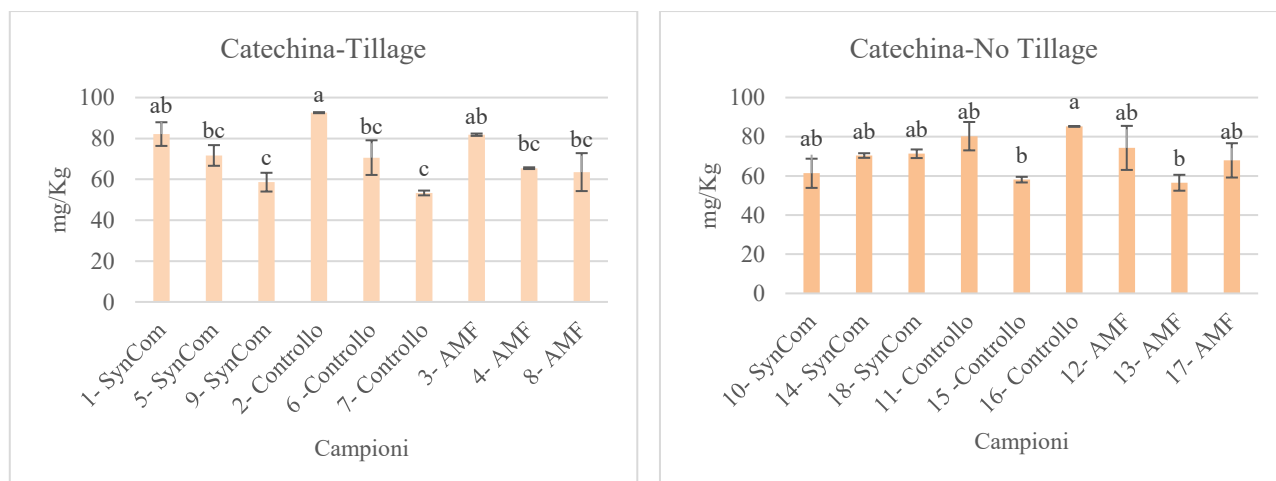


Figura 49: Confronto tra valori di concentrazioni di catechina per tutti i campioni nel campo *tillage* e nel campo *no-tillage*.

La catechina presenta valori molto simili tra i due campi: i campioni con maggior concentrazione sono quelli del gruppo Controllo, seguiti da quelli AMF nel campo *tillage*, e dai SynCom nel campo *no-tillage* (Figura 49). Anche se simili, i valori relativi al campo *tillage* risultano superiori rispetto al campo non lavorato: questo è riportato anche in letteratura, in cui uno studio afferma che la lavorazione del campo, in aggiunta all'uso di fertilizzanti naturali a base di broccoli, ha determinato un aumento della componente polifenolica nel prodotto finale, con un aumento significativo di catechina ed epicatechina.⁷⁶

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

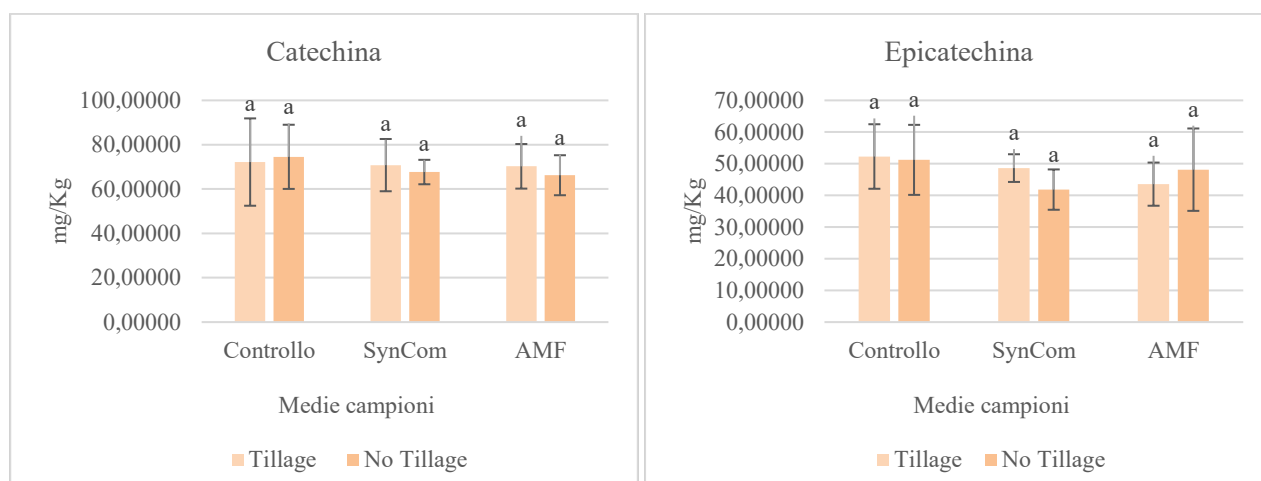


Figura 50: Valori medi di catechina e epicatechina in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (tillage e no-tillage).

Per quanto riguarda il confronto tra i valori medi dei campioni provenienti dai due terreni, non si riscontrano differenze statisticamente significative: questo potrebbe essere attribuibile al tempo ridotto tra l'inoculo e la raccolta, non sufficiente per andare a modificare in modo consistente la composizione del frutto. Questo è indicato anche in letteratura, in cui i valori di catechina ed epicatechina in due terreni, uno *tillage* e uno *no-tillage* differiscono di poco, senza differenze significative.⁹⁵

Tra i flavonoli, sono state dosate rutina, quercetina e miricetina, i rispettivi valori sono riportati in Tabella 17 (mg/Kg).

Tabella 17: Concentrazioni dei principali flavonoli espressi in mg/Kg; lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	Rutina (DW)	Quercetina (FW)	Miricetina (FW)
1 SynCom	Tillage	17,704±0,153 ^{ghij}	3,063±0,002 ^{fgh}	0,703±0,036 ^a
2 Controllo	Tillage	16,413±0,383 ^{hij}	3,364±0,010 ^{fg}	0,660±0,009 ^a
3 AMF	Tillage	17,760±0,308 ^{ghij}	2,956±0,110 ^{ghi}	0,848±0,090 ^a
4 AMF	Tillage	22,427±0,064 ^{def}	4,436±0,034 ^{cd}	0,674±0,012 ^a
5 SynCom	Tillage	15,850±0,098 ^{ijk}	2,659±0,008 ^{hi}	1,019±0,002 ^a
6 Controllo	Tillage	18,829±0,989 ^{fghi}	3,982±0,058 ^{de}	1,032±0,113 ^a
7 Controllo	Tillage	17,006±0,238 ^{ghij}	3,510±0,054 ^{ef}	0,986±0,056 ^a
8 AMF	Tillage	30,754±0,301 ^{ab}	6,078±0,177 ^a	1,021±0,045 ^a
9 SynCom	Tillage	23,718±0,992 ^{cd}	4,664±0,104 ^{bc}	0,751±0,089 ^a
10 SynCom	No Tillage	23,479±1,500 ^{cde}	4,044±0,201 ^d	0,914±0,034 ^a
11 Controllo	No Tillage	31,789±1,269 ^a	5,033±0,136 ^b	1,034±0,093 ^a
12 AMF	No Tillage	30,777±2,259 ^{ab}	4,699±0,103 ^{bc}	0,700±0,010 ^a
13 AMF	No Tillage	27,181±0309 ^{bc}	5,938±0,078 ^a	0,952±0,012 ^a
14 SynCom	No Tillage	20,339±0,114 ^{defg}	3,972±0,030 ^{de}	1,010±0,013 ^a
15 Controllo	No Tillage	14,759±0,077 ^{jk}	2,618±0,061 ^{hi}	0,953±0,014 ^a
16 Controllo	No Tillage	12,546±0,449 ^k	2,497±0,001 ⁱ	0,878±0,085 ^a
17 AMF	No Tillage	19,817±2,077 ^{efgh}	3,384±0,305 ^{fg}	0,790±0,228 ^a
18 SynCom	No Tillage	19,388±0,027 ^{fghi}	4,050±0,242 ^d	0,923±0,274 ^a

I risultati dell'analisi indicano che due su tre flavonoli presentano differenze statisticamente significative: la rutina presenta un valore massimo (campione 11, Controllo), pari a 31,789 mg/Kg e un valore minimo di 12,546 mg/Kg (campione 16, Controllo).

La quercetina presenta un valore massimo di 5,938 mg/Kg relativo al campione 13 (AMF), e un valore minimo di 2,497 mg/Kg del campione 16 (Controllo). La miricetina risulta minoritaria rispetto agli altri due composti ed è l'unica a non presentare differenze statisticamente significative.

Valori analoghi trovano riscontro in letteratura: per quanto riguarda la rutina, dati riportati in peso secco, per uno studio che ha analizzato 10 varietà differenti di uva da vino, indicano un range compreso tra 6,1 mg/Kg e 54,7 mg/Kg per quercetina e miricetina⁹³; invece, un altro studio riporta valori in peso fresco (10 varietà differenti), a valori rispettivamente compresi tra 1,93 mg/Kg e 9,57 mg/Kg (quercetina) e tra 0,52 mg/Kg e 1,73 mg/Kg (miricetina).⁹⁴

Comparazione trattamenti biologici applicati ai campioni

Per quanto riguarda i campioni provenienti dal campo *tillage*, le tre molecole presentano differenze statisticamente significative.



Figura 51: Valori dei campioni di concentrazioni di rutina, quercetina e miricetina nel campo *tillage*.

Per quanto riguarda i campioni provenienti dal terreno *no-tillage*, solamente la rutina e la quercetina mostrano differenze statisticamente significative, con un aumento delle concentrazioni, seppur minimo, nei campioni provenienti da questo terreno.

Anche in letteratura, analizzando varietà di uva in più annate coltivate in due terreni, uno *tillage* e uno *no-tillage*, nel secondo caso è stato riscontrato un leggero aumento delle concentrazioni di questi composti, compresa la miricetina, rispetto ai campioni provenienti dal campo *tillage*.⁹⁵

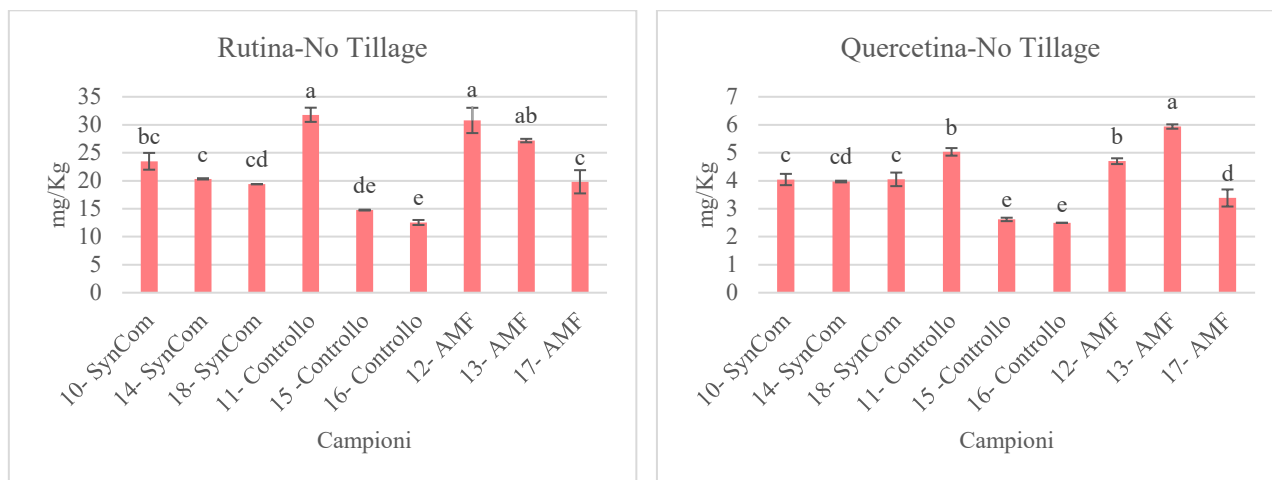


Figura 52: Valori dei campioni di concentrazioni di rutina, quercetina nel campo *no- tillage*.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

Per quanto riguarda il confronto tra medie dei campioni per ciascun trattamento biologico, rispetto ai due tipi di campo (*tillage* e *no-tillage*) nessuna delle tre molecole mostra differenze statisticamente significative. Per la rutina e la quercetina, i valori più alti sono nel gruppo Controllo per entrambi i campi, mentre per la miricetina i valori più elevati sono relativi al gruppo SynCom. Alcuni studi hanno indicato come piante micorrizzate abbiano valori più elevati di questi composti, da attribuire alla simbiosi tra pianta e micorrize.⁹⁶

Passando ai dati del resveratrolo (classe degli stilbene), i relativi valori ottenuti sono riportati in Tabella 18, espressi in mg/Kg sul fresco.

Tabella 18: Concentrazioni di resveratrolo espresse in mg/Kg; lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	Resveratrolo (FW)
1 SynCom	Tillage	0,429±0,020 ^{efg}
2 Controllo	Tillage	0,396±0,031 ^{fg}
3 AMF	Tillage	0,358±0,091 ^g
4 AMF	Tillage	0,509±0,017 ^{bcdef}
5 SynCom	Tillage	0,603±0,001 ^{abc}
6 Controllo	Tillage	0,516±0,001 ^{bcdef}
7 Controllo	Tillage	0,476±0,028 ^{cdefg}
8 AMF	Tillage	0,681±0,000 ^a
9 SynCom	Tillage	0,529±0,027 ^{bcdef}
10 SynCom	No Tillage	0,522±0,042 ^{bcdef}
11 Controllo	No Tillage	0,593±0,009 ^{abcd}
12 AMF	No Tillage	0,478±0,056 ^{cdefg}
13 AMF	No Tillage	0,555±0,004 ^{abcde}
14 SynCom	No Tillage	0,466±0,012 ^{defg}
15 Controllo	No Tillage	0,498±0,001 ^{bcdef}
16 Controllo	No Tillage	0,513±0,011 ^{bcdef}
17 AMF	No Tillage	0,520±0,057 ^{bcdef}
18 SynCom	No Tillage	0,620±0,027 ^{ab}

Le concentrazioni di questa molecola presentano differenze statisticamente significative: abbiamo un valore massimo di 0,681 mg/Kg per il campione 8 (AMF) e un minimo di 0,358 mg/Kg per il campione 3 (AMF), che risultano diversi dagli altri valori.

In letteratura⁹⁴ uno studio riporta i valori di resveratrolo relativi a 10 varietà differenti di uva, essi si collocano in un range compreso tra 0,13 mg/Kg e 0,64 mg/Kg sul fresco, comparabili a quanto ottenuto in questa analisi.

Comparazione trattamenti biologici applicati ai campioni

Considerando i soli dati relativi ai campioni dal terreno *tillage* (Figura 53), essi presentano differenze statisticamente significative: i valori massimo e minimo sono i medesimi dell'insieme di dati precedenti e entrambi relativi al trattamento con AMF.

I campioni SynCom presentano nel complesso valori minori rispetto al gruppo AMF, ma superiori al gruppo Controllo: questo potrebbe essere un indizio per valutare l'effetto dell'inoculo di comunità microbiche su questo parametro.

Per quanto riguarda invece i campioni provenienti dal campo *no-tillage*, essi mostrano minori differenze, trovandosi quasi tutti a valori simili, in un range compreso tra 0,466 mg/Kg e 0,619 mg/Kg: tali valori risultano superiori rispetto al campo *tillage*. Uno studio effettuato su due campi, uno lavorato e uno no, ha mostrato un leggero aumento della concentrazione di resveratrolo nel campo *no-tillage*⁹⁵, a conferma di quanto riscontrato in questa tesi.

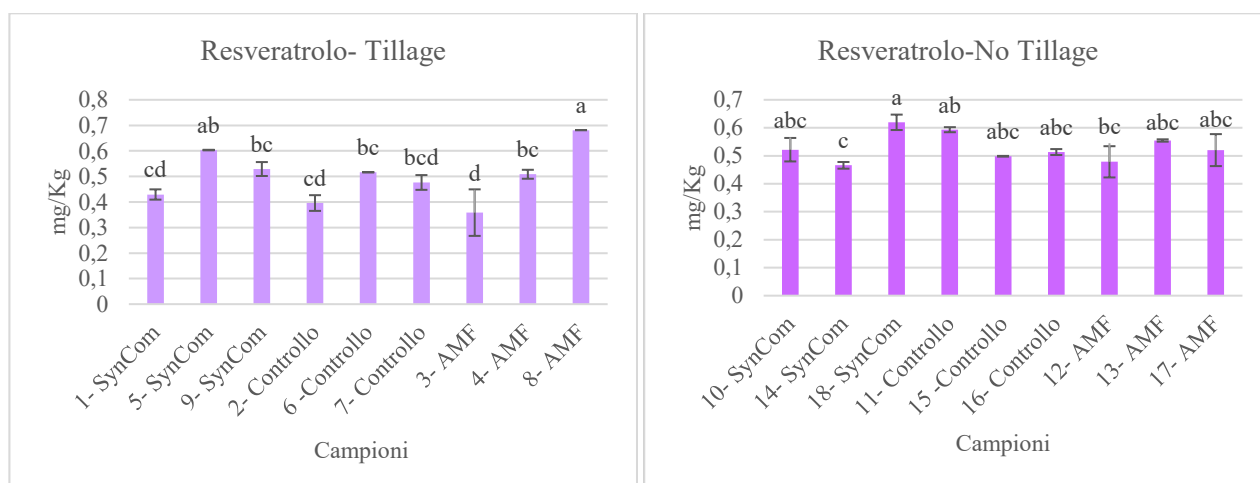


Figura 53: Valori medi di resveratrolo in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

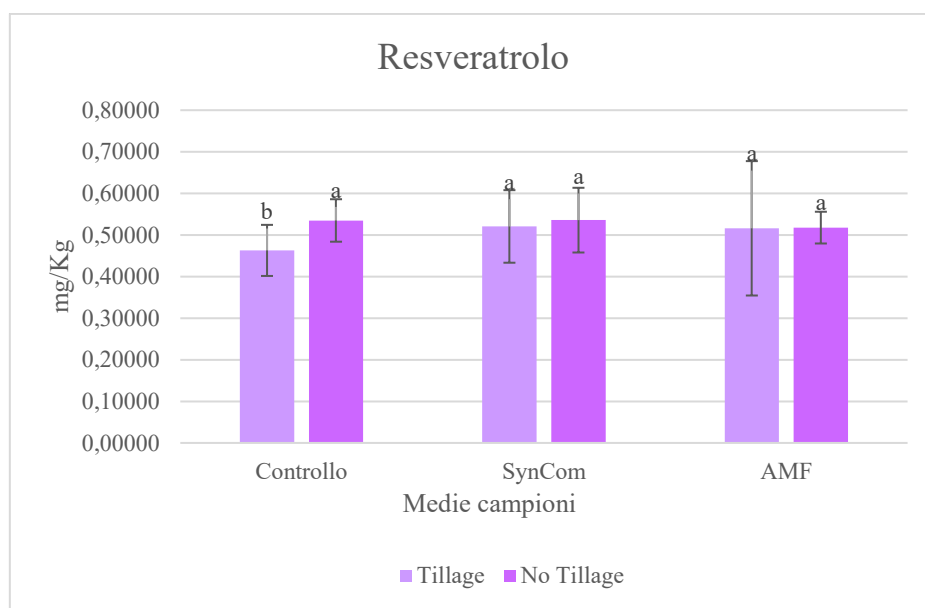


Figura 54: Valori medi di concentrazione di resveratrolo in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

In Figura 54 è riportato il confronto tra le medie di resveratrolo tra le due tipologie di campo per ciascun trattamento biologico. I valori mostrano differenze statisticamente significative solo per i campioni Controllo, in cui si rileva una media inferiore per il campo *tillage* rispetto al *no-tillage*.

Infine, i trattamenti con SynCom e AMF non risultano avere effetti significative sul quantitativo di resveratrolo.

Zuccheri

Le analisi, effettuate in HPLC con detector ad indice di rifrazione, per quantificare e separare gli zuccheri hanno permesso la determinazione dei due monosaccaridi principali: glucosio e fruttosio. Si è inoltre calcolato il rapporto tra questi due zuccheri. I valori riportati in tabella sono espressi in g/100 g di estratto.

Tabella 19: Concentrazioni dei principali zuccheri determinati in HPLC e rapporto tra i due monosaccaridi espressi in g/100g; lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	Glucosio	Fruttosio	Glucosio/Fruttosio
1- SynCom	Tillage	4,391±0,08 ^a	4,629±0,19 ^a	0,96
2- Controllo	Tillage	4,575±0,36 ^a	4,993±0,51 ^a	0,93
3- AMF	Tillage	5,109±0,03 ^a	5,312±0,17 ^a	0,97
4- AMF	Tillage	4,898±0,08 ^a	4,862±0,11 ^a	0,93
5- SynCom	Tillage	5,106±0,23 ^a	5,254±0,29 ^a	0,94
6- Controllo	Tillage	5,298±0,03 ^a	5,561±0,14 ^a	0,97
7- Controllo	Tillage	4,796±0,24 ^a	4,787±0,19 ^a	0,97
8- AMF	Tillage	5,232±0,08 ^a	5,321±0,06 ^a	1,03
9- SynCom	Tillage	4,886±0,16 ^a	5,016±0,10 ^a	0,96
10- SynCom	No Tillage	4,617±0,17 ^a	4,744±0,09 ^a	0,97
11- Controllo	No Tillage	4,884±0,05 ^a	4,979±0,14 ^a	0,97
12- AMF	No Tillage	4,724±0,02 ^a	4,768±0,05 ^a	0,93
13- AMF	No Tillage	4,869±0,03 ^a	4,843±0,03 ^a	1,01
14- SynCom	No Tillage	4,782±0,09 ^a	4,901±0,16 ^a	0,99
15- Controllo	No Tillage	4,756±0,04 ^a	4,745±0,06 ^a	0,98
16- Controllo	No Tillage	5,014±0,05 ^a	4,955±0,07 ^a	0,98
17- AMF	No Tillage	4,932±0,02 ^a	4,758±0,05 ^a	0,98
18- SynCom	No Tillage	4,957±0,49 ^a	4,814±0,27 ^a	0,96

I risultati, riportati in Tabella 19, sono simili tra loro, con differenze non significative: abbiamo un valore massimo pari a 5,232 g/100 g del campione 8 e un minimo di 4,391 g/100g del campione 1.

Questi valori sono confermati dalla letteratura: infatti, gli zuccheri principali presenti nelle varietà di uva sono glucosio e fruttosio.⁹⁷

Inoltre, i valori rientrano perfettamente nel range rilevabile in letteratura, il quale per il glucosio è tra 0,39 e 9,69 g/100g, mentre per il fruttosio tra 0,52 e 7,16 g/100g di prodotto fresco.⁹⁷ In quantità inferiore a 0,1 g/100g, nello studio⁹⁷ è stato individuato il saccarosio, non rilevabile nel nostro caso.

In diversi studi scientifici viene calcolato il rapporto tra glucosio e fruttosio, con un'indicazione che quando il rapporto è 1:1, l'uva è completamente matura. In letteratura⁹⁷ però sono indicati riferimenti a differenti varietà di uva, in cui troviamo valori molto bassi (fino a 0,26), ma anche valori superiori a 1. Tale variabilità può essere causata dal terreno in cui i campioni di riferimento sono stati coltivati e dalla modalità di coltura.

Nei campioni in analisi sono stati riscontrati valori intorno a 1; il valore minimo di 0,93 è relativo ai campioni 4 e 12, e il massimo per il campione 8 con un valore pari a 1,03. Questi valori indicano che l'uva analizzata è stata raccolta nel momento ottimale della maturazione, in cui le concentrazioni dei due monosaccaridi sono comparabili, con una leggera prevalenza di fruttosio in quasi tutti i campioni.

Comparazione trattamenti biologici applicati ai campioni

Per quanto riguarda il confronto tra i differenti trattamenti nel suolo *tillage*, i valori medi del contenuto di glucosio evidenziano alcune differenze statisticamente significative: in particolar modo, il campione 6, del gruppo Controllo, presenta il valore medio massimo di 5,29 g/100g, mentre il campione 1, appartenente al gruppo SynCom, presenta il valore minimo pari a 4,39 g/100g; i campioni del gruppo AMF si collocano all'interno di questo range.

Al contrario, i campioni provenienti dal suolo *no-tillage*, non presentano differenze significative tra i trattamenti. Anche in questo caso il valore massimo è rappresentato da un campione appartenente al gruppo Controllo, pari a 5,01 g/100g, e il valore minimo è relativo al campione 10 (SynCom) di 4,61 g/100g.

Questo potrebbe indicare che le comunità microbiche possano andare ad influenzare la quantità totale di zuccheri in quanto ne possono utilizzare una parte per il loro metabolismo.

Per quanto riguarda il fruttosio, invece, i dati medi dei trattamenti non mostrano differenze statisticamente significative, con differenze minime in termini di valori medi di gruppo.

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

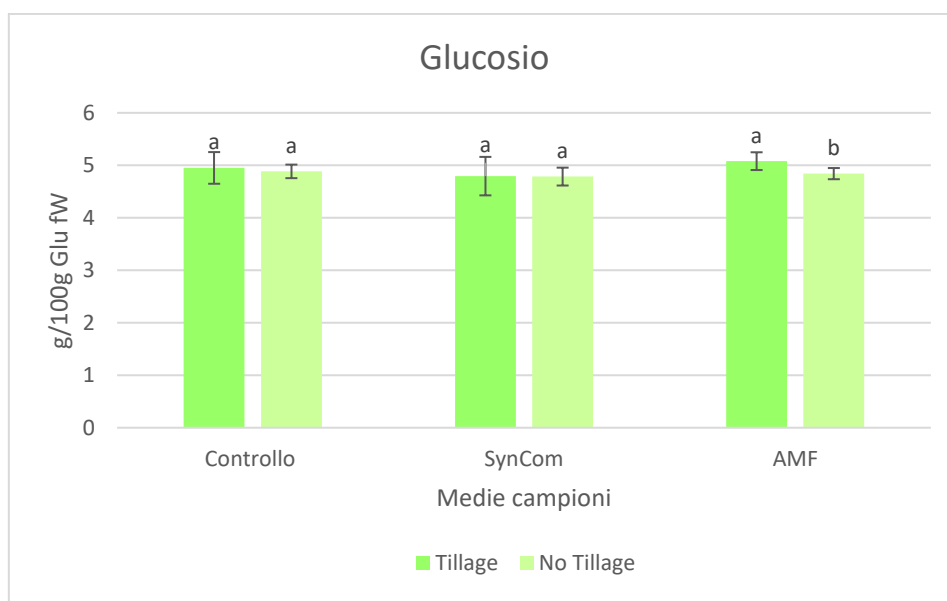


Figura 55: Valori medi di concentrazione di glucosio in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

In Figura 55 è riportato il confronto tra i valori medi dei campioni provenienti da campo lavorato (*tillage*) e non lavorato (*no tillage*). In questo confronto, i campioni del campo *tillage* presentano sempre una quantità di glucosio leggermente superiore, anche se per i gruppi Controllo e SynCom le differenze non sono statisticamente significative.

Invece, per quanto riguarda il gruppo AMF, è rilevabile una differenza significativa tra i due campi: infatti, nel campo *tillage* il valore medio di glucosio è pari a 5,07 g/100g, mentre un valore di 4,84 g/100g nel *no-tillage*.

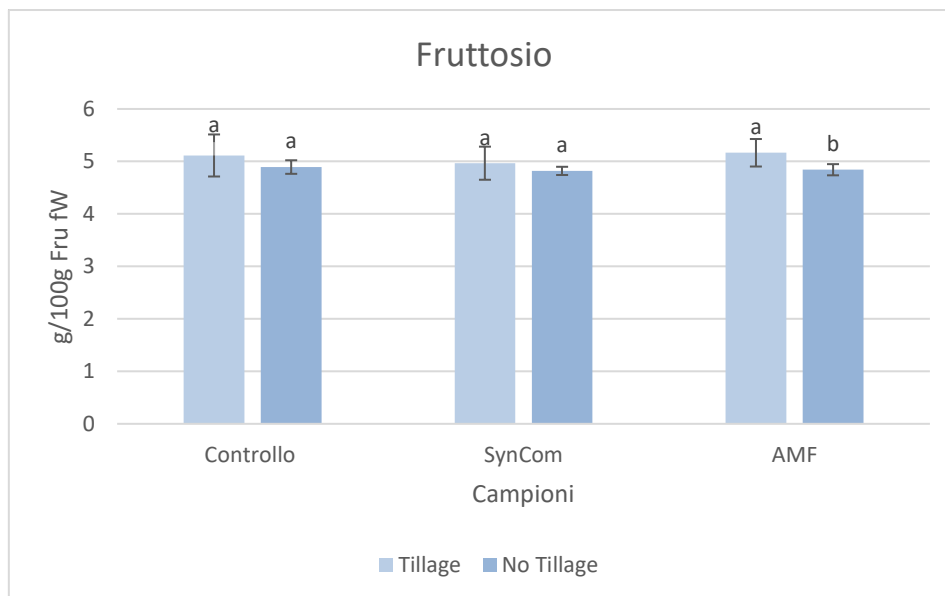


Figura 56: Valori medi di concentrazione di fruttosio in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

Un risultato analogo si riscontra anche per il fruttosio, in cui l'unico confronto tra terreni che presenta differenze statisticamente significative è nel gruppo AMF: infatti, abbiamo il valore massimo nel campo *tillage* (5,16 g/100g) e un valore pari a 4,79 g/100g nel *no-tillage*.

In letteratura si individuano dati contrastanti: per quanto riguarda i differenti trattamenti del terreno, in genere c'è concordanza sul fatto che il *tillage* può influenzare positivamente la concentrazione assoluta di zuccheri all'interno del frutto.⁹⁸

Altre sperimentazioni hanno anche affermato che frutti da piante micorizzate sono caratterizzati da valori superiori di zuccheri rispetto ai controlli negativi, in quanto questi funghi sono in grado di accumulare saccarosio ed esprimono enzimi in grado di scindere il disaccaride nei due monosaccaridi che lo compongono. Questo spiegherebbe il motivo per cui nel gruppo AMF abbiamo un contenuto maggiore di zuccheri.⁹⁹

Acidi organici

Le analisi cromatografiche degli acidi organici hanno permesso di dosare i principali tra questi, ovvero acido malico, acido tartarico, acido succinico. I valori riportati in Tabella 20 e sono espressi in g/L di succo.

Tabella 20: Concentrazioni dei principali acidi organici e rapporto tartarico/malico espressi in g/L; lettere diverse indicano differenze significative tra campioni ($p < 0,05$).

Campioni	Condizione del suolo	Acido Tartarico	Acido Malico	Acido Succinico	Acido Tartarico/ Acido Malico
1 SynCom	Tillage	1,075±0,045 ^{cd}	0,092±0,003 ^{ab}	0,057±0,001 ^{abc}	11,643
2 Controllo	Tillage	1,174±0,047 ^{bcd}	0,096±0,002 ^{ab}	0,060±0,002 ^{abc}	12,118
3 AMF	Tillage	1,409±0,056 ^{ab}	0,121±0,008 ^a	0,072±0,004 ^a	11,571
4 AMF	Tillage	1,079±0,018 ^{cd}	0,096±0,00 ^{ab}	0,058±0,002 ^{abc}	11,171
5 SynCom	Tillage	0,952±0,081 ^d	0,079±0,010 ^{ab}	0,048±0,005 ^{bc}	12,060
6 Controllo	Tillage	0,940±0,027 ^d	0,103±0,001 ^{ab}	0,055±0,005 ^{abc}	9,078
7 Controllo	Tillage	1,689±0,066 ^a	0,076±0,019 ^{ab}	0,048±0,007 ^{bc}	22,994
8 AMF	Tillage	0,962±0,0152 ^d	0,096±0,008 ^{ab}	0,047±0,003 ^{bc}	10,042
9 SynCom	Tillage	0,983±0,038 ^d	0,088±0,001 ^{ab}	0,044±0,00 ^c	11,166
10 SynCom	No Tillage	0,871±0,043 ^d	0,111±0,011 ^a	0,056±0,003 ^{abc}	7,836
11 Controllo	No Tillage	1,335±0,001 ^{bc}	0,115±0,030 ^a	0,066±0,005 ^{ab}	12,05
12 AMF	No Tillage	0,924±0,165 ^d	0,114±0,015 ^a	0,057±0,003 ^{abc}	8,054
13 AMF	No Tillage	1,405±0,001 ^{ab}	0,109±0,027 ^a	0,059±0,005 ^{abc}	13,204
14 SynCom	No Tillage	0,917±0,052 ^d	0,119±0,005 ^a	0,063±0,005 ^{abc}	7,664
15 Controllo	No Tillage	1,438±0,00 ^{ab}	0,109±0,03 ^a	0,065±0,01 ^{ab}	13,552
16 Controllo	No Tillage	0,938±0,172 ^d	0,079±0,005 ^{ab}	0,056±0,004 ^{abc}	11,800
17 AMF	No Tillage	1,014±0,185 ^{cd}	0,067±0,006 ^{ab}	0,061±0,008 ^{abc}	15,106
18 SynCom	No Tillage	1,679±0,004 ^a	0,049±0,017 ^b	0,059±0,006 ^{abc}	36,017

Tra i tre acidi, quello con la maggior variabilità è l'acido tartarico, con valori compresi tra 0,871 g/L (campione 10) e 1,679 g/L (campione 18), entrambi appartenenti al gruppo SynCom (campo lavorato). I risultati nel loro complesso presentano alcune differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda l'acido malico, la variabilità è meno estesa: i campioni presentano valori compresi in un range tra 0,049 g/L (campione 18) e 0,121 g/L (campione 3). In questo caso, a differenza del tartarico, i due valori estremi appartengono a due trattamenti differenti, rispettivamente SynCom e AMF.

L'acido succinico, presente in minor quantità rispetto agli altri due, è a valori compresi tra 0,044 g/L (campione 9) e 0,072 g/L (campione 3). Come per il malico, i due estremi sono relativi uno al trattamento SynCom e l'altro a quello AMF.

Questi valori risultano inferiori rispetto quanto si può riscontrare in letteratura: ad esempio, sono stati quantificati gli acidi organici in 17 specie differenti di uva in due annate differenti, (2018 e 2019). Per quanto riguarda l'acido tartarico il range individuato è pari a 1,48-10,99 g/L, per il malico tra 1,09 g/L e 9,68 e per il succinico tra 0,11-1,13 g/L.¹⁰⁰

Avendo ottenuto dati inferiori rispetto a quelli presenti in letteratura, il rapporto tra acido tartarico e acido malico risulta essere superiore rispetto ai valori di riferimento. Nello studio citato, per ciascuna varietà c'è una differenza, seppur minima, tra le due annate.¹⁰⁰ Il fattore che potrebbe incidere sul contenuto degli acidi organici è la differenza tra un'annata più piovosa oppure una più calda.

Comparazione trattamenti biologici applicati ai campioni

Nel suolo *tillage*, per quanto riguarda l'acido tartarico, i valori ottenuti presentano alcune differenze statisticamente significative: infatti, il campione con un valore maggiore rispetto a tutti gli altri è il campione 7, appartenente al gruppo Controllo (1,69 g/L), mentre il campione 6, del gruppo Controllo, mostra il valore più basso (0,94 g/L) (Figura 54).

Per quanto riguarda il trattamento AMF, i relativi campioni si collocano in una fascia di poco superiore rispetto al gruppo SynCom.

Alcuni studi affermano che piante micorrizate presentano un contenuto maggiore di acidi, soprattutto tartarico, influenzando la maturazione finale del frutto e quindi la sua acidità.¹⁰¹ Il gruppo SynCom appare invece a valori più vicini al limite inferiore del range. Questi valori potrebbero essere il risultato del metabolismo delle comunità microbiche, in grado di alterare il quantitativo finale di acidi all'interno del frutto maturo.

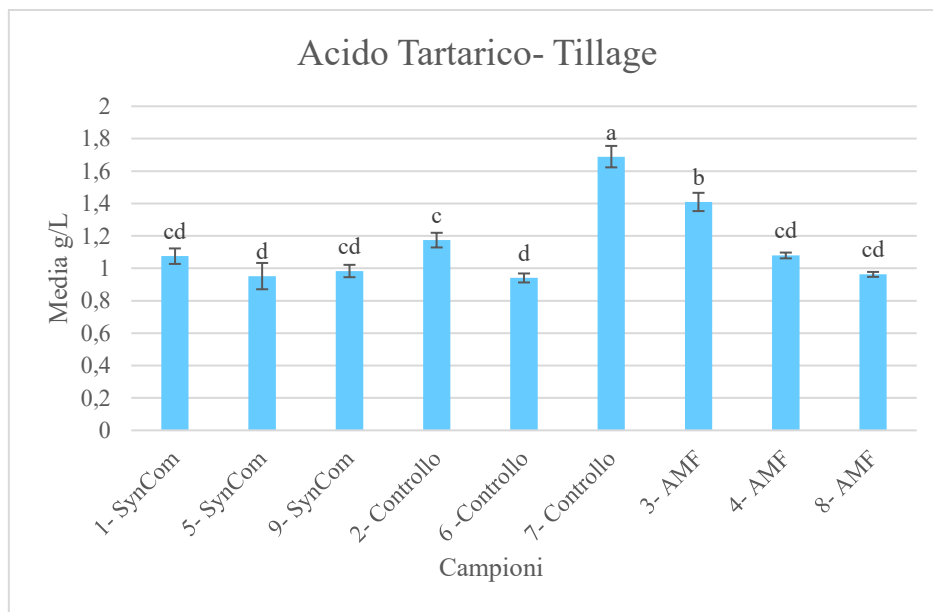


Figura 57: Valori di concentrazione in acido tartarico nel campo *tillage*.

Per quanto riguarda il campo *no-tillage*, il campione con valore maggiore di acido tartarico è il 18, appartenente al gruppo SynCom, (1,68 g/L), mentre il campione 12, del gruppo AMF, rappresenta il valore minimo, (0,92 g/L) (Figura 57).

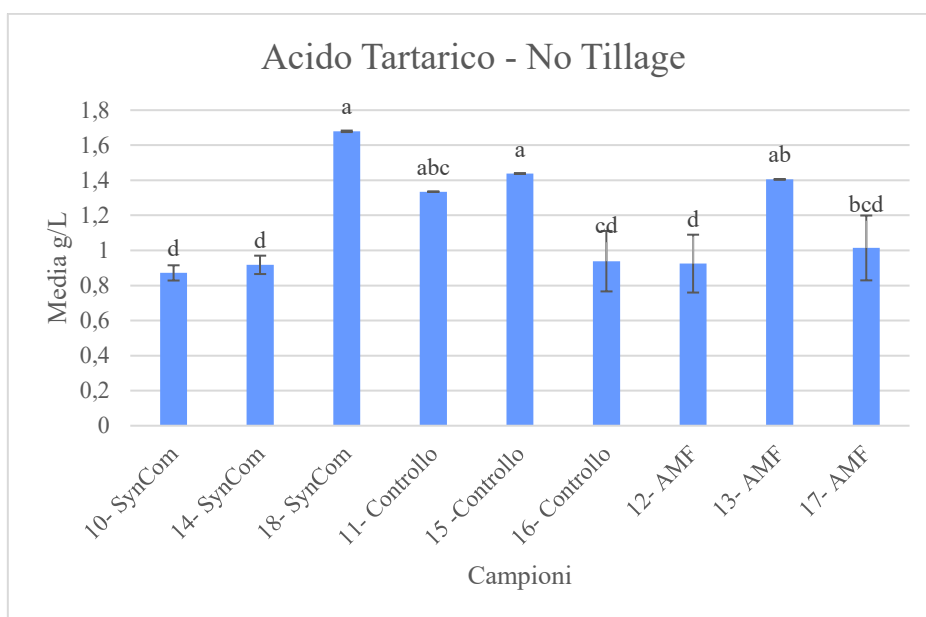


Figura 58: Valori dei campioni di concentrazioni di acido tartarico nel campo *no-tillage*.

Per quanto riguarda gli altri due acidi organici, ovvero malico e succinico, questi presentano differenze statisticamente significative solamente nei campioni appartenenti al campo *tillage*: per il malico, i valori maggiori sono relativi al gruppo AMF, con il campione 3 che raggiunge un valore di 0,122 g/L, mentre il campione 7, del gruppo Controllo, presenta il valore minore, pari a 0,07 g/L.

Anche per l'acido succinico il valore maggiore è sempre rappresentato dal campione 3, mentre il valore inferiore è attribuibile al campione 9, ossia un campione del gruppo SynCom, che presenta un valore pari a 0,044 g/L. Come per l'acido tartarico, alcuni studi mostrano un aumento dei valori di acidi in piante di uva trattate con AMF.¹⁰¹

Comparazione in funzione della gestione agronomica del suolo

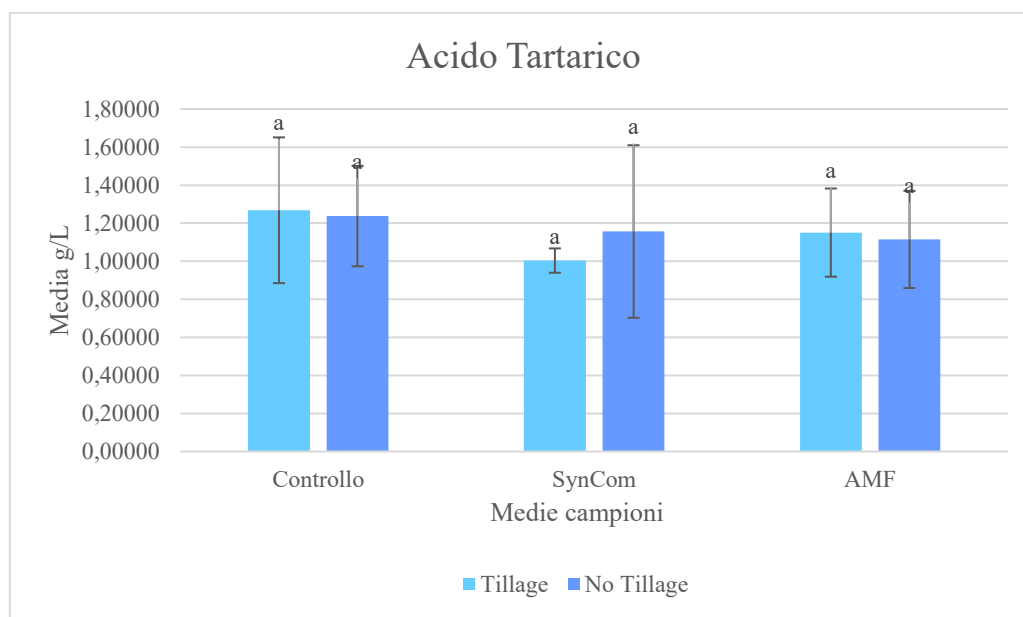


Figura 59: Valori medi di acido tartarico in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

In Figura 59 è riportato il confronto tra i valori medi di concentrazione di acido tartarico dei campioni distinguendo campo *tillage* e campo *no-tillage*. In questo caso, i campioni non presentano differenze statisticamente significative, anche se i campioni dei gruppi Controllo presentano valori medi superiori ai due trattamenti, in entrambi i campi.

La differenza maggiormente significativa è individuata nel trattamento SynCom, che mostra valori medi superiori nel campo *no-tillage*, pari a 1,156 g/L, rispetto al valore medio del terreno *tillage*, pari a 1,00 g/L.

Anche per quanto riguarda l'acido malico, possono essere fatte valutazioni simili all'acido tartarico. L'unico che mostra alcune differenze significative è l'acido succinico (Figura 57): infatti, quest'ultimo presenta valori maggiori nel gruppo Controllo, ma, a differenza degli altri, con differenze significative a livello del gruppo AMF. Il gruppo AMF presenta valori simili al gruppo SynCom, ma a differenza di questo, i valori non si discostano tra un terreno e l'altro.

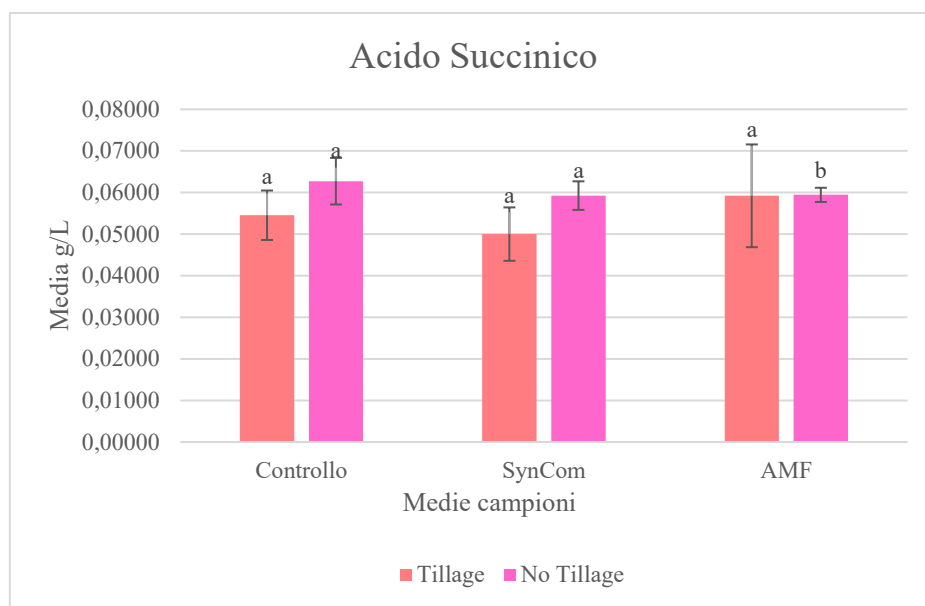


Figura 60: Valori medi di concentrazioni di acido succinico in relazione ai diversi trattamenti microbiologici (Controllo, SynCom, AMF) e metodi di gestione del suolo (*tillage* e *no-tillage*).

In letteratura si rileva, in alcuni studi, come la lavorazione del terreno incida sull'acidità del frutto maturo.¹⁰² Ci potrebbe essere una correlazione tra terreno *no-tillage* e inoculo di SynCom, per il quale si è registrato un aumento, anche se ridotto rispetto al Controllo, del valore di questo acido e questo meriterebbe analisi più approfondite.

4.5. Analisi statistica multivariata

I dati ottenuti e discussi nei paragrafi precedenti sono stati successivamente rielaborati mediante tecniche di analisi statistica multivariata, con l'obiettivo di individuare le informazioni più rilevanti e descrivere in modo sintetico la variabilità complessiva del dataset.

In particolare, è stata applicata l'Analisi delle Componenti Principali (*Principal Component Analysis*, PCA), una tecnica statistica che consente di trasformare le variabili originali in un nuovo insieme di variabili non correlate tra loro, denominate componenti principali (PC). Tali componenti sono ottenute come combinazioni lineari delle variabili di partenza e risultano tra loro ortogonali; la PCA permette quindi di individuare le direzioni lungo le quali la variabilità è massima, organizzando le componenti principali secondo un ordine di varianza decrescente, dalla prima all'ultima.

L'utilizzo di questa metodologia consente di ridurre la dimensionalità del dataset, mantenendo soltanto le componenti che spiegano la maggior quota di variabilità dei dati, escludendo quelle il cui contributo informativo risulta trascurabile.

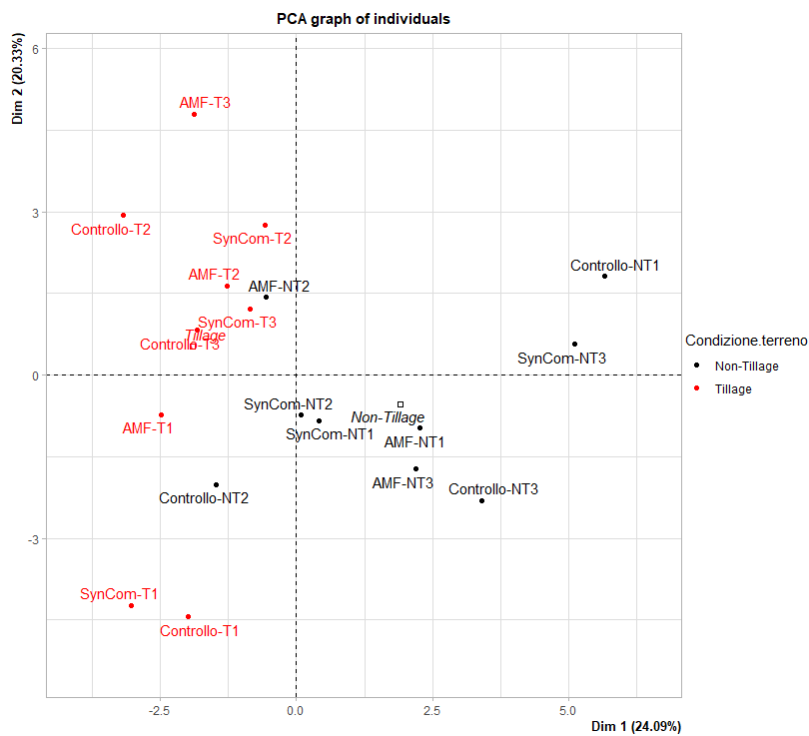
Nell’elaborazione dei dati mediante PCA sono stati inseriti i dati relativi alla composizione centesimale (umidità, pH, solidi solubili, acidità titolabile e indice di maturazione), alle analisi spettrofotometriche (polifenoli totali, flavonoidi, antociani totali e monomerici, proantocianidine, attività antiradicalica e antiossidante) e alle analisi in HPLC (polifenoli, zuccheri, acidi organici).

Al fine di valutare quantitativamente il contributo di ciascuna componente principale alla variabilità complessiva del dataset, sono state calcolate la varianza percentuale spiegata (V%) e la varianza percentuale cumulativa (Cum V%). Complessivamente, sono state ottenute 17 componenti principali su un dataset complessivo di 30 variabili, questo indica che tra i dati ottenuti non si evidenziano particolari correlazioni tra di loro, ma è possibile una riduzione della variabilità

Tabella 21: Varianza spiegata dalle prime cinque componenti principali sulla totalità dei dati analizzati

Dimensione	% Var	Cum V %
PC1	24,09	24,09
PC2	20,33	44,42
PC3	11,19	55,61
PC4	11,11	66,72
PC5	8,87	75,59

In figura 61 è riportata la rappresentazione grafica dei campioni sulle prime due componenti (PC1 vs PC2) e i contributi delle variabili chimiche rispetto alla distribuzione nello spazio dei campioni.



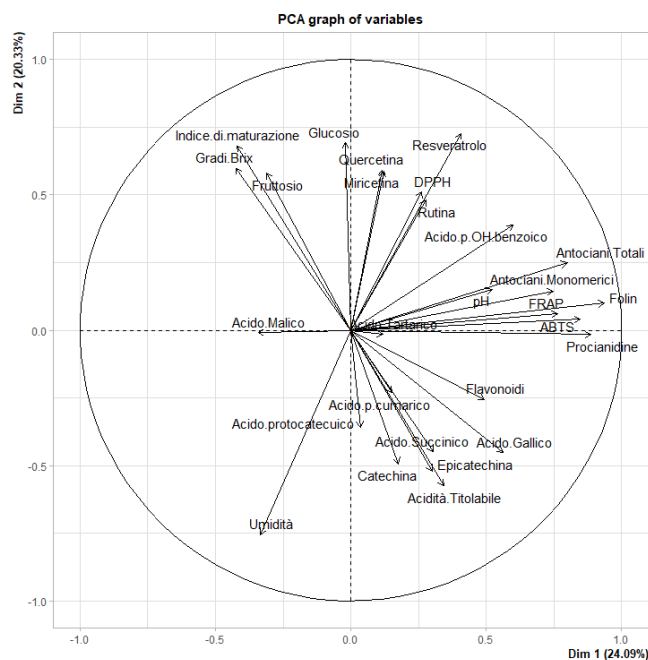


Figura 61: Rappresentazione grafica dei risultati della PCA sulle prime due dimensioni (PC1 e PC2); nella prima è riportato il grafico che rappresenta il posizionamento dei campioni analizzati, mentre nella seconda è riportato il grafico della correlazione delle variabili.

Nelle Tabelle 22 e 23 sono riportati i parametri che hanno influito maggiormente sulla prima e sulla seconda componente principale.

Si può notare come tutti i parametri siano correlati significativamente con la prima componente principale, in particolar modo i polifenoli totali, con un coefficiente di correlazione pari a 0,936, valore maggiore, a seguire il contenuto in procianidine (0,877) e l'attività antiradicalica nel saggio dell'ABTS (0,847).

Tabella 22: Correlazione e significatività dei parametri chimici con la prima componente principale.

Parametro	Correlation	p.value
Polifenoli totali	0.936	1,09E-02
Procianidine	0.887	9,20E-01
ABTS	0.847	8,94E+00
Antociani Totali	0.799	6,97E+01
FRAP	0.764	2,22E+02
Antociani Monomerici	0.747	3,58E+02
Flavonoidi	0.493	3,73E+04

Inoltre, sulla prima componente è possibile osservare una correlazione tra i parametri e la tipologia del terreno: infatti, anche se con un valore di R^2 relativamente basso (0,536), risulta una separazione tra i due terreni. La condizione del terreno *tillage* è correlata negativamente alla prima componente (-1,901), mentre la condizione *non-tillage* è correlata positivamente (1,901), a conferma di quanto individuato nella discussione dei singoli parametri.

Qualitativa		
	R^2	p.value
Condizione terreno	0.5360154	0.0005514747
	Estimate	p.value
Condizione terreno=Non-Tillage	1.901.531	0.0005514747
Condizione terreno=Tillage	-1.901.531	0.0005514747

Passiamo ora ad analizzare i valori della seconda componente.

Tabella 23: Correlazione e significatività dei parametri chimici con la seconda componente principale.

Dim.2	Correlation	p.value
Resveratrolo	0.726	0.0006350866
Glucosio	0.692	0.0014557112
Indice di maturazione	0.681	0.0018552170
Gradi Brix	0.598	0.0086544628
Quercetina	0.591	0.0097722233
Acidità.Titolabile	-0.575	0.0125197115

In questo caso si riscontrano sia correlazioni positive con la seconda componente, ad esempio il resveratrolo con un valore di correlazione pari a 0,7263 (valore massimo), sia una correlazione negativa, in particolare l'acidità titolabile con un valore di correlazione pari a -0,575.

In Figura 62 è riportata la rappresentazione grafica dei campioni secondo due diverse componenti (PC1 vs PC3) e il contributi delle variabili chimiche rispetto alla distribuzione nello spazio dei campioni.

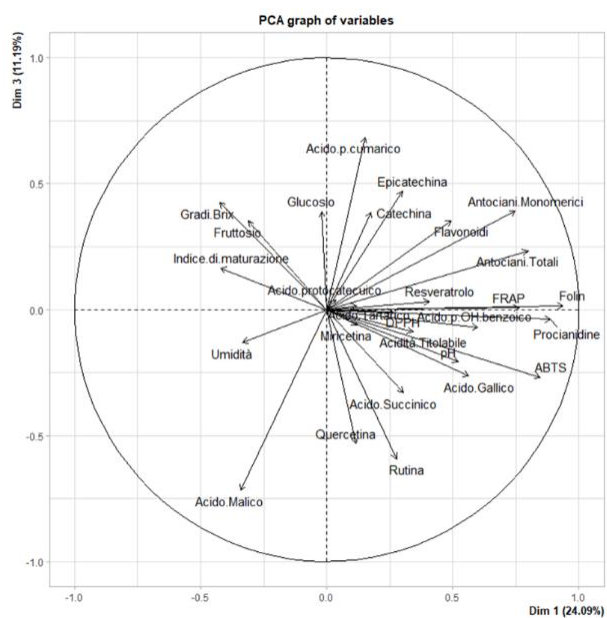
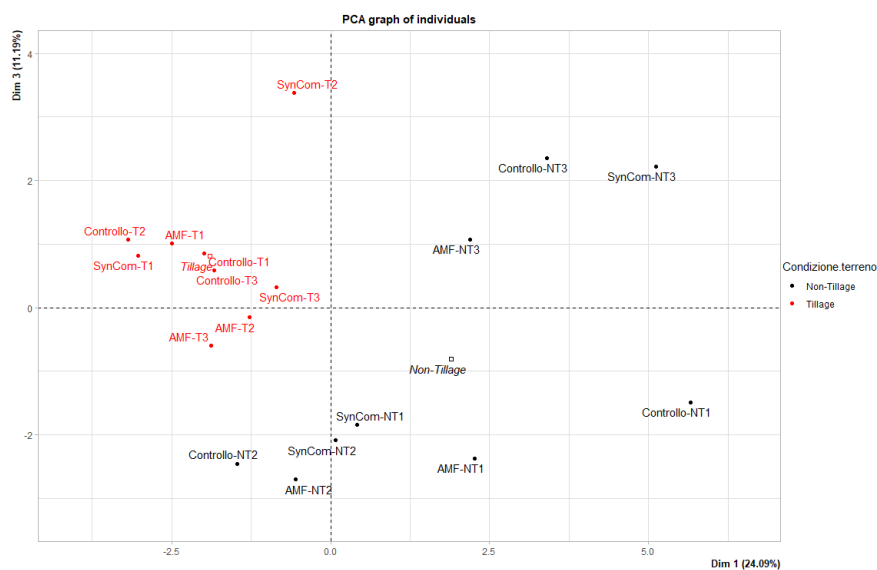


Figura 62: Rappresentazione grafica dei risultati della PCA sulle prime due dimensioni (PC1 e PC3); nella prima è riportato il grafico che rappresenta il posizionamento dei campioni analizzati, mentre nella seconda è riportato il grafico della correlazione delle variabili.

Per quanto riguarda la terza dimensione, questa presenta valori che correlano sia positivamente, sia negativamente e questi valori sono riportati nella tabella 24.

Tabella 24: Correlazione e significatività dei parametri chimici con la terza componente principale.

Dim.3	Correlation	p.value
Acido p-cumarico	0.6848131	0.0017148771
Epicatechina	0.4706125	0.0487154835
Quercetina	-0.5313012	0.0232700880
Rutina	-0.5925244	0.0095644527
Acido Malico	-0.7172627	0.0008065016

In relazione ai parametri relativi alla frazione polifenolica, sono state osservate alcune correlazioni significative, ottenute mediante analisi di correlazione di Pearson (figura 63), una seconda modalità di analisi dei dati nel loro complesso.

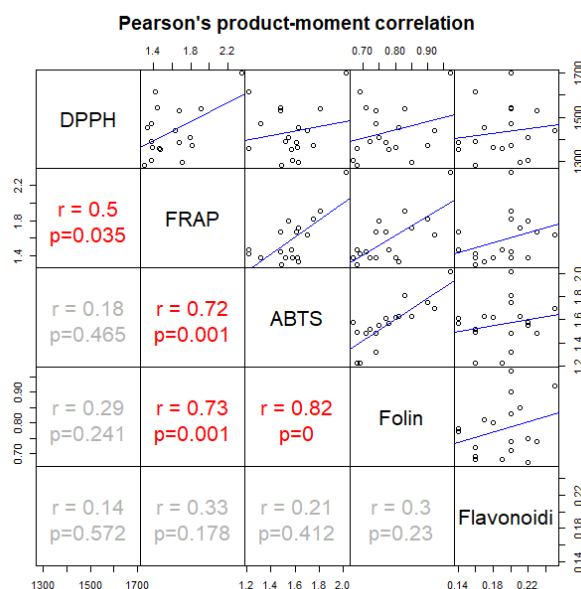


Figura 63: Risultato della correlazione di Pearson tra i parametri flavonoidi, polifenoli totali (Folin), potere antiossidante (FRAP) e antiradicalico (DPPH e ABTS).

Come si può osservare in Figura 63, sono evidenziabili quattro correlazioni significative: tra i valori ottenuti mediante il saggio DPPH, e quelli relativi al saggio FRAP; tra i valori ottenuti dai saggi ABTS e FRAP; tra i valori relativi al saggio FRAP e i polifenoli totali (Folin) e, con un valore di correlazione maggiore, pari a 0,82, tra il potere antiradicalico determinato mediante saggio ABTS e i polifenoli totali (Folin). Non si sono riscontrate correlazioni tra i flavonoidi e gli altri parametri.

5. Conclusioni e prospettive future

Nel presente studio, condotto nell'ambito del progetto di ricerca Micro4Life, sono stati analizzati 18 campioni di uva Nebbiolo, provenienti dal sito viticolo di Fontanafredda, situato nel comune di Serralunga d'Alba (CN). L'obiettivo principale della ricerca è stato valutare l'effetto di due trattamenti biologici innovativi, ovvero l'inoculo nel suolo di funghi micorrizici arbuscolari (AMF) e di comunità microbiche sintetiche (SynCom) su diversi parametri compositivi dell'uva. Parallelamente, è stato considerato anche l'effetto della gestione agronomica del suolo, confrontando due differenti sistemi colturali: lavorazione del terreno (*tillage*) e gestione conservativa senza lavorazione (*no-tillage*).

Per quanto riguarda i trattamenti biologici, le analisi effettuate non hanno evidenziato differenze particolarmente degne di nota e con una limitata differenza significativa tra i gruppi di campioni. Tuttavia, sono emerse alcune tendenze che meritano sicuramente di essere considerate. In particolare, i campioni sottoposti ad inoculo con AMF hanno mostrato valori medi leggermente superiori per quanto riguarda il contenuto di polifenoli totali, proantocianidine e zuccheri (mediante analisi in HPLC), mantenendo al contempo una buona omogeneità tra le repliche sperimentali, soprattutto nei campioni provenienti da suoli non lavorati. Al contrario, i campioni trattati con SynCom si sono distinti per una maggior concentrazione di flavonoidi e antociani.

Nonostante queste tendenze, in alcune analisi, come quella relativa ai polifenoli totali, è stata osservata una marcata variabilità tra i campioni, che non ha consentito di ottenere una chiara lettura dei risultati e, di conseguenza, di attribuire con certezza tali differenze all'efficacia dei trattamenti applicati.

Differenze più evidenti sono emerse considerando il sistema di gestione del suolo. I campioni provenienti da vigneti gestiti mediante lavorazione del terreno (*tillage*), presentano generalmente valori più elevati di solidi solubili, un indice di maturazione più alto e anche, seppur non in modo consistente, una quantità maggiore di zuccheri nel frutto: questo indica, in genere, uno stadio di maturazione del frutto più avanzato. Al contrario, nei campioni coltivati in suolo non lavorato (*no-tillage*), è stato osservato un maggior accumulo di composti fenolici e un incremento dell'attività antiossidante. Questo risultato potrebbe essere correlato ad una maggior stabilità biologica e microbiologica del suolo, favorita dall'assenza di lavorazioni meccaniche. È inoltre interessante osservare come la combinazione tra inoculo con AMF e gestione del suolo *no-tillage* sembri mostrare risultati più coerenti e riproducibili tra i campioni, nella maggior parte delle analisi effettuate.

Il mancato raggiungimento della significatività statistica per diversi parametri analizzati può essere attribuito ad una serie di fattori. In primo luogo, il periodo di tempo intercorso tra l'inoculo dei microrganismi, avvenuto nella primavera del 2024, e la raccolta dell'uva, avvenuta nell'ottobre dello stesso anno. Tale intervallo, infatti, potrebbe non essere stato sufficiente per consentire una piena integrazione di AMF e SynCom nella rizosfera. Inoltre, lo studio è stato condotto su un vigneto impiantato da dieci anni circa, quindi un sistema agronomico già stabilizzato dal punto di vista fisiologico. In tali condizioni, l'introduzione di nuovi microrganismi può essere limitata dalla presenza del microbiota autoctono del suolo, che tende a ostacolare la colonizzazione delle radici da parte degli inoculi esterni. A ciò si aggiunga il fatto che la vite, essendo una specie perenne, presenta un apparato radicale complesso e relativamente stabile, che rende più lenta la diffusione e l'insediamento di nuovi microrganismi rispetto a quanto si possa osservare nelle colture annuali. Di conseguenza, gli effetti benefici degli inoculi tendono a manifestarsi progressivamente nel tempo e risultano più difficili da rilevare nel breve periodo.

Alla luce di questi risultati, appare evidente come le potenzialità degli inoculi microbici debbano essere valutate su un arco temporale più ampio. Il proseguimento dello studio ha già previsto l'estensione su una seconda annata sperimentale e di includere l'analisi di ulteriori parametri fisiologici della pianta, quali la fotosintesi netta, il potenziale idrico e lo sviluppo dell'apparato radicale. Inoltre, l'integrazione di indagini microbiologiche, finalizzate alla valutazione del grado effettivo di colonizzazione della rizosfera, potrebbe consentire di comprendere meglio le dinamiche di interazione tra microrganismi inoculati, microbiota del suolo e pianta ospite.

6. Ringraziamenti

Come conclusione di questo elaborato, vorrei ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutato ad arrivare a questo traguardo.

Il primo ringraziamento lo dedico al Professore Coïsson Jean Daniel, per la disponibilità, i suoi preziosi consigli e il supporto fondamentale durante il tirocinio e la stesura dell'elaborato di Tesi.

Desidero ringraziare anche tutti i Dottorandi del Laboratorio, in particolare il mio correlatore, il Dott. Martoccia Manuel, il Dott. Jaouhari Yassine, e la Dott. Masini Sara, per avermi formato, per il supporto costante, e la pazienza avuta nei mesi di tirocinio.

Un ringraziamento speciale va ovviamente alle persone che hanno creduto in me, mi hanno sostenuto, e motivato per portare a termine questo percorso: i miei genitori e mio fratello. Grazie a te, Mamma, che ci sei sempre stata, supportandomi, gioendo con me e facendomi capire quanto valessi, senza smettere mai di credere in me e di avermi sempre dato la spinta giusta nei momenti di sconforto, i quali, dopo le tue parole, apparivano meno difficili. Grazie a te, Thomas, il mio fratellino ormai uomo adulto... hai vissuto un periodo difficile facendoci un po' preoccupare, però sono fiero di te per esserne uscito più forte di prima e soprattutto senza nasconderti. Non farlo mai più, sii sempre te stesso e credi in te, perché sei una forza della natura. Grazie a te, papà, che mi sei stato vicino, sostenendomi, credendo in me e sopportando i miei continui appunti da stampare... ora come farai senza? Vi voglio un mondo di bene, non so come farei senza di voi...

Ringrazio i miei nonni, Mary e Berto, i miei zii, Barbara e Filippo, e le mie cugine, anzi le mie cuggitte come le chiamo io, Noemi e Nicole, il cui supporto costante, la fiducia che hanno sempre risposto in me, mi ha aiutato ad arrivare qui ora. Senza tutti voi sarei perso. Vi voglio bene.

Un ringraziamento un po' particolare va ai miei tre pelosetti, i miei cagnolini Pepe, Toby e Tiny, presenza costante durante tutto il percorso, non lasciandomi mai da solo. Siete speciali!

Infine, vorrei ringraziare tutte le persone che ho incontrato in questo percorso universitario, i quali hanno migliorato le mie giornate, gli esami, facendo sembrare tutto più bello: i miei compagni di corso Elisa, Giulia, Luca, Maria Chiara, Alessia, Letizia, Sofia, Serena, Veronica, Sabrina, diventati amici, presenze costanti, il cui supporto, anche se a volte a distanza, è stato fondamentale, e i miei compagni di tirocinio Francesca, Martina, Cristina, Elisa, Giulia, Benedetta, Paolo. Vi voglio bene.

7. Bibliografia

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT- Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/QCL>. Consultato 19/12/2025
2. Creasy, G. L. & Creasy, L. L. *Grapes, 2nd Edition*. Boston, MA; Wallingford, UK: CABI. (2018).
3. Statistiche nazionali | OIV. <https://www.oiv.int/it/what-we-do/country-report?oiv>. Consultato 19/12/2025
4. Sicheri, G. Viticoltura. Hoepli. Milano. (2008).
5. Grassi, F. & De Lorenzis, G. Back to the Origins: Background and Perspectives of Grapevine Domestication. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 4518 (2021).
6. Vitis vinifera. Wikipedia (2025). Consultato 25/01/2026
7. Vite - Enciclopedia. Treccani <https://www.treccani.it/enciclopedia/vite/> (2025). Consultato 25/01/2026
8. Hernâni Gerós, M., Chaves M., & Delrot S. *The Biochemistry of the Grape Berry*. Singapore 048619. (2012).
9. Nebbiolo. Wikipedia (2024). Consultato 18/05/2025
10. Mazzarino, S. Il mercato dei vini da uve ‘Nebbiolo’. Quaderni di Scienze Viticole e Enologiche. 28, 207-222 (2006).
11. Chorti, E., Guidoni, S., Ferrandino, A. & Novello, V. Condizioni microclimatiche e profilo antocianico della cultivar ‘Nebbiolo’. *Italus Hortus* 17, 54–60 (2010).
12. Locatelli, M., Travaglia, F., Coïsson, J. D., Bordiga, M. & Arlorio, M. Phenolic composition of Nebbiolo grape (*Vitis vinifera* L.) from Piedmont: characterization during ripening of grapes selected in different geographic areas and comparison with Uva Rara and Vespolina cv. *European Food Research and Technology* 242, 1057–1068 (2016).
13. Asproudi, A. et al. Proanthocyanidin composition and evolution during grape ripening as affected by variety: Nebbiolo and Barbera cv. *OENO One* 49, 59–69 (2015).
14. Pagliarani, C. et al. Distinct Metabolic Signals Underlie Clone by Environment Interplay in “Nebbiolo” Grapes Over Ripening. *Frontiers in Plant Science*. 10, (2019).
15. Triolo, R., Pisciotta, A. & van Leeuwen, C. Impact of vine water status on berry mass and berry tissue development of Cabernet franc (*Vitis vinifera* L.), assessed at berry level. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 5711–5719 (2019).
16. Garcia, J., Zheng, W., Balda, P. & Martinez de Toda, F. Varietal differences in the sugar content of red grapes at the onset of anthocyanin synthesis. *Vitis* **56**, 15–18 (2017).
17. Liang, Z. et al. Changes of Polyphenols, Sugars, and Organic Acid in 5 Vitis Genotypes during Berry Ripening. *Journal of Food Science* **76**, C1231–C1238 (2011).

18. Alston, J. M., Fuller, K. B., Lapsley, J. T. & Soleas, G. Too Much of a Good Thing? Causes and Consequences of Increases in Sugar Content of California Wine Grapes. *Journal of Wine Economics* **6**, 135–159 (2011).
19. Garrido, J. & Borges, F. Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International* **54**, 1844–1858 (2013).
20. Beckman, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**, 101–110 (2000).
21. Rasines-Perea, Z. & Teissedre, P.-L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules* **22**, 68 (2017).
22. Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D. & Trainotti, D. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **15**, 27–35 (2009).
23. Jeffery, D. W., Parker, M. & Smith, P. Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **14**, 153–161 (2008).
24. Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M. D., Arapitsas, P. & Bavaresco, L. Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 19651–19669 (2013).
25. Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. & Hermosín-Gutiérrez, I. Red-Color Related Phenolic Composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) Grapes and Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**, 7883–7891 (2009).
26. Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M. & Gómez-Plaza, E. Anthocyanin fingerprint of grapes: environmental and genetic variations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 1460–1467 (2006).
27. Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L. & Silva, P. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules* **25**, 3809 (2020).
28. Rauf, A. et al. Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **116**, 108999 (2019).
29. Hanlin, R. L., Kelm, M. A., Wilkinson, K. L. & Downey, M. O. Detailed Characterization of Proanthocyanidins in Skin, Seeds, and Wine of Shiraz and Cabernet Sauvignon Wine Grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**, 13265–13276 (2011).

30. Berretta, M. et al. Resveratrol in Cancer Patients: From Bench to Bedside. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 2945 (2020).
31. Ferreira, V. & Lopez, R. The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes. *Biomolecules* **9**, 818 (2019).
32. Fenoll, J., Manso, A., Hellín, P., Ruiz, L. & Flores, P. Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening. *Food Chemistry* **114**, 420–428 (2009).
33. He, Y. et al. Research progress of wine aroma components: A critical review. *Food Chemistry* **402**, 134491 (2023).
34. de Lorenzis, G. et al. Study of intra-varietal diversity in biotypes of Aglianico and Muscat of Alexandria (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **23**, 132–142 (2017).
35. Leeuwen, C. van. Soil-related terroir factors: a review. *OENO One* **52**, 173–188 (2018).
36. Costantini, E. A. C. & Bucelli, P. Soil and Terroir. *In Soil Security for Ecosystem Management: Mediterranean Soil Ecosystems I* (eds. Kapur, S. & Erşahin, S.) **97**–133 Springer International Publishing, Cham, (2014).
37. Libohova, Z., Seybold, C. & Wills, S. Reevaluating the effects of soil organic matter and other properties on available water-holding capacity using the National Cooperative Soil Survey Characterization Database. *Journal of Soil and Water Conservation* **73**, 411–421 (2018).
38. Lazcano, C., Decock, C. & Wilson, S. G. Defining and Managing for Healthy Vineyard Soils, Intersections with the Concept of Terroir. *Frontiers in Environmental Science*. **8**, 1–17 (2020).
39. Visconti, F., López, R. & Olego, M. Á. The Health of Vineyard Soils: Towards a Sustainable Viticulture. *Horticulturae* **10**, 154 (2024).
40. Cataldo, E., Fucile, M. & Mattii, G. B. A Review: Soil Management, Sustainable Strategies and Approaches to Improve the Quality of Modern Viticulture. *Agronomy* **11**, 2359 (2021).
41. Lavorazione del terreno | Definizione, tipi, attrezzature, pratiche, importanza e fatti | Britannica. <https://www.britannica.com/topic/tillage>. Consultato il 24/01/2026
42. Triplett Jr., G. B. & Dick, W. A. No-Tillage Crop Production: A Revolution in Agriculture! *Agronomy Journal* **100**, S-153-S-165 (2008).
43. Linares Torres, R., De La Fuente Lloreda, M., Junquera Gonzalez, P., Lissarrague García-Gutierrez, J. r. & Baeza Trujillo, P. Effect of soil management strategies on the characteristics of the grapevine root system in irrigated vineyards under semi-arid conditions. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **24**, 439–449 (2018).
44. O. J. Idowu & S. Angadi. Understanding and Managing Soil Compaction in Agricultural Fields. *College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences* 1–8 (2013).

45. Sale, V. et al. Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 84, 38–52 (2015).
46. Gristina, L., Novara, A. & Minacapilli, M. Rethinking vineyard ground management to counter soil tillage erosion. *Soil and Tillage Research* 217, 105275 (2022).
47. Roy, H. G., Fox ,Dennis M. & and Emsellem, K. Impacts of vineyard area dynamics on soil erosion in a Mediterranean catchment (1950-2011). *Journal of Land Use Science* 13, 118–129 (2018).
48. Agricoltura conservativa. Wikipedia (2025). Consultato 24/05/2025
49. Derpsch, R. et al. Why do we need to standardize no-tillage research? *Soil and Tillage Research* 137, 16–22 (2014).
50. Blanco-Canqui, H. & Wortmann, C. S. Does occasional tillage undo the ecosystem services gained with no-till? A review. *Soil and Tillage Research* 198, 104534 (2020).
51. Beaumelle, L. et al. Benefits of increased cover crop diversity for predators and biological pest control depend on the landscape context. *Ecological Solutions and Evidence* 2, e12086 (2021).
52. Obour, A. K., Holman, J. D., Simon, L. M. & Schlegel, A. J. Strategic Tillage Effects on Crop Yields, Soil Properties, and Weeds in Dryland No-Tillage Systems. *Agronomy* 11, 662 (2021).
53. FAO. The Future of Food and Agriculture – Alternative Pathways to 2050. FAO (2018).
54. Cardell, M. F., Amengual, A. & Romero, R. Future effects of climate change on the suitability of wine grape production across Europe. *Reg Environ Change* 19, 2299–2310 (2019).
55. Rizosfera. Wikipedia (2024). Consultato 25/01/2026
56. Darriaut, R. et al. Grapevine rootstock and soil microbiome interactions: Keys for a resilient viticulture. *Horticulture Research* 9, uhac019 (2022).
57. Wang, B. & Qiu, Y.-L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16, 299–363 (2006).
58. Basiru, S., Mwanza, H. P. & Hijri, M. Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Inoculant Benchmarks. *Microorganisms* 9, 81 (2021).
59. Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E. & Reinhardt, D. Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi – From Ecology to Application. *Frontiers in Plant Science*. 9, 1–14 (2018).
60. Moukarzel, R. et al. Vineyard management systems influence arbuscular mycorrhizal fungi recruitment by grapevine rootstocks in New Zealand. *Journal of Applied Microbiology* 135, lxae211 (2024).
61. Trouvelot, S. et al. Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*. 35, 1449–1467 (2015).

62. Sensoy, R. Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungus (AMF) and whey applications on the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cuttings exposed to salt stress. *Journal of Elementology* 27, 507–519 (2022).
63. Cardinale, M. et al. Vineyard establishment under exacerbated summer stress: effects of mycorrhization on rootstock agronomical parameters, leaf element composition and root-associated bacterial microbiota. *Plant Soil* 478, 613–634 (2022).
64. Bennett, A. E. & Groten, K. The Costs and Benefits of Plant–Arbuscular Mycorrhizal Fungal Interactions. *Annual Review of Plant Biology* 73, 649–672 (2022).
65. Christensen P. L., Smart D. R. Proceedings of the Soil Environment and Vine Mineral Nutrition Symposium. *American Society of Enology and Viticulture* 20, 49–60 (2005).
66. Shayanthan, A., Ordoñez, P. A. C. & Oresnik, I. J. The Role of Synthetic Microbial Communities (SynCom) in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Agronomy*. 4, 1–13 (2022).
67. Liu, Y.-X., Qin, Y. & Bai, Y. Reductionist synthetic community approaches in root microbiome research. *Current Opinion in Microbiology* 49, 97–102 (2019).
68. Ford, C. M. *The Biochemistry of the Grape Berry*. Bentham Books. Singapore (2012).
69. Kozikova, D., Pascual, I. & Goicoechea, N. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improve the Performance of Tempranillo and Cabernet Sauvignon Facing Water Deficit under Current and Future Climatic Conditions. *Plants (Basel)* 13, 1155 (2024).
70. Torres, N., Yu, R. & Kurtural, S. K. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculation and Applied Water Amounts Modulate the Response of Young Grapevines to Mild Water Stress in a Hyper-Arid Season. *Front. Plant Sci.* 11, 622209 (2021).
71. Zumkeller, M. et al. Cover crops and no-tillage show negligible effects on grapevine physiology in mediterranean vineyard agroecosystems. *OENO One* 57, 29–46 (2023).
72. Karoglan, M. et al. Mycorrhizal Fungi Enhance Yield and Berry Chemical Composition of in Field Grown “Cabernet Sauvignon” Grapevines (*V. vinifera* L.). *Agriculture* 11, 615 (2021).
73. Qiao, R. et al. Plant growth promotion and biocontrol properties of a synthetic community in the control of apple disease. *BMC Plant Biology* 24, 546 (2024).
74. Jia, H.-M., Zheng, C.-W., Wu, Y.-R., Wang, H. & Yan, Z.-Y. Metabolomic approach reveals the mechanism of synthetic communities to promote high quality and high yield of medicinal plants—danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bge.). *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 11, 120 (2024).
75. Chrysargyris, A. et al. Assessing the Impact of Drought Stress and Soil Cultivation in Chardonnay and Xynisteri Grape Cultivars. *Agronomy* 10, 670 (2020).

76. Kaya, O. et al. Optimizing Grape Quality Through Tillage and Organic Fertilization: A Comprehensive Analysis of Phenolic and Anthocyanin Variability Over Three Years. *Food Sci Nutr* 12, 9428–9442 (2024).
77. Liu, Q. et al. Comparison of Antioxidant Activities of Different Grape Varieties. *Molecules* 23, 2432 (2018).
78. Ceccanti, C.; Landi, M.; Antichi, D.; Guidi, L.; Manfrini, L.; Monti, M.; Tosti, G.; Frascioni, C. Bioactive Properties of Fruits and Leafy Vegetables Managed with Integrated, Organic, and Organic No-Tillage Practices in the Mediterranean Area: A Two-Year Rotation Experiment. *Agronomy*, 10 (6), 841. (2020)
79. Alam, M. Z., Choudhury, T. R. & Mridha, M. a. U. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Enhance Biomass Growth, Mineral Content, and Antioxidant Activity in Tomato Plants under Drought Stress. *Journal of Food Quality* 2023, 2581608 (2023).
80. Luo, X. et al. Depletion of protective microbiota promotes the incidence of fruit disease. *The ISME Journal* 18, wrac071 (2024).
81. Rolle, L., Torchio, F., Ferrandino, A. & Guidoni, S. Influence of Wine-Grape Skin Hardness on the Kinetics of Anthocyanin Extraction. *International Journal of Food Properties* 15, 249–261 (2012).
82. Muscas, E., Cocco, A., Mercenaro, L., Cabras, M., Lentini, A., Porqueddu, C., Nieddu, G. Effects of vineyard floor cover crops on grapevine vigor, yield, and fruit quality, and the development of the vine mealybug under a Mediterranean climate. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 237, 203–212 (2017).
83. Abad, J., Hermoso de Mendoza, I., Marin, D., Orcaray, L., Santesteban, L. Cover crops in viticulture. A systematic review (2): Implications on vineyard agronomic performance. *OENO One*. 2, 1-27. (2021)
84. Elikara, A. U. et al. Effect of Rhizobacteria Application on Nutrient Content, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, Color Properties and Fruit Characteristics of Strawberry Cultivars. *Processes* 12, 2242 (2024).
85. Asproudi A., Piano, F., Anselmi, G., Di Stefano, R., Bertolone, E., Borsa, D. Proanthocyanidin composition and evolution during grape ripening as affected by variety: Nebbiolo and Barbera cv. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 49, 59-69 (2015)
86. Aloisi, M. (2021). Carboidrati: struttura, classificazione e caratteristiche. *BioPills*. <https://www.biopills.net/carboidrati/>

87. Thessrimuang N, Prachayawarakorn J. Development, modification and characterization of new biodegradable film from basil seed (*Ocimum basilicum* L.) mucilage. *J Sci Food Agric.* 99(12), 5508-5515 (2019).
88. Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., Ashida, H., & Terao, J. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 3(4), 1332–1362. (2011).
89. He F, Mu L, Yan G-L, Liang N-N, Pan Q-H, Wang J, Reeves MJ, Duan C-Q. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. *Molecules.* 2010; 15(12), 9057-9091. (2010)
90. Niculescu, V., Paun, N., & Ionete, R. (2018). The Evolution of Polyphenols from Grapes to Wines. In *InTech eBooks*.
91. Trad, M., Boge, M., Ben Hamda, H., Renard, C. M. G. C., & Harbi, M. (2017). The Glucose-Fructose ratio of wild Tunisian grapes. *Cogent Food & Agriculture*, 3(1), 1374156.
92. Elejalde, E., Villarán, M. C., & Alonso, R. M. Grape polyphenols supplementation for exercise-induced oxidative stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18(1), 3 (2021).
93. Nicoletti, I., Bello, C., De Rossi, A., & Corradini, D. (2008). Identification and quantification of phenolic compounds in grapes by HPLC-PDA-ESI-MS on a semimicro separation scale. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8801–8808 (2008).
94. Somkuwar, R. G., Bhange, M. A., Oulkar, D. P., Sharma, A. K., & Ahammed Shabeer, T. P. Estimation of polyphenols by using HPLC-DAD in red and white wine grape varieties grown under tropical conditions of India. *Journal of Food Science and Technology*, 55(12), 4994–5002 (2018).
95. Xi, Z., Zhang, Z., Cheng, Y., & Li, H. The effect of vineyard cover crop on main monomeric phenols of grape berry and wine in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Agricultural Sciences in China*, 9(3), 440–448 (2010).
96. Li, J. F., He, X., Li, H., Zheng, W. J., Liu, J. F., & Wang, M. Y. Arbuscular mycorrhizal fungi increase growth and phenolics synthesis in *Poncirus trifoliata* under iron deficiency. *Scientia Horticulturae*, 183, 87–92 (2015).
97. Trad, M., Boge, M., Ben Hamda, H., Renard, C. M. G. C., & Harbi, M. The Glucose-Fructose ratio of wild Tunisian grapes. *Cogent Food & Agriculture*, 3(1) (2017).
98. Kaya, O., Ates, F., Daler, S., Keskin, N., & Turan, M. Integrating organic fertilization and soil tillage techniques to enhance the nutritional attributes of “Royal” grapes (*Vitis vinifera* L. cv.). *Food and Energy Security*, 13, e562 (2024).

99. Wang, YJ., Wu, QS. Influence of sugar metabolism on the dialogue between arbuscular mycorrhizal fungi and plants. *Hortic. Adv.* 1, 2 (2023).
100. Kunter, B., Unal, O. B., Keskin, S., Hatterman-Valenti, H., & Kaya, O. Comparison of the sugar and organic acid components of seventeen table grape varieties produced in Ankara (Türkiye): a study over two consecutive seasons. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1321210 (2024).
101. Karoglan, M., Radić, T., Anić, M., Andabaka, Ž., Stupić, D., Tomaz, I., Mesić, J., Karažija, T., Petek, M., Lazarević, B., Poljak, M., & Osrečak, M. Mycorrhizal Fungi Enhance Yield and Berry Chemical Composition of in Field Grown “Cabernet Sauvignon” Grapevines (*V. vinifera* L.). *Agriculture*, 11(7), 615 (2021).
102. Karoglan, M., Osrečak, M., Maslov Bandić, L., Kozina, B., & Zdunić, G. Selection of conservation practices in different vineyards impacts soil, vines and grapes quality attributes. *Phyton – International Journal of Experimental Botany*, 95(1), 63–78 (2023).