*Reg. (UE) n.1305/2013 - PROGRAMMA DI SVILUPPO RURALE (PSR) Regione Toscana 2014-2020*

*Bando "SOSTEGNO PER L'ATTUAZIONE DEI PIANI STRATEGICI E LA COSTITUZIONE E GESTIONE DEI GRUPPI OPERATIVI (GO) DEL PARTENARIATO EUROPEO PER L'INNOVAZIONE IN MATERIA DI PRODUTTIVITA' E SOSTENIBILITA' DELL'AGRICOLTURA (PEI - AGRI)" - Annualità 2017*

***TITOLO DEL PIANO STRATEGICO:***

# "Ortobioattivo: agroecologia per la produzione sostenibile di ortaggi nutraceutici"

## *Acronimo: OBA.NUTRA.FOOD*

## Sottomisura 16.2 "Sostegno a progetti pilota e di cooperazione"

## RELAZIONE FINALE

**PARTNER 2**
**Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali (DISAAA-a)**
**Università di Pisa**

Pisa, 12/12/2022

Il Responsabile Scientifico

Firmata digitalmente

Prof. Luciano Avio

Progetto OBA.NUTRA.FOOD "**O**rto**B**io**A**ttivo: agroecologia per la produzione sostenibile di ortaggi **NUTRA**ceutici" – Relazione finale Università di Pisa

**Personale coinvolto**

Responsabile Scientifico: Prof. Luciano Avio
Membri del gruppo di Ricerca: Prof.ssa Manuela Giovannetti, Prof. Alberto Pardossi, Prof.ssa Alessandra Turrini

Per la collaborazione offerta alla realizzazione del progetto si ringraziano: Dott.ssa Rita Maggini, Dr.ssa Maria Chiara Paterni (parte amministrativa/contabile).

**RELAZIONE DELLE ATTIVITA' SVOLTE**

**INDICE**

1. Attività del Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari e Agro-ambientali
2. WP1 - Microbiota benefico per la crescita delle piante e la produzione di alimenti ad alto valore salutistico
   - 2.1. Azione n. 2. Adattamento innovazione/progetto pilota/prototipo- Caratterizzazione di inoculanti micorrizici commerciali.
     - 2.1.1.Selezione di inoculanti micorrizici commerciali
     - 2.1.2.Caratterizzazione microbiologica di inoculanti micorrizici commerciali
   - 2.2. Azione n. 3. Introduzione innovazione nelle aziende del partenariato-Verifica del livello di colonizzazione micorrizica su ortaggi selezionati.
     - 2.2.1.Predisposizione dei protocolli per l'utilizzo in campo
     - 2.2.2.Monitoraggio in campo dello stato micorrizico di orticole coltivate nelle aziende partner
       - 2.2.2.1. Ortobioattivo Az. Agraria di A. Battiata
       - 2.2.2.2. Azienda Agricola Paolo Colzi
       - 2.2.2.3. Azienda Agricola Villani Enrico
   - 2.3. Azione n. 6. Valutazione dell'effetto dell'inoculo micorrizico sul metabolismo secondario di ortaggi selezionati.
     - 2.3.1. Analisi del valore salutistico di ortaggi prodotti nelle aziende partner
3. Conclusioni

## 1. Attività del Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari e Agro-ambientali

Nell'ambito del progetto, le attività del DiSAAA-a, (partner 2) hanno riguardato la realizzazione del seguente Work Package (WP):

WP n.1 - **Microbiota benefico per la crescita delle piante e la produzione di alimenti ad alto valore salutistico**.

**- AZIONE N. 2. Adattamento innovazione/progetto pilota/prototipo**- Caratterizzazione di inoculanti micorrizici commerciali.

- **AZIONE N. 3. Introduzione innovazione nelle aziende del partenariato**-Verifica del livello di colonizzazione micorrizica su ortaggi selezionati.

- **AZIONE N. 6. Monitoraggio e indicatori di risultato**-Valutazione dell'effetto dell'inoculo micorrizico sul metabolismo secondario di ortaggi selezionati.

Il personale del DiSAAA-a ha altresì partecipato alle attività organizzate nell'ambito della sottomisura 1.3 del progetto.

In particolare il Prof. Avio ha partecipato il 12 Ottobre 2021 al quarto e ultimo seminario online del ciclo "Ortobioattivo: sano, buono e salutare", dal titolo "Prospettive di ricerca e sviluppo nel campo dell'orticoltura sostenibile".

La Prof.ssa Turrini e la Prof.ssa Giovannetti hanno partecipato alla visita aziendale nel corso del ciclo "Ortobioattivo visto da vicino", presso l'Azienda Agricolo Ortobioattivo, capofila del progetto, in data 21 Gennaio 2022 .

Il Prof. Avio e la Prof.ssa Giovannetti hanno partecipato all'incontro tematico svoltosi il 26 Marzo 2022, presso le Aziende Agricole Peperita e Vierucci Francesca (Poggio ai Santi) di Bibbona e San Vincenzo, in provincia di Livorno.

Inoltre, sempre nell'ambito delle attività divulgative del progetto, il personale del DISAAA ha partecipato alla realizzazione del volume "Per fare un orto" (ISBN 978-88-32096-60-6), pubblicato nel 2022, con due contributi dal titolo "Inoculanti microbici: ruolo e qualità", e "Cibo funzionale e microrganismi benefici del suolo".

## 2. WP1 - Microbiota benefico per la crescita delle piante e la produzione di alimenti ad alto valore salutistico

Le attività scientifiche del WP1 si sono articolate su tre Azioni, n. 2, n. 3, n. 6, con l'obiettivo di selezionare un inoculante micorrizico, dotato di un microbiota con un alto numero di batteri benefici per la crescita delle piante, e di valutarne l'effetto sulla qualità dei prodotti alimentari ottenuti.

### 2.1 Azione n. 2. Adattamento innovazione/progetto pilota/prototipo- Caratterizzazione di inoculanti micorrizici commerciali.

Le attività perseguite durante lo svolgimento della Azione N.2 sono consistite nella caratterizzazione e la scelta di inoculanti micorrizici commerciali, da utilizzare ai fini delle successive attività del progetto, utilizzarsi di produzione degli ortaggi mediante il sistema di coltivazione "Ortobioattivo". Le attività sono state divise in due fasi, una prima i.) di analisi dei prodotti disponibili sul mercato, e una seconda ii.) in cui tre inoculanti selezionati sono stati caratterizzati microbiologicamente, per permettere una scelta operativa basata sulla attività biologica saggiata sperimentalmente. Le due fasi sono descitte di seguito separatamente.

#### 2.1.1 Selezione di inoculanti micorrizici commerciali

Nella prima fase del lavoro, sono stati individuati i criteri da adottare per la scelta di tre inoculi micorrizici commerciali, tra quelli presenti nell'elenco dei prodotti registrati come prodotti ad azione specifica e ad azione su suolo, con la denominazione "Inoculo di funghi micorizici", secondo l' All. 13 IT All. 6.3.6. del D.Lgs. 75/2010. L'elenco è disponibile sul sito del Sistema Informativo Agricolo Nazionale, SIAN, nella pagina "Consultazione Registri Fertilizzanti e Fabbricanti" ed è stato interrogato nel periodo 13-17 Gennaio 2020.
I criteri adottati, specificati di seguito, prevedevano che il prodotto dovesse:
1) essere consentito per l'agricoltura biologica;

2) essere descritto sul sito del fabbricante, con l'indicazione della quantità di inoculo micorrizico (non inferiore al 30%) e/o l'indicazione specifica degli organismi micorrizici presenti;

3) essere disponibile sul mercato locale.

La ricerca ha permesso di individuare 1219 prodotti ad azione su suolo, di cui 1056 per l'uso in agricoltura biologica, prodotti distribuiti da 161 aziende. Sono stati presi in considerazione solo i formulati di aziende che avessero un' ampia gamma di prodotti offerti (>20). La consultazione dei siti aziendali ha permesso di osservare che solo alcune ditte rendevano disponibili in rete informazioni sulla qualità dei prodotti in catalogo, e in particolare sul contenuto di microrganismi o sulla loro identità.
Al termine di questa fase preliminare, sulla base dei criteri indicati, i prodotti di due aziende ampiamente presenti sul mercato, sono stati prescelti per la valutazione dell'attività biologica:
-AEGIS IRRIGA (inoculo di funghi micorrizici *Glomus intraradices* e *Glomus mosseae* in polvere bagnabile iperconcentrata, ideale per applicazioni in fertirrigazione);
-AEGIS MICROGRANULO (inoculo di funghi micorrizici *Glomus intraradices* e *Glomus mosseae* in formulazione microgranulare adatta per l'applicazione con seminatrice o trapiantatrice;
-MICOSAT F UNO (inoculo di funghi micorrizici *Glomus* ssp, *Glomus viscosum* e *Glomus mosseae* in formulazione microgranulare).
La denominazione dei funghi micorrizici utilizzata è quella preente nelle etichette del prodotto, che non sempre è aggiornata, rispetto a quella scientifica prevalente.
Questi formulati sono quindi stati acquisiti, e sottoposti a valutazione della attività biologica nella fase di studio successiva.

#### 2.1.2 Caratterizzazione microbiologica di inoculanti micorrizici commerciali

Nella seconda fase dell'Azione n. 2, si è svolta la attività di caratterizzazione microbiologica degli inoculanti selezionati, ai fini di valutarne la attività biologica.
In coincidenza dell'inizio di questa fase, l'evento epidemico causato dalla diffusione del virus SARS-CoV-2 e delle conseguenti restrizioni adottate dal Governo, ha costretto a sospendere le attività di caratterizzazione microbiologica, che sono riprese nel mese di Maggio 2020.
Poichè alcune prove di laboratorio erano già state approntate, l'interruzione ha influito in misura importante sul consumo dei materiali previsti dal progetto, ma ha soprattutto determinato un ritardo nell'acquisizione dei risultati, che ha condizionato lo svolgimento di alcune attività previste nella successiva Azione n-3.
Tale attività, come previsto nel progetto, è stata valutata in base, a) alla rapidità di formazione di micorrize, e b) alla presenza di batteri con proprietà di promozione della crescita della pianta (PGP: plant growth promoting).

a) La capacità del prodotto di micorrizare rapidamente è stata verificata mediante biosaggio per la determinazione del potenziale di inoculo micorrizico, MIP (Mycorrhizal Inoculum Potential).
Il saggio MIP consiste nella misurazione della colonizzazione radicale da parte dei funghi micorrizici, effettuata dopo colorazione specifica delle radici stesse, stabilitasi dopo 6 settimane di crescita delle piante test (*Cichorium intybus*). La ridotta durata dell'incubazione consente la formazione di punti di colonizzazione primari, correlati alla quantità dei propaguli fungini.
Aliquote dei formulati commerciali sono state omogeneamente mescolate con un substrato inerte e distribuite in tubi di 50 mL. Alla semina è seguita l'incubazione in camera climatizzata, impostata con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di oscurità e a temperatura rispettivamente di 25 e 20° C.
Le prove sono state effettuate su tre campioni analitici di ciascuno formulato, e ciascun campione analitico è stato distribuito in quattro tubi, per 36 misurazioni complessive.
Il risultato del biosaggio MIP, presentato come colonizzazione radicale percentuale media per ciascun formulato, e riportato in Figura 1, è stato più elevato per le piante trattate con Aegis Microgranulo e con

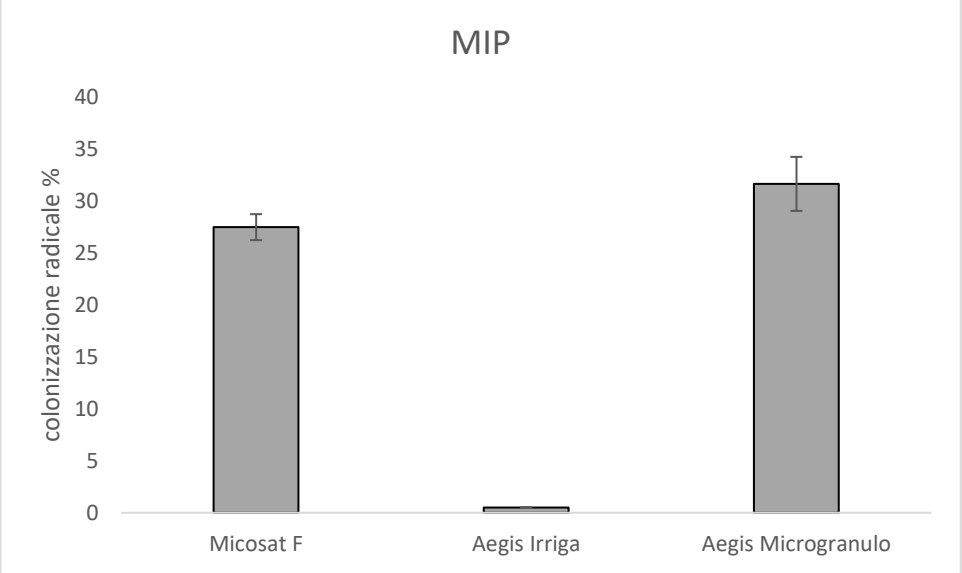


*Figure 1.* Risultati del saggio MIP, su tre inoculanti microbici selezionati (media e errore standard, n=3)

Micosat F Uno rispetto alle piante inoculate con Aegis Irriga, che presentavano un livello molto basso di colonizzazione, inferiore a 1%, in quanto costituita esclusivamente da pochi punti di ingresso.

b) Le analisi microbiologiche dei prodotti sono iniziate come previsto, effettuando l' isolamento dei batteri fosforo solubilizzanti sul terreno di coltura selettivo messo a punto dal National Botanical Research Institute (NBRIP), sui quali sono stati eseguiti successivamente i test per saggiare le attività promotrici di crescita (capacità foforo solubilizzante, produzione di siderofori, sintesi di auxine).

ISOLAMENTO FOSFOROLITICI-In pratica, a seguito della semina con aliquote diluite dei tre prodotti commerciali non sono state ottenute colonie in numero soddisfacente, per cui alla ripresa dei lavori dopo la sospensione delle attività dovute al COVID19, è stato deciso di eseguire l'isolamento con il materiale tal quale, senza diluizione, per cui le aliquore dei prodotti sono state sospese nel terreno liquido NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate), e incubate per 5 giorni a 28 °C per favorire la crescita dei batteri con attività fosforolitica, e quindi nuovamente piastrate su NBRIP solido. A seguito di questa procedura, le colonie cresciute sul mezzo NBRIP sono state quindi selezionate sulla base della capacità di solubilizzare il fosforo, evidenziabile dalla produzione di un alone tipico di decolorazione attorno alle colonie di batteri fosforolitici. Tali colonie, in numero di 120, sono state strisciate ripetutamente (quattro volte, di cui le ultime due su mezzo di coltura Tryptone soy agar, TSA). Rispetto al numero di isolati che era stato previsto di ottenere da ciascun prodotto (50), questi si sono rilevati meno numerosi, soprattutto per quanto riguarda quelli ottenuti da Micosat F Uno. A seguito di un ulteriore semina su mezzo NBRIP, si sono confermati come fosforolitici 72 isolati complessivamenre, di cui 31 ottenuti da Aegis Microgranulo, 30 da Aegis Irriga, e 11 da Micosat F (Fig. 2).

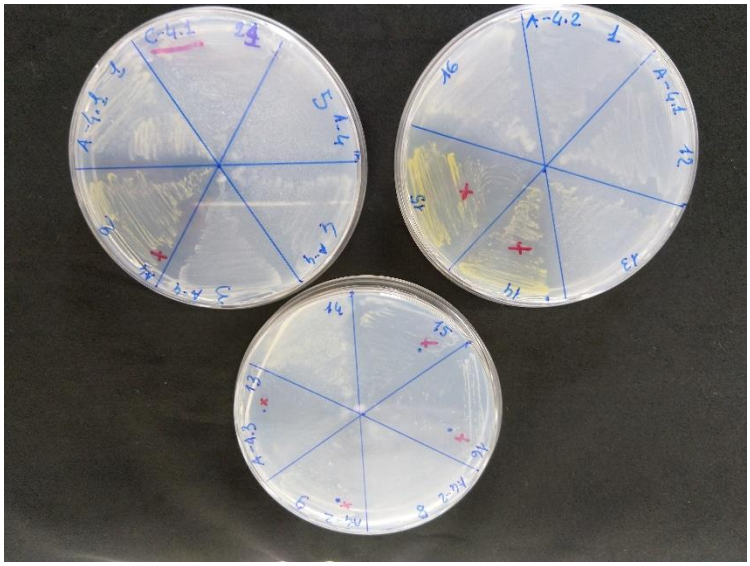

*Figure 2*. Formazione di aloni intorno alle colonie di isolati fosforo solubilizzanti

Tali isolati ottenuti sono stati quindi caratterizzati per l'attività sideroforo produttrice e per la capacità di sintesi di acido indolacetico (IAA), attività microbiche note per essere correlate con la promozione della crescita delle piante.

PRODUZIONE SIDEROFORI-La capacità degli isolati ottenuti di produrre siderofori è stata verificata utilizzando il saggio "Chrome Azurol S assay (CAS)", che prevede la distribuzione di CAS agar su piastre TSA in cui siano stati preventivamente cresciuti gli isolati da caratterizzare (Battini et al., 2016).

Il protocollo utilizzato per il test dei siderofori, prevede la preparazione di tre differenti soluzioni:

a) Soluzione 1, contenente 120 mg di Chrome Azurol S (CAS) sciolti in 100 mL di $H_2O$ distillata.

b) Soluzione 2, contenente 27 mg di $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ sciolti in 100 mL di HCl 10 mM.

c) Soluzione 3, contenente 146 mg di Hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide (HDTMA) sciolti in 80 mL di $H_2O$ distillata.

La miscelazione di 100 mL della Soluzione 1, 18 mL della Soluzione 2, e 80 mL della Soluzione 3 ha prodotto una soluzione di colore blu scuro (CAS), che dopo sterilizzazione in autoclave, è stata utilizzata per preparare il Blue agar CAS. Questo è stato ottenuto miscelando accuratamente la soluzione CAS in una soluzione sterile di Agar Noble (9 g/L) in 0.12 M PIPES (piperazine-N,N'-bis 2- ethanesulfonic acid), a una temperatura di 50°C. Prima della solidificazione, 15 mL di Blue agar CAS sono stati versati in piastre di TSA, sulla cui superficie erano presenti colonie circolari uniformi ("spot") dei microrganismi da valutare, ottenute dopo incubazione per 48 h a 28°C). Dopo una ulteriore incubazione al buio per 7 giorni a temperatura ambiente, è stata rilevata la presenza o assenza di aloni intorno alle colonie batteriche (Figura 3).

La capacità degli isolati di produrre siderofori è stata valutata misurando il diametro (mm) dell'alone formatosi intorno alla colonia batterica (Fig. 3), e utilizzando la seguente scala di valutazione: - = nessuna produzione (alone = 0 mm); + = bassa produzione (0 < alone ≤ 2 mm); ++ = moderata produzione (2 mm < alone ≤ 5 mm); +++ = elevata produzione (alone > 5 mm).

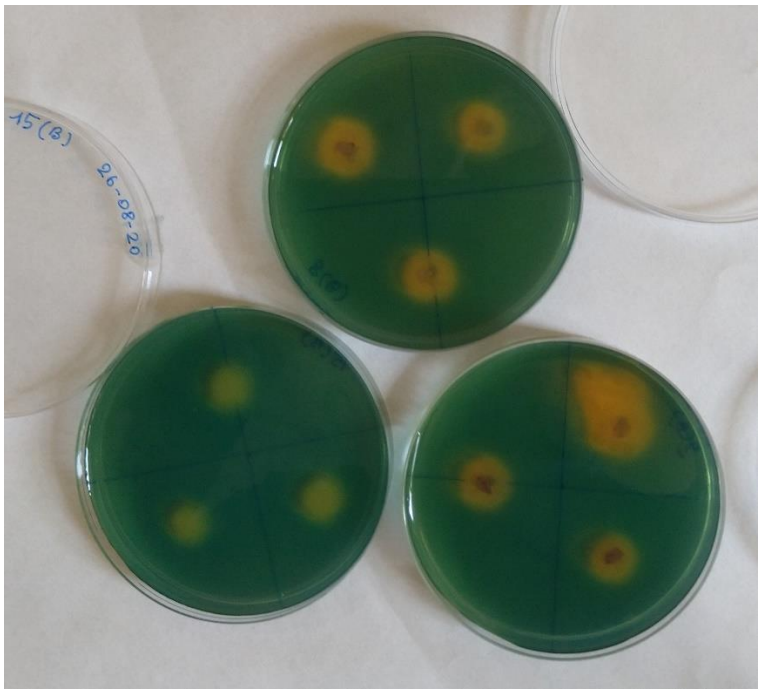


*Figure 3*. Risultato del test di produzione di siderofori, che mostra la formazione dell'alone di chiarificazione intorno alle colonie produttrici

Tutti gli isolati ottenuti da Aegis Microgranulo presentavano una bassa produzione di siderofori, ad esclusione di un isolato che dimostrava una produzione moderata. Al contrario, un maggiore numero di isolati batterici provenienti da Aegis Irriga mostravano una produzione moderata (5 isolati) o elevata (6 isolati). Un isolato era apparentemente privo di produzione, mentre i restanti 15 isolati mostravano una bassa produzione.

Gli 11 isolati fosforolitici di Micosat F mostravano produzione di siderofori bassa (6 isolati) o assente (4 isolati) mentre un solo isolato risultava a elevata produzione.

PRODUZIONE AUXINE- La capacità di produzione di auxine è stata valutata mediante il saggio di produzione di IAA, utilizzando il mezzo di coltura Luria-Bertani broth (LBB), addizionato di una soluzione di triptofano. Il test si basa sulla capacità di $FeCl_3$, contenuto nella soluzione di Salkowski, reagente del test, di formare con IAA un complesso di colore rosa. In tal modo è possibile rilevare semiquantitativamente la trasformazione del triptofano in IAA, mediata dal batterio da caratterizzare (Fig. 4).

*Figure 4*. Test qualitativo di produzione di IAA da parte di isolati batterici selezionati

Il protocollo utilizzato prevede l'esame del terreno liquido inoculato, dopo una incubazione a 28°C per 24 h, e centrifugazione (Battini *et al.*, 2016). Il surnatante è quindi trasferito in un pozzetto di una piastra a 24 pozzetti, e addizionato con 2 mL di reagente di Salkowski. Come controllo negativo è utilizzato il mezzo LBB non inoculato, ma contente triptofano, mentre come controlli positivi è utilizzato il LBB addizionato di una soluzione di IAA alla concentrazione di 66 µg/mL di EtOH, o di una sua diluizione 1:2 (Fig. 4). In questo modo è possibile effettuare test replicati su un elevato numero di isolati contemporaneamente.

Per valutare la capacità di utilizzazione di triptofano, e quindi di sintetizzare IAA, è stata considerata l'intensità colorimetrica degli isolati rispetto ai controlli positivi, con IAA a 2, 20 e 200 µg/mL. Sono state identificate quattro categorie di intensità di colore, pari a: nessuna produzione apparente (nessuna variazione rispetto al controllo negativo), bassa produzione (intensità inferiore a quella nel pozzetto di IAA a 2 µg/mL), media produzione (intensità inferiore a quella nel pozzetto di IAA a 20 µg/mL), alta produzione (intensità simile a quella nel pozzetto di IAA a 20 µg/mL).

Nel complesso 9 isolati hanno dato una risposta positiva al test per la produzione di IAA, tre, cinque, e uno rispettivamente per Aegis Microgranulo, Aegis Irriga e Micosat F.

I risultati complessivi, ottenuti dai 72 isolati fosforo solubilizzanti sono riportati in Tabella 1.

**Tabella 1** Attività fosforolitica, produzione di siderofori e di acido indolacetico (IAA) degli isolati batterici di inoculanti micorrizici

| Inoculo commerciale | Codice isolato | Attività fosforolitica | Produzione | |
|---|---|---|---|---|
| | | | siderofori | IAA |
| Aegis Microgranulare | 1 (A) | +[a] | +[b] | -[c] |
| | 2 (A) | + | + | - |
| | 3 (A) | + | + | ++ |
| | 4 (A) | + | + | ++ |
| | 5 (A) | + | + | - |
| | 6 (A) | + | + | + |
| | 21 (A) | + | + | - |
| | 22 (A) | + | + | - |
| | 23 (A) | + | + | - |
| | 33 (A) | + | + | - |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 34 (A) | + | + | - |
| | 50 (A) | + | + | - |
| | 51 (A) | + | + | - |
| | 52 (A) | + | ++ | - |
| | 53 (A) | + | + | - |
| | 54 (A) | + | + | - |
| | 55 (A) | + | + | - |
| | 56 (A) | + | + | - |
| | 57 (A) | + | + | - |
| | 58 (A) | + | + | - |
| | 59 (A) | + | + | - |
| | 60 (A) | + | + | - |
| | 61 (A) | + | + | - |
| | 62 (A) | + | + | - |
| | 63 (A) | + | + | - |
| | 64 (A) | + | + | - |
| | 65 (A) | + | + | - |
| | 66 (A) | + | + | - |
| | 67 (A) | + | + | - |
| | 68 (A) | + | + | - |
| | 69 (A) | + | + | - |
| Aegis Irriga | 7 (B) | + | + | - |
| | 8 (B) | + | + | + |
| | 9 (B) | + | + | + |
| | 10 (B) | + | + | - |
| | 11 (B) | + | + | |
| | 12 (B) | + | + | + |
| | 13 (B) | + | + | + |
| | 14 (B) | + | + | - |
| | 15 (B) | + | + | ++ |
| | 24 (B) | + | + | - |
| | 25 (B) | + | + | - |
| | 26 (B) | + | +++ | - |
| | 27 (B) | + | +++ | - |
| | 28 (B) | + | + | - |
| | 29 (B) | + | + | - |
| | 35 (B) | + | + | - |
| | 36 (B) | + | + | - |
| | 37 (B) | + | ++ | - |
| | 38 (B) | + | ++ | - |
| | 39 (B) | + | ++ | - |
| | 43 (B) | + | - | - |
| | 44 (B) | + | +++ | - |
| | 45 (B) | + | ++ | - |
| | 46 (B) | + | ++ | - |
| | 47 (B) | + | +++ | - |
| | 48 (B) | + | +++ | - |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 49 (B) | + | +++ | - |
| | 70 (B) | + | nd | - |
| | 71 (B) | + | nd | - |
| | 72 (B) | + | nd | - |
| Micosat F | 16 (C) | + | + | - |
| | 17 (C) | + | + | - |
| | 18 (C) | + | + | - |
| | 19 (C) | + | +++ | - |
| | 20 (C) | + | + | + |
| | 30 (C) | + | - | - |
| | 31 (C) | + | + | - |
| | 32 (C) | + | + | - |
| | 40 (C) | + | - | - |
| | 41 (C) | + | - | - |
| | 42 (C) | + | - | - |

[a]: + = attività presente

[b]: - = nessuna produzione; + = bassa produzione; ++ = moderata produzione; +++ = elevata produzione.

[c]: - =nessuna produzione ; + = bassa produzione; ++ = media produzione.

L'esame complessivo dei risultati, ottenuti con la caratterizzazione microbiologica dei prodotti selezionati, ha permesso di individuare nel prodotto Aegis Microgranulare il formulato da proporre ai partner aziendali per la inoculazione delle loro colture, in quanto ha fornito la migliore risposta al test MIP, rispetto a Aegis Irriga, e presentava il più alto numero di isolati batterici con attività PGPR rispetto a Micosat F.

## 2.2 Azione n. 3. Introduzione innovazione nelle aziende del partenariato-Verifica del livello di colonizzazione micorrizica su ortaggi selezionati.

A seguito dell'allestimento degli orti, sono iniziate le attività relative a questa Azione, consistenti nella valutazione delle modalità di inoculo e nella analisi della micorrizazione delle piante campionate.
A differenza di quanto previsto, poichè le tre aziende hanno adottato una unica mdalità operativa di coltivazione, quella biologica, è stata riprogrammata la attività di monitoraggio, aumentando il numero di ortaggi sottoposti al controllo della colonizzazione micorrizica precedentemente fissato in tre, adeguandolo alle tempistiche aziedali. Al termine della fase di monitoraggio sono state analizzate 12 specie ortive in maniera completa, in fase precoce e di maturazione commerciale, e 8 solo per la fase precoce.

### 2.2.1 Predisposizione dei protocolli per l'utilizzo in campo.

A causa dei tempi ristretti, dovuti alla sospensione delle attività per il COVID19, questa fase è stata semplificata, e, in base alle indicazioni del produttore, è stato suggerito ai partner aziendali di distribuire al terreno una quantità di inoculo micorrizico pari a ca. g 1,5 $m^{-2}$ su tre delle sei parcelle allestite secondo il metodo ortobioattivo, per permettere di valutare la presenza di eventuali funghi micorrizici indigeni nelle tre parcelle di controllo.

### 2.2.2 Monitoraggio in campo dello stato micorrizico di orticole coltivate nelle aziende partner.

Nel periodo tra l'autunno del 2020 e la primavera del 2022 sono stati effettuati ripetuti campionamenti per controllare lo stato micorrizico delle colture impiantate negli orti dei tre partners afferenti al progetto. I siti campionati sono compresi nella piana fiorentino-pratese, distanziate tra loro di circa 10-15 Km, a quote tra 40 e 70 m sul livello del mare (Fig. 5).

*Figure 5*. Localizzazione delle aziende partecipanti alle studio nella piana fiorentino-pratese

Il campionamento è consistito nel prelievo di porzioni di apparato radicale di 3-5 piante per ciascuna parcella e per ogni specie orticola prescelta. Il rilievo è stato effettuato, come previsto, in due date successive, in genere dopo 2-4 settimane dall'impianto, e poco prima o durante il periodo di raccolta. Nel

complesso sono state analizzate nove diverse varietà di ortaggi appartenenti a otto specie vegetali. I primi risultati hanno mostrato una ampia variabilità della risposta alla micorrizazione, in dipendenza della località e della specie vegetale. Di conseguenza, è stata apportata una modifica alla procedura di distrubuzione del prodotto micorrizico, raddoppiando la dose da fornire alle piante.
I risultati delle analisi della micorrizazione sono riportati nelle sezioni seguenti, dedicate a ciascuna azienda agricola partecipante. Nel periodo 1° Ottobre-10 Novembre del 2020 sono stati eseguiti i campionamenti come da progetto, negli orti dei Partner 1 (Capofila) e 7. I prelievi delle piante del Partner 8 non sono stati possibili, per il ritardo nella realizzazione dell'impianto.

#### 2.2.2.1 Az. Agraria Ortobioattivo di A. Battiata (Capofila)

Le colture monitorate nell'azienda del capofila e le date del campionamento sono riportate nella Tabella 2. Nell' autunno 2020 l'azienda ha coltivato le seguenti colture, da cui sono stati prelevati campioni radicali per l'analisi della micorrizazione: finocchio (Fig.6a), lattuga canasta, porro (Fig.6b).

*Figure 6*. Esemplari di specie ortive al momento del campionamento: a finocchio; b aglio; c fava; d lattuga cv. Ulmo

Alla prima data di prelievo, sulle radici di finocchio, è stata riscontrata la presenza di rari appressori, le strutture fungine che precedono la colonizzazione radicale, sia in piante inoculate sia in quelle di controllo. Al contrario, non è stata rilevata la presenza del fungo né in lattuga né in porro. Alla seconda data di prelievo la colonizzazione micorrizica è stata rilevata solo in una parcella su tre, nel porro, con valori del 15% di radici colonizzata, e in due parcelle in finocchio con valori del 2,5% e del 35%. Le piante di controllo non presentavano colonizzazione micorrizica, tuttavia l'analisi statistica (test non parametrico di Mann-Whitney), non ha permesso di rilevare differenze significative in porro e in finocchio. La lattuga non ha potuto essere campionata.

**Tabella 2** Date di prelievo e livelli di colonizzazione radicale (%) delle specie coltivate nell'Az. A. Battiata.

| Specie ortiva | Data | Data | Colonizzazione | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1° prelievo | 2° prelievo | 1° prelievo | | 2° prelievo | |
| | | | Inoculato | Controllo | Inoculato | Controllo |
| finocchio | 01/10/2020 | 10/11/2020 | assente | assente | 12,5 ± 19,5 | assente |
| porro | 01/10/2020 | 10/11/2020 | assente | assente | 5,0 ± 8,7 | assente |
| lattuga canasta | 01/10/2020 | - | assente | assente | nd | nd |
| aglio* | 26/03/2021 | 19/05/2021 | bassa | assente | 26,7 ± 15,3 | 10,0 ± 17,3 |
| fava* | 26/03/2021 | 19/05/2021 | tracce | assente | 17,3 ± 6,8 | 4,7 ± 2,9 |
| melanzana* | 28/06/2021 | 16/07/2021 | assente | assente | assente | assente |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| pomodoro | 28/06/2021 | - | assente | assente | nd | nd |

*: colture di cui sono stati effettuati prelievi di parti edibili per analisi qualitative.

Nella primavera 2021 sono stati eseguiti i prelievi su aglio e su fava, il 26/03/2021 e il 19/05/2021. Alla data del secondo rilievo, oltre ai campioni delle radici, sono stati raccolti campioni delle parti eduli, per le analisi qualitative, relative al contenuto di polifenoli e alla attività antiossidante. Alla prima data di prelievo, sono stati osservati appressori e pochi punti di ingresso nelle radici di fava, provenienti dalle parcelle inoculate, mentre in aglio, la colonizzazione micorrizica era presente in una sola parcella su tre, con valori del 6%. Non è stata rilevata la presenza del fungo nei campioni provenienti dai controlli.
Alla seconda data di prelievo la colonizzazione micorrizica in aglio risultava abbastanza intensa, ma molto variabile tra le tre parcelle, mentre in fava era più contenuta ma meno variabile. Tuttavia, anche nelle parcelle di controllo non inoculate, è stata riscontrata la presenza di colonizzazione micorrizica, contenuta in fava, e variabile in aglio. La analisi statistica, condotta mediante analisi della varianza, anche in questo caso, non ha permesso di rilevare gli effetti, risultati non significativi ($P > 0,05$), dell'inoculo micorrizico.
Nella stagione estiva del 2021, sono state monitorate altre due colture, melanzana e pomodoro cv. Roma. Al primo prelievo, non è stata riscontrata alcuna presenza di colonizzazione da parte di funghi micorrizici, mentre al secondo prelievo è stato possibile campionare solo la melanzana, di cui sono stati raccolti anche i frutti, per le successive analisi qualitative. Per quanto riguarda la colonizzazione radicale, sono stati ottenuti gli stessi risultati del prelievo precedente, non potendosi osservare alcuna struttura fungina nelle radici prelevate.

#### 2.2.2.2 Azienda Agricola Paolo Colzi (Partner 7)

Le colture monitorate nell'azienda del Partner 7 e le date del campionamento sono riportate nella Tabella 3. Nell' autunno 2020 l'azienda ha coltivato le seguenti colture, da cui sono stati prelevati campioni radicali per l'analisi della micorrizazione: finocchio, cicoria catalogna, zucchino.

**Tabella 3** Date di prelievo e livelli di colonizzazione radicale (%) delle specie coltivate nell'Az. P. Colzi.

| Specie ortiva | Data 1° prelievo | Data 2° prelievo | Colonizzazione | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1° prelievo | | 2° prelievo | |
| | | | Inoculato | Controllo | Inoculato | Controllo |
| finocchio | 01/10/2020 | 10/11/2020 | assente | assente | assente | assente |
| cicoria catalogna | 01/10/2020 | 10/11/2020 | assente | assente | assente | assente |
| zucchino | 01/10/2020 | - | assente | assente | nd | nd |
| aglio* | 26/03/2021 | 30/04/2021 | assente | assente | tracce | assente |
| fava | 26/03/2021 | - | assente | assente | nd | nd |
| lattuga trocadero* | 03/06/2021 | 28/06/2021 | assente | assente | assente | assente |
| sedano | 28/06/2021 | - | assente | assente | nd | nd |
| pomodoro | 28/06/2021 | - | assente | assente | nd | nd |
| lattuga ulmo* | 26/01/2022 | - | assente | assente | nd | nd |

*: colture di cui sono stati effettuati prelievi di parti edibili per analisi qualitative.

I prelievi sono stati eseguiti, come previsto in due date, il 01/10/2020, e il 10/11/2020. Nella seconda data le piante di zucchine, a causa delle basse temperature che ne hanno pregiudicato la crescita, non sono state campionate.
Le analisi eseguite sui campioni di finocchio e cicoria, per le due date di prelievo, e di zucchino, per la sola prima data, hanno mostrato la completa assenza di colonizzazione da parte dei funghi micorrizici, sia nelle parcelle inoculate, sia in quelle di controllo.
Nella primavera 2021 sono stati eseguiti i prelievi su aglio e su fava (Fig.6c), il 26/03/2021, e solo su aglio, il 30/04/2021, sia per le radici, sia per le parti eduli da sottoporre a analisi qualitativa. A causa della

impossibilità di eseguire il prelievo su fava, è stato programmato di monitorare le colture successive, lattuga cv. Trocadero, sedano e pomodoro cv. Roma, quest'ultima programmata contemporaneamente anche nelle altre aziende partecipanti.
Il primo prelievo per lattuga è stato eseguito il 03/06/2021 e il secondo 28/06/2021 in cui sono stati prelevati anche campioni di foglie per le analisi qualitative. Sedano e pomodoro sono stati campionati il 28/6/2021. Non è stato possibile effettuare il secondo prelievo.
Per quanto riguarda il controllo dello stato micorrizico delle piante, non è mai stata rilevata la presenza di funghi micorrizici, né al primo prelievo, né al secondo rilievo, a parte la osservazione di rari appressori in aglio, in due delle tre parcelle inoculate. Tutti i campioni prelevati dalle parcelle di controllo sono risultati privi di colonizzazione fungina.
Nella stagione invernale 2022, su una coltura di lattuga cv. Ulmo, è stato effettuato un ulteriore prelievo, sia di radici sia di parti fogliari, per le analisi di micorrizazione e qualitative.

#### 2.2.2.3 Azienda Agricola Villani Enrico (Partner 8)

Le colture monitorate nell'azienda del Partner 8 e le date del campionamento sono riportate nella Tabella 4. I prelievi delle piante del Partner 8 sono iniziate nella primavera 2021, per il ritardo nella realizzazione dell'impianto.

**Tabella 4** Date di prelievo e livelli di colonizzazione radicale (%) delle specie coltivate nell'Az. E. Villani.

| Specie ortiva | Data 1° prelievo | Data 2° prelievo | Colonizzazione | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1° prelievo | | 2° prelievo | |
| | | | Inoculato | Controllo | Inoculato | Controllo |
| aglio | 21/04/2021 | - | assente | assente | nd | nd |
| lattuga canasta* | 03/06/2021 | 28/06/2021 | assente | assente | assente | assente |
| pomodoro* | 28/06/2021 | 28/07/2021 | assente | assente | assente | assente |
| peperone* | 28/06/2021 | 04/08/2021 | assente | assente | assente | assente |

*: colture di cui sono stati effettuati prelievi di parti edibili per analisi qualitative.

Le specie ortive monitorate presso l'Azienda Villani (Fig.7) sono state: l'aglio, nella primavera 2021, e la lattuga cv. Canasta (Fig.6d), il peperone, e il pomodoro cv. Roma, a giugno 2021. In nessun caso sono state osservate strutture fungine nei campioni radicali prelevati dalle parcelle inoculate, come da quelle di controllo.

*Figure 7*. Prospettiva del sistema Ortobioattivo presso la Azienda Villani

### 2.3. Azione n. 6. Valutazione dell'effetto dell'inoculo micorrizico sul metabolismo secondario di ortaggi selezionati.

Per valutare la qualità dei prodotti orticoli prodotti, sono stati quantificati i polifenoli totali, la capacità antiossidante e l'attività antiradicalica. Per ogni specie orticola è stato utilizzato 1 g di tessuto vegetale, conservato dal momento della raccolta in congelatore, a -80 °C.

Il contenuto di polifenoli totali è stato determinato con il metodo colorimetrico di Folin-Ciocalteu, e espresso come mg di acido gallico equivalente (GAE) $g^{-1}$ di peso fresco (Maggini et al., 2018).

In breve, un'aliquota di estratto in metanolo di ogni campione vegetale è stato mescolato 1:20 con acqua distillata e addizionato di 300 µL di reagente Folin-Ciocalteu. Dopo quattro minuti è stata aggiunta una soluzione di sodio carbonato al 7,5% (1.6 mL) e dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente è stata misurata l'assorbanza allo spettrofotometro, a 765 nm. I risulati sono stati espressi come equivalenti di acido gallico per unità di peso fresco, sulla base di una curva di calibrazione.

La capacità antiossidante è stata determinata valutando la riduzione del ferro ferrico complessato da 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) in presenza di tampone acetato(saggio TPTZ o FRAP). Alla soluzione dei reagenti è stato addizionato l'estratto metanolico del campione vegetale. L'assorbanza è stata letta allo spettrofotometro a 593 nm e il risultato espresso come $Fe^{2+}$ per unità di peso fresco (Benzie e Strain, 1996).

La attività antiradicalica è stata rilevata utilizzando il radicale modello 2,2'-difenil-1-picrilidrazile (saggio DPPH). Il test consente di misurare l'attività riducente di molecole antiossidanti nei confronti del DPPH (Dudonné et al., 2009).

La soluzione di DPPH (20 mg/L in MeOH), preparata al momento, è stata addizionata con 0,1 mL 100 µL MeOH di estratto vegetale, mantenuta al buio per 45 minuti a temperatura ambiente, e l'assorbanza è stata letta a 515 nm. Il risultato è stato espresso come inibizione percentuale rispetto al controllo.

#### 2.3.1. Analisi del valore salutistico di ortaggi prodotti nelle aziende partner

Le specie ortive su cui sono sono state effettuate le analisi per la valutazione del contenuto di polifenoli totali, e delle attività antiossidanti e antiradicaliche sono elencate in Tabella 5.

Tutti i campioni sono stati prelevati durante il 2021, tranne quelli relativi alla lattuga cv Ulmo, che sono stati raccolti nel Gennaio 2022. I campioni, preparati e conservati in congelatore a – 80° C, sono stati elaborati nella primavera del 2022.

**Tabella 5** Specie ortive e tipo di tessuto edibile utilizzate nella analisi del valore salutistico.

| Specie | Azienda | Tipologia | Codice |
|---|---|---|---|
| Aglio fresco | Battiata | Bulbi e steli | BA |
| Aglio fresco | Colzi | Steli | CA |
| Fava | Battiata | Semi | BF |
| Lattuga cv. Canasta | Villani | Foglie | VC |
| Lattuga cv. Trocadero | Colzi | Foglie | VT |
| Lattuga cv. Ulmo | Colzi | Foglie | VU |
| Melanzana | Battiata | Frutto | BM |
| Peperone | Villani | Frutto | VPe |
| Pomodoro cv. Roma | Villani | Frutto | VPo |

Il contenuto di polifenoli non è stato influenzato dalla inoculazione micorrizica, le differenze con il trattamento di controllo non risultando mai statisticamente significativo (Fig. 8). Al contrario, è risultato variare, in dipendenza del tipo di ortaggio, con valori oscillanti da 0,14 mg GAE $g^{-1}$ di peso fresco in melanzana a 1,54 GAE $g^{-1}$ di peso fresco in peperone. Si possono chiaramente distinguere due gruppi di

ortaggi, il primo con basse concentrazioni di polifenoli (inferiori a 0,5 mg $g^{-1}$), rappresentato dall'aglio, pomodoro, melanzana e dalla lattuga coltivata in periodo invernale (cv. Ulmo), e il secondo con concentrazioni superiori a 1,0 mg $g^{-1}$, rappresentato da fava, peperone e dalle lattughe coltivate in periodo primaverile estivo. Tuttavia la lattuga cv. Canasta mostrava valori pari a circa 0,7 mg $g^{-1}$.

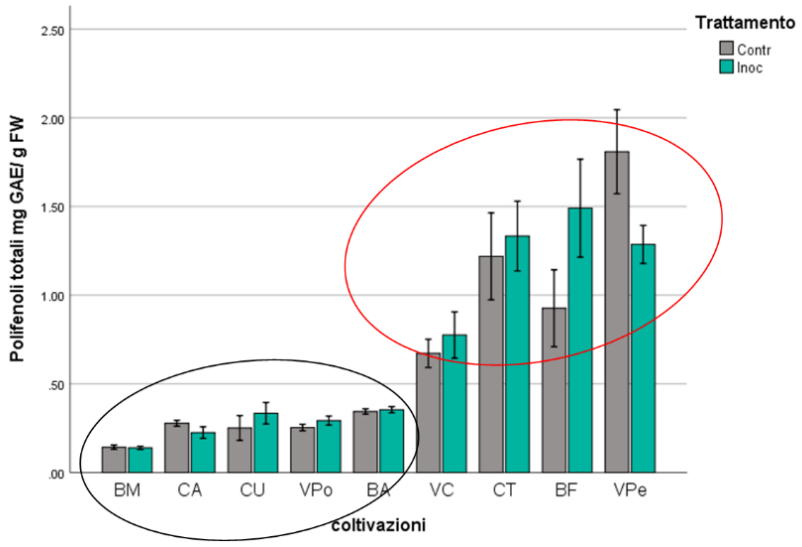


*Figure 8.* Contenuto totale in polifenoli in tessuti edibili di piante ortive, inoculate (inoc) on non inoculate (Contr) con formulato commerciale contenente funghi micorrizici; le coltivazioni sono indicate con la prima lettera, che definisce l'Azienda (B=Azienda A.Battiata, C= Azienda Paolo Colzi, V= Azienda Enrico Villani; e le successive lettere la specie/cultivar (A=aglio, C= lattuga cv. Canasta, F=fava, M=melanzana, Pe= peperone, Po=pomodoro, T= lattuga cv. Trocadero, U= lattuga cv. Ulmo)

Anche le attività antiossidanti e antiradicaliche mostravano un andamento simile a quello osservato per il contenuto di polifenoli, con cui presentavano correlazioni positive e statisticamente significative, con r (coefficiente di correlazione di Pearson) di 0,96 ($P<0,001$) tra polifenoli e antività antiossidante (FRAP) e di 0,88 ($P<0,001$) tra polifenoli e antività antiradicalica (DPPH).

In particolare, per quanto riguarda l'attività antiossidante non è stato osservato nessun effetto dell'inoculo micorrizico, e i due gruppi di ortaggi, distinti per contenuto di polifenoli, si sono separati allo stesso modo (Fig. 9), con valori (in μmol $Fe^{2+}$ $g^{-1}$ peso fresco) variabili tra 5,5 e 14,8 in melanzana, aglio, pomodoro, e lattuga cv.Ulmo, e tra 26,5 e 64,9 in fava, peperone e lattughe (cv. Canasta e cv. Trocadero).

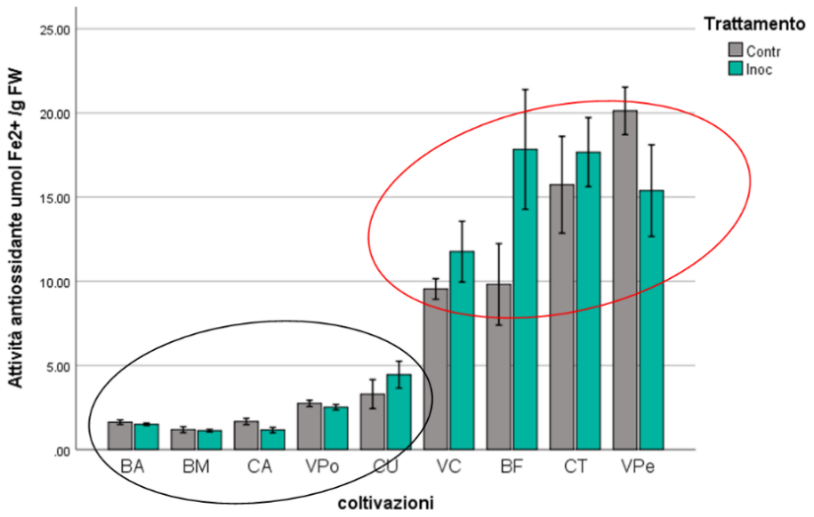


*Figure 9*. Attività antiossidante misurata in tessuti edibili di piante ortive, inoculate (inoc) on non inoculate (Contr) con formulato commerciale contenente funghi micorrizici; le coltivazioni sono indicate con la prima lettera, che definisce l'Azienda (B=Azienda A.Battiata, C= Azienda Paolo Colzi, V= Azienda Enrico Villani; e le successive lettere la specie/cultivar (A=aglio, C= lattuga cv. Canasta, F=fava, M=melanzana, Pe= peperone, Po=pomodoro, T= lattuga cv. Trocadero, U= lattuga cv. Ulmo)

Per quanto riguarda l'attività antiradicalica (Fig. 10), un effetto statisticamente significativo dell'inoculazione micorrizica è stato osservato in due colture, la fava e il peperone, tuttavia con esiti contrastanti, in cui l'applicazione dell'inoculo è associata a un aumento dell'attività radicalica in fava, e a un decremento in peperone. E' interessante notare che, per questi ortaggi, ma in particolare per fava, i risultati di attività antiossidante e contenuto di polifenoli presentavano differenze, benché statisticamente non significative, tra i due trattamenti dello stesso ordine di quello osservato per l'attività antiradicalica (ca. 50-60%).

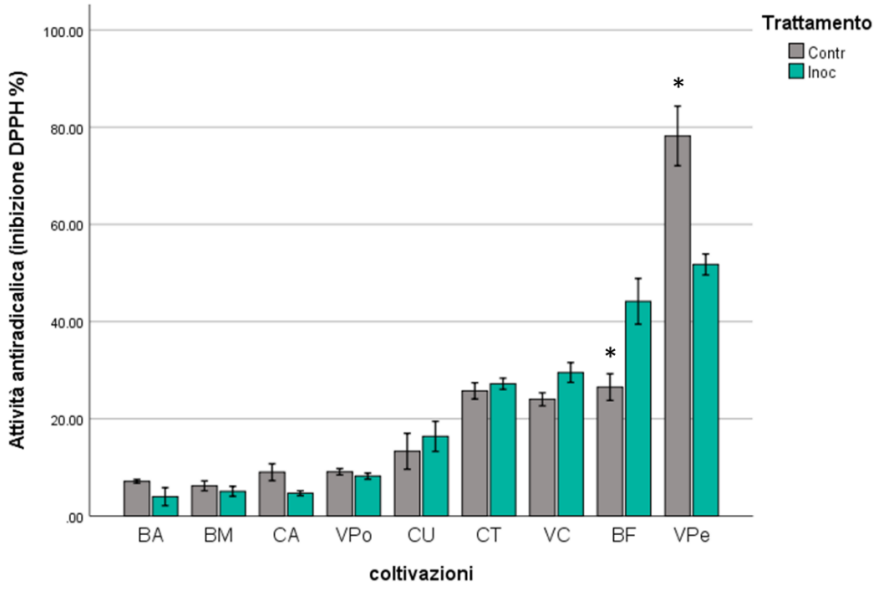


*Figure 10*. Attività antiossidante misurata in tessuti edibili di piante ortive, inoculate (inoc) on non inoculate (Contr) con formulato commerciale contenente funghi micorrizici; le coltivazioni sono indicate con la prima lettera, che definisce l'Azienda (B=Azienda A.Battiata, C= Azienda Paolo Colzi, V= Azienda Enrico Villani; e le successive lettere la specie/cultivar (A=aglio, C= lattuga cv. Canasta, F=fava, M=melanzana, Pe= peperone, Po=pomodoro, T= lattuga cv. Trocadero, U= lattuga cv. Ulmo)

In generale la variazione di attività tra le diverse specie presentava una soglia, pari al 20%, al di sotto della quale sono ragguppati gli stessi ortaggi, aglio, pomodoro, melanzana e lattuga cv. Ulmo, differenziati anche per contenuto in polifenoli e attività antiossidante.

## 3. Conclusioni

I risultati della sperimentazione posta in atto, hanno permesso di individuare importanti differenze tra i prodotti commerciali esaminati, per quanto riguarda le caratteristiche delle componenti microbiologiche, tuttavia, l'utilizzo in azienda dell'inoculo micorrizico rilevatosi più interessante per varietà e attività del microbiota presente (funghi micorrizici arbuscolari e batteri PGPR), non ha fornito risultati soddisfacenti in termini di colonizzazione micorrizica delle specie ortive, e variazioni del valore salutistico degli ortaggi prodotti. Benchè siano state monitorate, tra autunno 2020 e inverno 2022, venti diverse colture, di cui 12 in due diverse fasi vegetative, in pochi casi, nella prima stagione di campionamento nell'azienda del capofila, le piante presentavano radici colonizzate da funghi micorrizici, in misura molto bassa, e comunque non significativamente diversa rispetto alle piante di controllo.

Nonostante questo, in fava sono stati rilevati valori di attività antiradicalica significativamente più elevati , nelle piante inoculate rispetto alle piante di controllo. Tale differenza può essere ascritta all'azione delle popolazioni batteriche benefiche associate ai simbionti micorrizici presenti nel prodotto commerciale, e rilevate nella analisi di cui al punto 2.1.2 della presente relazione.

L'utilizzo di questo tipo di formulati microbici deve pertanto essere ulteriormente valutato, nelle modalità di distribuzione e nel contesto della generale conduzione agronomica attuata nel sistema di coltivazione "Ortobioattivo".

Bibliografia

Battini, F., Cristani, C., Giovannetti, M. Agnolucci, M., 2016. Multifunctionality and diversity of culturable bacterial communities strictly associated with spores of the plant beneficial symbiont *Rhizophagus intraradices*. Microbiol. Res. 183, 68-79.

Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem. 239, 70-76.

Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.M., 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. J. Agric. Food Chem. 57, 1768–1774.

Maggini, R., Benvenuti, S., Leoni, F., Pardossi, A., 2018. Terracrepolo (*Reichardia picroides* (L.) Roth.): wild food or new horticultural crop? Sci. Hort. 240, 224–231.