



Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Chimiche

**CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AMBIENTE**

**Analisi di composti volatili emessi da foglie di diverse varietà di *Vitis vinifera*
in condizione di stress idrico.**

Relatore: Prof. Luca Cappellin

Laureanda: Giada Romeo

Matricola: 2033004

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

1. Introduzione	6
1.1 Scopo	6
1.2 Funzione dei VOC nelle piante	6
1.3 Composti tipici emessi dalle foglie di vite	7
1.4 Campionamento di VOC	9
1.5 Stress idrico in viticoltura	10
1.6 Correlazione tra stress idrico ed emissione di VOC	11
2. Materiali e metodi	13
2.1 Varietà di vite analizzate	13
2.2 Disegno sperimentale	13
2.3 Preparazione dei campioni	15
2.4 Procedura sperimentale	16
2.5 Strumentazione	16
2.5.1 Parametri strumentali TD	17
2.5.2 Parametri strumentali GC-MS	18
2.6 Determinazione dei VOC	19
3. Risultati e discussione	21
3.1 Composti identificati	21
3.2 Risultati delle analisi statistiche	23
3.3 Comparazione con la letteratura esistente	33
4. Conclusioni	35
5. Bibliografia	36
Ringraziamenti	39

Abstract

Le piante rispondono a stress biotici e abiotici anche attraverso variazioni delle loro emissioni di composti organici volatili (VOC). L'avanzare del cambiamento climatico ha portato alla presenza di persistenti periodi di siccità. Come le piante rispondano in termini di emissione a tale stress è un'attuale oggetto di ricerca.

Il presente lavoro si prefigge di analizzare come diverse varietà di *Vitis vinifera* rispondano a livello fogliare in condizioni di stress idrico. A tale scopo sono state considerate due varietà: Montepulciano e Sangiovese, e per ogni varietà sono stati considerati due cloni.

Il lavoro è stato svolto in collaborazione tra il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova e la Fondazione Edmund Mach (F.E.M.).

Per le analisi, sono state campionate foglie da piante in condizioni ottimali (controllo) e piante sotto stress idrico.

Le foglie sono state processate ed in seguito i VOC da esse rilasciati sono stati raccolti con tecnologia HiSorb ed infine analizzati tramite gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa GC-MS.

1. Introduzione

Le prove del riscaldamento del sistema climatico sono evidenti, dal 1950 ad oggi è aumentata la probabilità di eventi estremi composti, tra cui l'aumento della frequenza di ondate di calore e siccità simultanee ¹.

Tra gli stress abiotici, la siccità è il fattore ambientale più limitante per la produttività delle colture ². Le fluttuazioni di temperatura, l'intensità della luce e le scarse precipitazioni sono tutti fattori che contribuiscono alla scarsità d'acqua, in particolare con effetti negativi nelle regioni a media e bassa latitudine, dove viene coltivata maggiormente la specie *Vitis vinifera*.

Tramite la consultazione del bollettino della siccità (ISPRA,2023)³ si può notare come, nelle zone inferiori della fascia temperata, vi sia una diminuzione considerevole delle precipitazioni; ragion per cui, nel caso delle coltivazioni vitivinicole le condizioni per lo sviluppo del prodotto potrebbero risultare più avverse.

1.1 Scopo

Questa tesi si inserisce in un progetto, realizzato in collaborazione con la Fondazione Edmund Mach (F.E.M.), volto a caratterizzare e comprendere la variabilità clonale all'interno di una stessa varietà di vite da vino, concentrandosi in particolare sui caratteri legati alla tolleranza agli stress abiotici.

L'obiettivo di questo elaborato è l'identificazione dei composti caratteristici presenti nelle foglie di vite, con l'intento di esplorare la correlazione tra la severità dello stress idrico e la loro produzione.

Precisamente, verrà approfondita l'ipotesi che, all'interno delle varietà Montepulciano e Sangiovese, possano esistere risposte fisiologiche differenti per quanto riguarda l'emissione di metaboliti secondari, in particolare dei VOC.

1.2 Funzione dei VOC nelle piante

VOC, è l'acronimo inglese per *Volatile Organic Compounds*, con cui ci si riferisce a qualsiasi composto organico che a 293,15 K (20 °C) presenta una tensione di vapore pari a $P^{\circ} \geq 0,01$ KPa, oppure che abbia una corrispondente volatilità in particolari condizioni di uso. (D. Lgs. 152/2006).

Nelle piante, le cellule epidermiche, le cellule secretorie delle strutture di accumulo come i tricomi ghiandolari e le cellule del mesofillo sono i siti più tipici di biosintesi dei VOC ⁴.

Grazie alla loro elevata diffusibilità e alla relativa lipofilità, che consente loro di migrare attraverso barriere come cuticole cerose e membrane fosfolipidiche, i VOC oltre che essere rilasciati dalle foglie,

possono esserlo anche da tessuti come radici, fiori e frutti, in quantità differenti ^{5,6}.

I composti organici volatili emessi e prodotti dalle piante svolgono una vasta gamma di funzioni, essenziali per la loro sopravvivenza e interazione con l'ambiente. Tra le loro varie funzioni i VOC vanno a modulare le difese della pianta nei confronti di parassiti ed erbivori, fungono da attrattori per impollinatori, dispersori di semi, parassitoidi e predatori, e partecipano nella comunicazione intra e interspecifica con altre piante. Infine, fungono da mitigatori contro lo stress abiotico. Un esempio di VOC emessi, in particolare, in condizioni di stress idrico sono alcuni terpenoidi aventi il compito di stabilizzare le membrane cellulari ⁶.

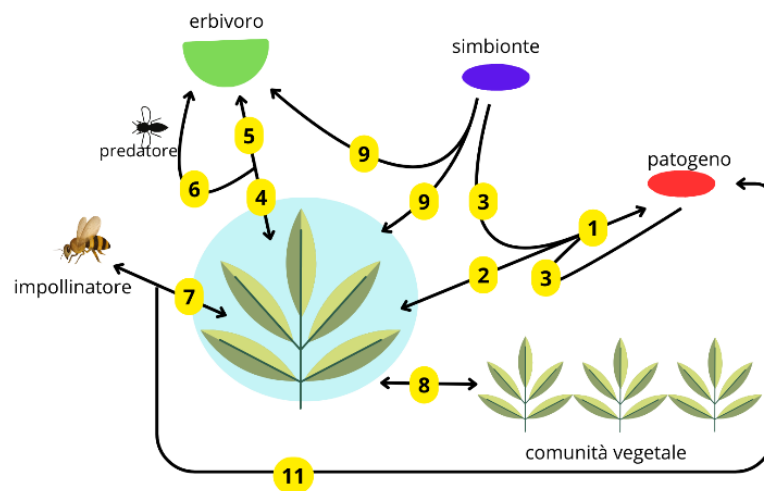


Figura 1. Schema riassuntivo delle interazioni ecologiche mediate da composti volatili ⁶.

1.3 Composti tipici emessi dalle foglie di vite

Come detto prima, le piante emettono VOC per svolgere diverse funzioni. Globalmente, la loro emissione è costituita per il 44% da isoprene, per l'11% da monoterpeni e per il 45% dalla somma degli altri composti (tra cui alcoli, aldeidi, chetoni ed esteri)⁷.

Le tipologie di VOC che caratterizzano le emissioni delle foglie della vite sono ⁸⁻¹⁰:

- * Alcoli alifatici
- * Chetoni
- * Esteri
- * Fenoli
- * *Green Leaf Volatile* (GLV)
- * Idrocarburi

- * Emiterpeni
- * Monoterpeni
- * Sesquiterpeni

L'emissione di questi composti è influenzata dalle diverse fasi temporali del giorno: in uno studio condotto da Rodríguez-Decllet *et al.* è stato evidenziato come una diversa varietà di volatili ha mostrato valori di emissione più alti durante la fotofase ¹⁰.

Emiterpeni, monoterpeni e sesquiterpeni, sono composti volatili appartenenti alla più vasta e diversificata classe di metaboliti secondari prodotti dalle piante. Come mostrato in Figura 2, nella vite questi composti servono a svolgere diverse funzioni metaboliche, tra cui alcune molto specifiche, agiscono come molecole segnale per anticipare e migliorare la risposta a stress biotici e abiotici nelle piante vicine che li ricevono ¹¹, sono coinvolti nell'interazione pianta-patogeno come nel caso della *Plasmopara viticola* ^{11,12} e svolgono la funzione di attrattori per specie impollinatrici e dispersori di semi ¹³.

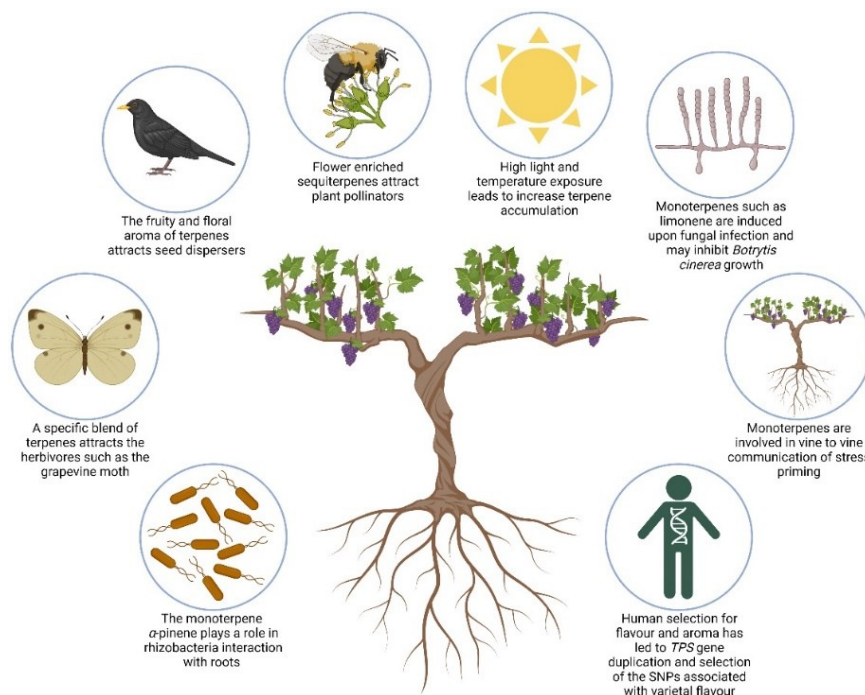


Figura 2. Funzioni svolte dai sesquiterpeni e dai monoterpeni nella vite ⁸.

Secondo quanto riportato da Bosman e Lashbrooke, piante di vite esposte a luce, alte temperature, radiazione di tipo UV-B e/o un moderato stress idrico possono mostrare un aumento dei livelli di concentrazione di terpeni.

Diversamente dalle altre piante la vite non accumula i VOC in organi specializzati, ma in diversi articoli viene fatto notare come i monoterpeni siano maggiormente presenti nella buccia degli acini mentre i sesquiterpeni nei fiori e durante lo sviluppo dei frutti ⁸.

1.4 Campionamento di VOC

È comune che le concentrazioni di VOC emesse dai materiali vegetali, siano piuttosto esigue, questo perché sono emessi sottoforma di miscela e in modo diluito nello spazio circostante la pianta¹⁴. Di conseguenza, è frequente l'impiego di tecniche e strategie atte all'accumulo di questi composti, sia durante la fase di campionamento che durante l'analisi, o in alcuni casi in entrambe le fasi, al fine di migliorarne la rilevabilità e la quantificazione.

Concentrazione in fase di campionamento

Per le strategie utilizzabili in fase di campionamento si fa in genere riferimento alle tecniche descritte ed illustrate da Tholl *et al.*¹⁴.

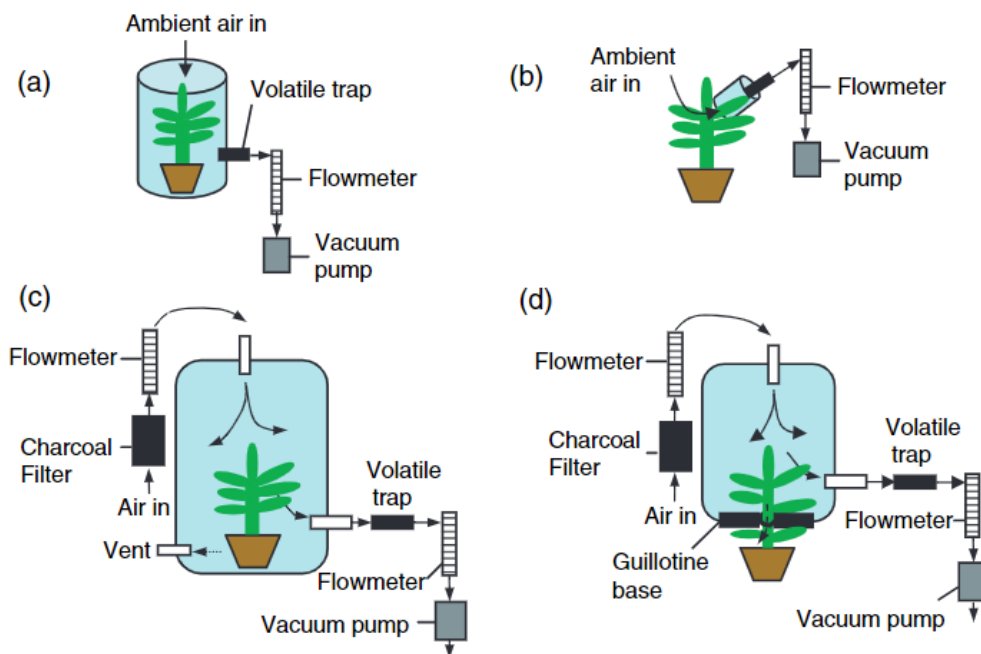


Figura 3. Principali tipologie di campionamento in vivo dei VOC emessi dalle piante¹⁵.

In Figura 3 si può osservare come esistano varie modalità di campionamento in vivo dei VOC a seconda del tipo di analisi necessaria. I sistemi (a) e (b), detti *pull system*, sono utilizzati per l'analisi di piante che emettono una quantità rilevante di VOC, in questo caso la pianta o una sua parte sono poste all'interno di un contenitore aperto, ed una trappola adsorbente è posizionata vicino all'elemento in analisi; tuttavia questi sistemi a causa del contenitore aperto permettono il passaggio dell'aria circostante, con il conseguente rischio di intrappolare sostanze indesiderate che possono celare la rilevazione durante l'analisi GC di composti del campione presenti in minore concentrazione. Nei sistemi (c) e (d), detti *push-pull system*, la pianta o una sua parte sono poste in un contenitore chiuso collegato alla trappola adsorbente, in questi due casi le sostanze indesiderate

vengono eliminate attraverso l'uso di filtri posizionati prima dell'ingresso per l'aria.

In tutti i casi illustrati in Figura 3 il passaggio dei VOC alla trappola adsorbente è permesso dalla presenza di una pompa da vuoto collegata alla fine della trappola.

Un'ulteriore tecnica utilizzabile è la *closed-loop stripping analysis*, in questo caso può essere utilizzata l'intera pianta oppure vengono tagliate le parti interessate e poste all'interno di un contenitore ermetico dove viene fatta circolare in modo continuo l'aria attraverso un sistema chiuso sempre collegato ad una trappola adsorbente e a delle pompe da vuoto. In Figura 4 viene illustrato il sistema della tecnica appena citata.

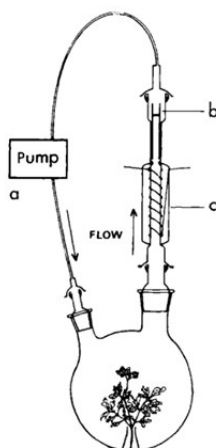


Figura 4. Disegno schematico di un sistema per closed-loop stripping analysis ¹⁶.

Per le strategie descritte uno degli svantaggi più facilmente intuibili è la gravosità del campionamento, difatti, a seconda dei composti target cambiano sia la strumentazione utilizzata, sia i tempi di campionamento risultando in alcuni casi particolarmente lunghi.

Concentrazione in fase di analisi

Per le strategie utilizzabili in fase di analisi può essere citata la tecnica *headspace solid phase microextraction* (HS-SPME), dove viene sfruttato lo spazio di testa di una vial contenente il campione solido per accumulare i VOC su varie tipologie di fibre adsorbenti.

I principi teorici della tecnica HS-SPME si basano sulla distribuzione degli analiti all'interno di un sistema trifasico, composto da una fase condensata (campione solido o liquido), una fase gassosa o headspace (HS), e una fase estraente costituita da un adsorbente (in fase liquida o solida) immobilizzato su un supporto solido ¹⁷.

1.5 Stress idrico in viticoltura

Lo stress idrico rappresenta una sfida cruciale nella viticoltura, particolarmente rilevante nelle aree

mediterranee, dove si concentra gran parte della produzione viticola globale (OIV,2023)¹⁸. In queste regioni, il cambiamento climatico sta aggravando la situazione con un aumento delle temperature e una riduzione delle precipitazioni, soprattutto nei mesi estivi³.

Il cambiamento climatico non solo altera i tempi delle principali fasi fenologiche della vite, come germogliamento, fioritura e maturazione¹⁹, ma modifica anche la geografia delle aree coltivabili, come dimostrato dagli studi di Moriondo *et. al.*²⁰, regioni tradizionalmente favorevoli rischiano di perdere idoneità, mentre nuove aree a latitudini e altitudini più elevate stanno emergendo come potenziali territori viticoli.

Per alcune tipologie di vite una moderata riduzione delle precipitazioni favorisce una maggiore concentrazione di composti fenolici (antociani, tannini) e zuccheri, migliorando la qualità dei vini, in particolare quelli rossi. Tuttavia, gravi deficit possono causare cali significativi della resa a causa di limitazioni nella fotosintesi e nello sviluppo del grappolo¹⁹.

Per mitigare l'impatto dello stress idrico, si stanno adottando strategie che combinano tecnologie avanzate e pratiche agronomiche mirate, un esempio può essere l'introduzione di portinnesti più resistenti alla siccità come strumento di adattamento²¹.

Inoltre, il monitoraggio continuo tramite sensori e strumenti di precisione sta migliorando la gestione delle risorse idriche, aiutando a mantenere un equilibrio tra qualità, resa e costi.

La sostenibilità futura della viticoltura dipenderà dalla capacità di combinare queste strategie con l'esplorazione di nuove aree coltivabili e la valorizzazione delle risorse disponibili per ridurre l'impatto complessivo del cambiamento climatico.

1.6 Correlazione tra stress idrico ed emissione di VOC

Durante i periodi di stress idrico, le piante si trovano a fronteggiare una ridotta disponibilità di acqua, che influisce profondamente sui vari processi fisiologici. Uno dei principali meccanismi di adattamento a questo tipo di stress è la chiusura degli stomi, che consente di ridurre la traspirazione e limitare la perdita d'acqua²². Tuttavia, tale risposta comporta anche implicazioni sull'emissione di composti organici volatili (VOC).

In condizioni di stress idrico moderato, alcune specie vegetali possono incrementare l'emissione di VOC come monotepreni e sesquiterpeni²³, come parte di un adattamento fisiologico mirato a proteggere le membrane cellulari e i tessuti dai danni ossidativi causati dallo stress⁶.

La maggioranza delle ricerche relative la correlazione tra i VOC e lo stress idrico è stata condotta

attraverso analisi in vivo, esaminando direttamente l'emissione di composti volatili dalle foglie ^{19,20}.

2. Materiali e metodi

2.1 Varietà di vite analizzate

Per queste analisi sono state utilizzate due varietà diverse di *Vitis vinifera*, per le quali sono state scelti due cloni differenti, uno con caratteristiche isoidriche e l'altro con caratteristiche anisoidriche.

Isoidricità

Le piante isoidriche sono caratterizzate da una limitata apertura stomatica in risposta agli stress idrici, questa viene regolata in modo tale da diminuire la perdita d'acqua per evapotraspirazione. In conseguenza alla limitata apertura degli stomi, la pianta presenta una minore fotosintesi netta a causa del ridotto assorbimento di CO₂.

Anisoidricità

Le piante anisoidriche sono caratterizzate da un'apertura stomatica che può permanere anche durante gli stress idrici. Grazie al ritardo o alla parziale chiusura degli stomi, alla pianta viene garantito un continuo assorbimento di CO₂, di conseguenza la pianta ha una maggiore fotosintesi netta in condizioni di stress idrico.

Sangiovese

Il vitigno Sangiovese rappresenta una delle varietà di viti a bacca nera da vino più diffuse e coltivate in Italia; infatti, occupa l'11% della superficie a livello nazionale dedicata alla viticoltura, ammontando a circa 71000 ha²⁶.

I cloni scelti per questa varietà sono: Sangiovese ISV RC1 e Sangiovese Ampelos TEA10D.

Montepulciano

Il vitigno Montepulciano rappresenta una delle principali varietà di viti a bacca nera coltivate nel centro Italia, secondo solo al Sangiovese. La superficie a livello nazionale dedicata alla sua coltivazione ammonta a circa 35000 ha²⁷.

I cloni scelti per questa varietà sono: Montepulciano TEA5 e Montepulciano Ampelos TEA 21.

2.2 Disegno sperimentale

L'esperimento è consistito nell'analisi delle foglie di due varietà di vite, ciascuna di due cloni differenti, per due diversi tipi di trattamento ognuna per quattro ripetute biologiche, per un totale di 32 campioni.

Le analisi sono state compiute su foglie di controllo (WW) e su foglie sottoposte a stress (WS), campionate durante la somministrazione dello stesso.

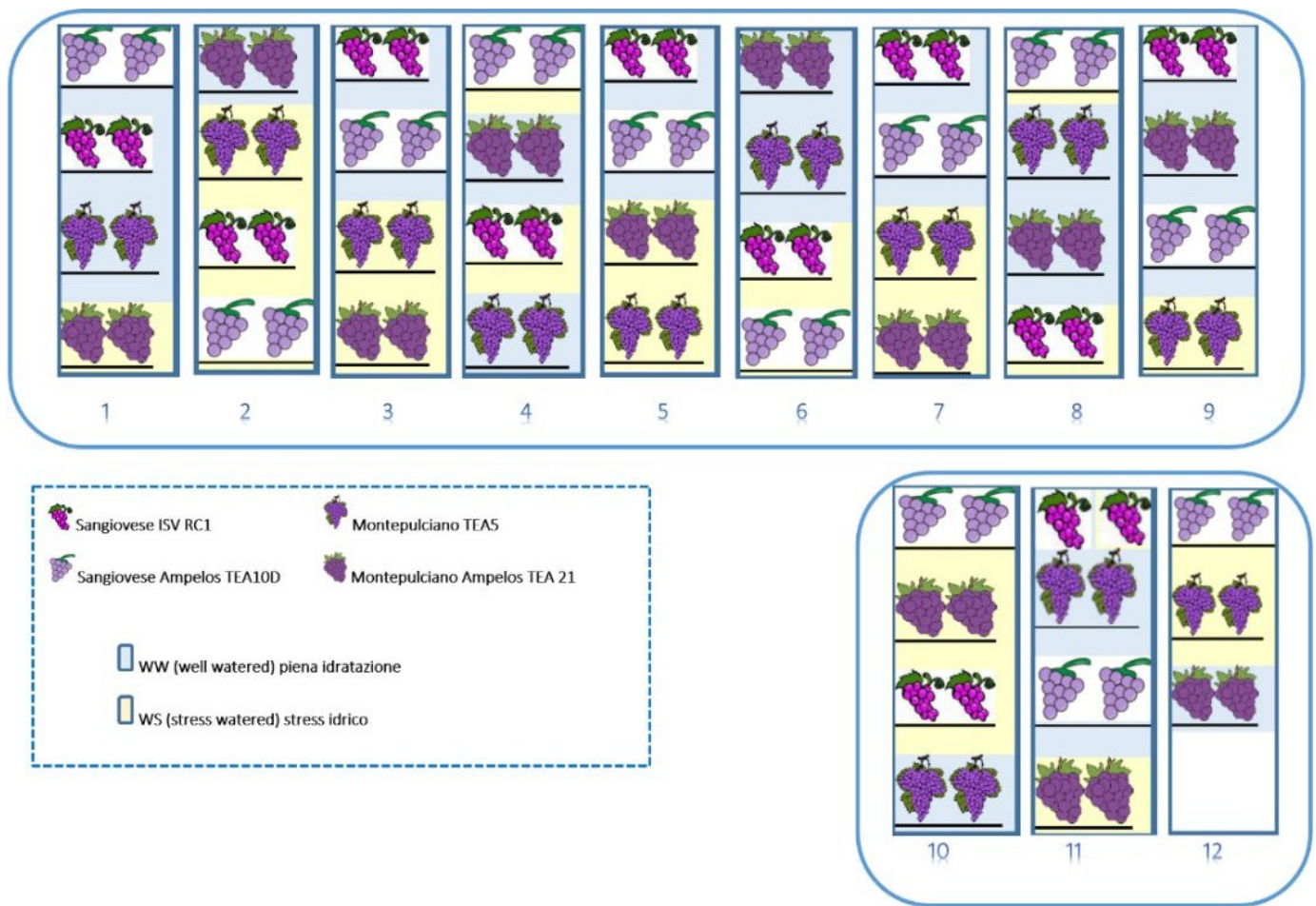


Figura 5. Disegno schematico dei blocchi di coltivazione e delle condizioni a cui sono sottoposte le viti.

Dalla figura 5 si può notare come sia le posizioni che i trattamenti delle piante siano state messe in ordine randomizzato in modo da ottenere una randomizzazione più omogenea possibile delle condizioni per tutte le viti.

Le piante sono state coltivate in serra, e lo stress idrico è stato indotto sospendendo l'irrigazione e inserendo il vaso contenente la vite in un involucro di plastica per limitare l'evaporazione del terreno. Il campionamento è stato effettuato al termine della fase di maturazione delle foglie dopo due settimane di stress idrico, selezionando una foglia matura da ciascuna pianta, situata nella parte centrale della vite. La foglia scelta è stata recisa mantenendo intatto il peduncolo e quindi inserita in una provetta Falcon da 50 mL, che è stata poi posta in un contenitore con azoto liquido.

Dopo aver congelato la foglia, e aver preraffreddato un mulino a sfere con azoto liquido, la foglia è stata estratta dalla provetta, macinata per circa un minuto e ridotta in polvere, che è stata nuovamente

riposta nella Falcon. La provetta è stata infine conservata in un ultracongelatore a -80°C fino alla fase di preparazione dei campioni.

2.3 Preparazione dei campioni

La preparativa dei campioni è avvenuta nei laboratori della Fondazione Edmund Mach. I materiali utilizzati sono:

- Bilancia Gibertini Crystal 100 (0,1 mg)
- Spatole
- Vial da 20 mL crimp top
- Setti e tappi in silicone microcentrati per HiSorb™ (gas tight)
- Crimper
- Na_2SO_4 anidro
- Toluene (LC-MS grade)
- Metanolo (LC-MS grade)
- Soluzione 2 ppm di Toluene (LC-MS grade) in Metanolo (LC-MS grade)
- Mulino a sfere
- Azoto liquido
- Ghiaccio secco
- Dispositivi di protezione individuale (DPI)

Per prima cosa, le vial sono state nominate con un codice univoco. Successivamente, è stato preparato un contenitore coibentato riempito con azoto liquido, dove sono state poste insieme alle spatole. A temperatura ambiente, sono state predisposte vial contenenti circa 500 mg di sale (Na_2SO_4 anidro) e sigillate con il crimper per essere utilizzate come campioni di controllo (bianchi).

I campioni di foglie già macinati sono stati prelevati dall'ultracongelatore a -80°C e trasferiti in un altro contenitore isolato. Dopo aver pesato circa 500 mg di sale e aggiunto il materiale nelle vial, 500 mg di foglie sono stati pesati e trasferiti con spatole raffreddate nelle vial, che sono state poi sigillate. Questo processo è stato ripetuto per ciascun campione disponibile.

Per i campioni che risultavano compattati all'apertura delle Falcon, si è utilizzato un metodo alternativo: si sono raffreddate con azoto liquido alcune giare del mulino e la relativa sfera di acciaio, poi vi sono stati inseriti i campioni compattati, che sono stati macinati per circa 2-3 minuti, quindi pesati e inseriti nelle vial.

Una volta pronte, le vial sono state sistemate in un contenitore termicamente isolato insieme a ghiaccio secco per il trasporto. Arrivate al Dipartimento di Scienze Chimiche di Padova (DiSC), sono state riposte in un ultracongelatore a -80°C. Tutte le operazioni sui campioni e sulle vial sono state eseguite mantenendo la catena del freddo per ridurre la perdita di VOC.

Infine, presso il DiSC, sono state preparate vial contenenti 1 mL di una soluzione di toluene a 1 ppm in metanolo, che fungeranno da standard per il controllo della stabilità dello strumento.

2.4 Procedura sperimentale

Dopo aver condizionato la sonda seguendo le istruzioni del produttore, si procede con l'analisi, inizialmente inserendo un campione bianco tra ciascun campione, così da verificare l'assenza di effetti di memoria. Una volta accertata la stabilità del sistema e della fibra, si passa a un'analisi più sistematica, seguendo indicativamente i passaggi riportati di seguito:

1. Toluene
2. Bianco
3. Toluene
4. Bianco
5. Lotto di campioni (8)

2.5 Strumentazione

La strumentazione utilizzata comprendeva:

Termodesorbitore Centri 360 (TD)

È un dispositivo utilizzato per il campionamento e la preconcentrazione di VOC e SVOC da campioni liquidi, solidi e gassosi. Grazie alla sua versatilità è in grado di supportare varie tipologie di termodesorbimento, in questo caso è stata scelta la tecnologia HiSorb™ (SPME ad alta capacità con criofocalizzazione).

Come dichiarato dal produttore HiSorb™ rispetto ad una tradizionale SPME consente di raggiungere limiti di rilevabilità (LOD) migliori fino a due ordini di grandezza²⁸. Tali prestazioni possono essere raggiunte grazie alla maggior superficie adsorbente del probe (fibra adsorbente), rispetto ad un probe per SPME. All'interno dello strumento è presente una trappola criofocalizzante che consente di intrappolare i composti in uscita dal desorbimento termico della fibra.

Gasromatografo (GC)

Il gasromatografo viene utilizzato per separare gli analiti presenti nel campione ricavato con tecnica HiSorb. È composto da una colonna capillare lunga 60m avvolta in una bobina, la miscela gassosa

contenente i VOC viene trasportata in colonna da un eluente che in questo caso è l'elio (He).

Spettrometro di massa (MS)

In accoppiata con il gascromatografo, è presente uno spettrometro di massa che funge da rivelatore, formato da due parti, una sorgente di ioni e un analizzatore di massa.

La sorgente utilizzata è una sorgente hard a ionizzazione elettronica, dove un filamento emette elettroni che, passando nei pressi di una molecola M, vi trasferiscono energia, ionizzando e frammentando la molecola in frammenti molecolari ionizzati.

L'analizzatore presente nello strumento utilizzato è un quadrupolo, un oggetto composto da quattro barre cilindriche, a cui sono applicati dei potenziali elettrici opportuni e oscillanti. All'interno dei quattro cilindri si genera un campo elettrico che modifica la traiettoria degli ioni in modo diverso a seconda del loro rapporto m/z. Applicando un certo potenziale, solo un dato ione con uno specifico m/z riesce ad uscire dal quadrupolo, cambiando i potenziali, cambia anche lo ione in uscita verso il detector, in questo modo si riesce ad ottenere lo spettro di massa.

Strumento	Marca e modello
Sample Automated Preparation (SAP)	Markes International HiSorb™ Tool HS Tool
Termodesorbitore (TD)	Markes International Centri 360
Gascromatografo (GC)	Agilent Technologies 8860
Spettrometro di massa (MS)	Agilent Technologies 5977B

Tabella 1. Strumenti utilizzati.

2.5.1 Parametri strumentali TD

I parametri utilizzati per la configurazione del termodesorbitore Centri 360 sono elencati in Tabella 2.

Parametro/Materiali	Valore/Tipologia
Temperatura di incubazione	60°C
Tempo di incubazione	60 min.

Predesorbimento del probe	0,5 min. a 50 mL/min.
Temperatura di desorbimento del probe	250°C
Tempo di desorbimento del probe	10 min
Flusso di desorbimento del probe	50 mL/min.
Splittaggio di desorbimento del probe	OFF
Purge della trappola	1 min. a 50 mL/min.
Temperatura trappola (durante criofofocalizzazione)	-20 °C
Temperatura di desorbimento trappola verso GC-MS	280 °C
Gradiente temperatura desorbimento trappola	≈100 °C
Tempo di desorbimento trappola	3 min.
Splittaggio di desorbimento trappola	15 mL/min.
Temperatura Transfer-Line	170 °C
Probe HiSorb™	CarbonWideRange (DVB/CWR/PDMS)
Trappola	Material Emission

Tabella 2. Parametri strumentali termodesorbitore.

2.5.2 Parametri strumentali GC-MS

Il gascromatografo (GC) utilizza l'elio come gas eluente con un flusso di 1 mL/min. Il programma di temperatura inizia a 40°C, mantenuti per un minuto e prevede un incremento lento di 3°C/min fino a raggiungere i 180°C, seguiti da un mantenimento di 2 minuti. Successivamente, la temperatura sale più rapidamente, a un tasso di 25°C/min, fino a 280°C, mantenuti per un ulteriore minuto. Infine, il sistema si porta a 290°C in una fase di post-run con un flusso di 1.2 mL/min per 2 minuti. Questo schema di temperature è stato progettato per separare efficacemente i composti sulla colonna capillare

Restek Rxl-624Sil MS, lunga 60 metri, con un diametro interno di 250 μm e uno spessore di film di 1.4 μm .

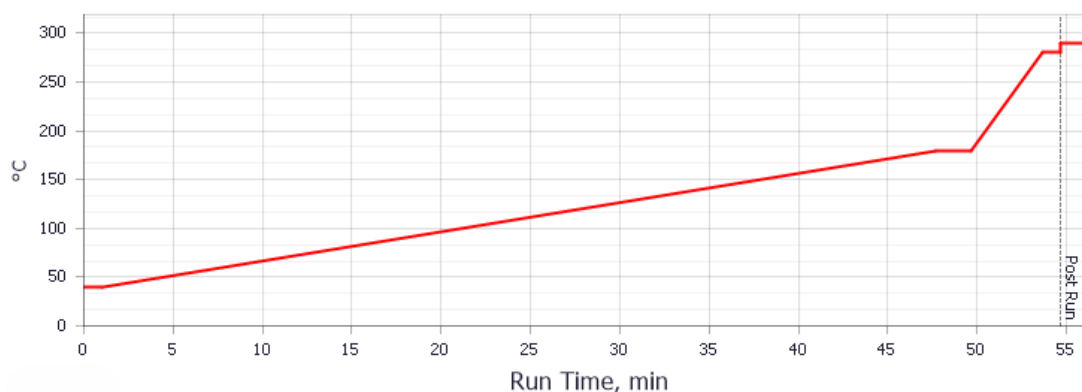


Figura 6. Rappresentazione grafica del programma di temperatura utilizzato per GC.

Il rivelatore, uno spettrometro di massa, è stato configurato per acquisire dati in modalità "scan" con una gamma di masse compresa tra 35 e 300 amu. La sorgente di ionizzazione, a 230°C, utilizza la tecnica di ionizzazione elettronica (EI). La temperatura del quadrupolo, che separa gli ioni in base al rapporto massa/carica, è mantenuta a 150°C.

2.6 Determinazione dei VOC

I composti rilevati tramite GC-MS sono stati inizialmente identificati confrontando i loro spettri di massa con quelli presenti nei database NIST, come ulteriore criterio identificativo è stato calcolato l'indice di ritenzione lineare (LRI).

I metodi più diffusi e accettati per il calcolo dell'indice di ritenzione si basano principalmente su due equazioni fondamentali: l'equazione sviluppata da Kováts nel 1958, specifica per condizioni isoterme, e l'equazione proposta da van Den Dool e Kratz nel 1963, utilizzata in presenza di condizioni con programmazione della temperatura. Quest'ultimo approccio è quello utilizzato in questa analisi; in letteratura come indice di ritenzione (I), indice di ritenzione lineare (LRI) o indice di ritenzione a temperatura programmata (PTRI o IT) ²⁹.

$$LRI = (100 * n) + \left(\frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right) * 100$$

N.B. t_n e t_{n+1} sono tempi di ritenzione degli idrocarburi n-alcani di riferimento che eluiscono immediatamente prima e dopo il composto chimico "x"; t_x è il tempo di ritenzione del composto "x".

Sono state preparate separatamente due soluzioni di n-alcani (nC5-nC7 e nC8-nC20) e analizzate

tramite tecnica HiSorb. I tempi di ritenzione ottenuti per ogni alcano sono stati utilizzati per calcolare gli LRI per i VOC identificati nelle foglie.

I valori LRI ottenuti sono stati confrontati con i valori LRI di riferimento presenti nel NIST Chemistry WebBook 2020 e corrispondenti alla stessa categoria di colonna utilizzata.

Il composto identificato dal software “Agilent MassHunter Qualitative Analysis” tramite le librerie presenti è stato ritenuto valido quando LRI calcolato rientrava in un range di tolleranza di ± 10 rispetto a quello di riferimento.

È stato possibile calcolare l'indice solamente per i composti che rientravano nel range di alcani nC5-nC12, a causa della mancanza di picchi dei relativi tempi di ritenzione per gli alcani nC13-nC20.

3. Risultati e discussione

3.1 Composti identificati

Di seguito sono riportati i composti identificati nelle foglie delle piante di controllo e di quelle sottoposte a stress, l'identificazione è stata effettuata attraverso la consultazione della libreria NIST17.

N.B. I nomi affiancati dalla sigla (#) sono stati ritenuti validi anche attraverso LRI.

I composti contrassegnati da (*) sono isomeri e quindi non è stato possibile identificarli tramite il confronto delle frammentazioni caratteristiche della molecola attraverso l'EIC.

Tempo di ritenzione (min.)	Nome	CAS	Classe di appartenenza
12,071	Acetone	67-64-1	Chetoni
16,495	Butanal	123-72-8	Aldeidi
17,016	3-Cyclopropyl-1-butyne	60042-59-3	Idrocarburi
20,167	3-Methyl butanal	590-86-3	Aldeidi
20,637	2-Methyl butanal	96-17-3	Aldeidi
21,608	(#) 2-Ethyl furan	3208-16-0	Furani
22,096	1-Penten-3-one	1629-58-9	Chetoni
22,241	(#) 1-Penten-3-ol	616-25-1	Alcoli alifatici
22,704	(#) Pentanal	110-62-3	Aldeidi
24,592	UNKNOWN 24,592	560-21-4	Unknown
25,636	1-Butanol, 3-methyl-	123-51-3	Alcoli alifatici
25,852	(#) 2-Methylbutan-1-ol	137-32-6	Alcoli alifatici
26,823	(#) Octane	111-65-9	Idrocarburi
27,157	2-Pentenal, (E)-	1576-87-0	GLV
28,016	Cis-2-Penten-1-ol	20273-24-9	Alcoli alifatici

28,289	(#) Heptane, 2,4-dimethyl-	2213-23-2	idrocarburi
29,077	3-Hexenal	4440-65-7	GLV
29,242	Hexanal	66-25-1	GLV
30,874	(*) UNKNOWN 30,874	921-47-1	Unknown
32,459	(#) Ethylbenzene	100-41-4	Idrocarburi
32,752	(#) 2-Hexenal (E)	6728-26-3	GLV
32,971	(#) Xylene (o,p,m)		Idrocarburi
33,836	(*) UNKNOWN 33,836	Unknown	Unknown
34,623	Xylene (o,p,m)		Idrocarburi
35,022	4-Methyl-5-hexen-2-ol	57813-25-9	Alcoli alifatici
35,492	Cyclohexanol	108-93-0	Alcoli alifatici
35,926	(*) UNKNOWN 35,926	Unknown	Unknown
37,495	2,4-Hexadienal	142-83-6	GLV
39,038	(#) Decane	124-18-5	Idrocarburi
39,591	(#) Furan, 2-pentyl-	3777-69-3	Furani
39,826	2-Heptenal, (E)	18829-55-5	Aldeidi
40,183	(*) UNKNOWN 40,183	Unknown	Unknown
40,286	2-(2-Pentenyl) furan	70424-14-5	Furani
40,668	Benzaldehyde	100-52-7	Aldeidi
40,755	6-Methyl-5-hepten-2-one	129085-68-3	Chetoni
40,951	4-Methyl-3-octanone	6137-15-1	Chetoni
41,488	(*) Dipropylene glycol methyl ether	20324-32-7	Alcoli alifatici
41,681	(*) Dipropylene glycol methyl ether	20324-32-7	Alcoli alifatici
42,479	2-Propanol, 1-(2-methoxypropoxy)-	13429-07-7	Alcoli alifatici

42,5	(#) Ocimene	13877-91-3	Monoterpeni
42,758	(#) 1,8-Cineole	470-82-6	Monoterpeni
43,192	2-Ethyl hexanol	104-76-7	Alcoli alifatici
43,417	2,4-Heptadienal, (E,E)-	05-04-4313	Aldeidi
44,08	2,5-Furandicarboxaldehyde	823-82-5	Aldeidi
45,514	Benzyl alcohol	100-51-6	Fenoli
46,787	Acetophenone	98-86-2	Chetoni
46,813	2-Nonanol	628-99-9	GLV
47,235	Nonanal	124-19-6	GLV
47,25	2(5H)-Furanone,5-ethyl-	2407-43-4	Furani
49,26	2,5-Dimethylcyclohexanol	3809-32-3	Alcoli
49,784	Phenylethyl alcohol	60-12-8	Fenoli
50,951	2-Nonenal (E)	18829-56-6	GLV
51,919	Decanal	112-31-2	Aldeidi
52,276	Methyl salicylate	119-36-8	Esteri
53,07	1-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 2,6,6-trimethyl-	432-25-7	Aldeidi
53,289	(*) UNKNOWN 53,289	Unknown	Unknown

Tabella 3. Elenco dei composti identificati con relativo tempo di ritenzione, CAS e classe di appartenenza.

3.2 Risultati delle analisi statistiche

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando MATLAB ver. 2024b. Per evidenziare differenze tra i campioni raccolti, l'intero dataset è stato sottoposto all'analisi della varianza (ANOVA). Dunque, per ogni composto riportato in Tabella 3, è stato svolto tale test considerando come valore critico p pari a 0.05. Al fine di evidenziare differenze globali, si è deciso di testare contemporaneamente tutti i cloni (stressati e non) di entrambe le varietà.

Le sigle poste in didascalia sotto le figure indicano la significatività statistica: “*” significativo ($p < 0.05$), “n.s.” non significativo.

Di seguito sono riportati i box plot dei composti:

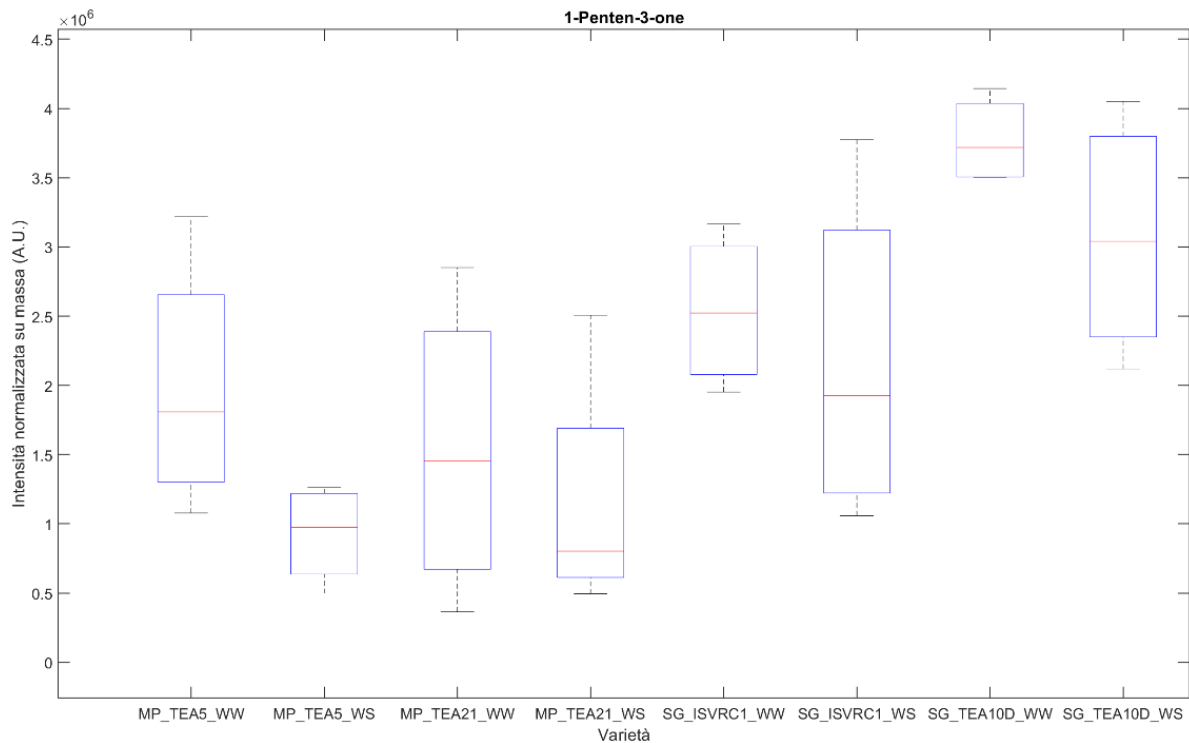


Figura 7. (*) Emissione di 1-penten-3-one in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all’emissione delle piante di controllo.

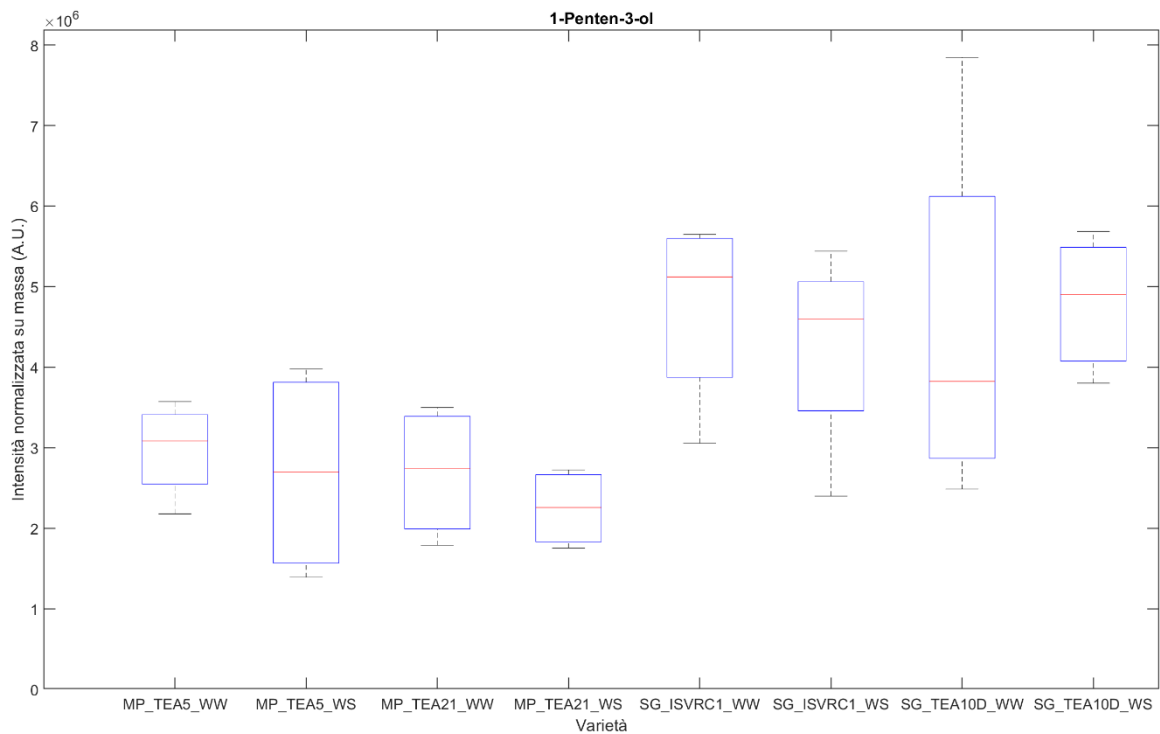


Figura 8. (*) Emissione di 1-penten-3-ol in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all’emissione delle piante di controllo.

In Figura 7 è possibile osservare come l’emissione di 1-penten-3-one si riduca in condizioni di stress

idrico con una differenza tra le due varietà: le emissioni del composto in esame risultano maggiori in Sangiovese rispetto a Montepulciano.

Tale *trend* si discosta da quello rilevato per l'alcol associato (1-penten-3-ol, Figura 8), per il quale si registra una differenza intervarietale: le emissioni del composto in esame risultano maggiori in SG rispetto a MP. L'emissione di questo composto si mantiene sostanzialmente stabile a seguito dello stress. Un *trend* analogo al primo (Figura 7) descritto, con un calo del composto sotto esame, è quello riscontrato per l'aldeide 2-pentental, (E)-, (Figura 9) dove inoltre è possibile osservare la medesima differenza tra le due varietà: in SG il composto è maggiormente emesso rispetto a MG.

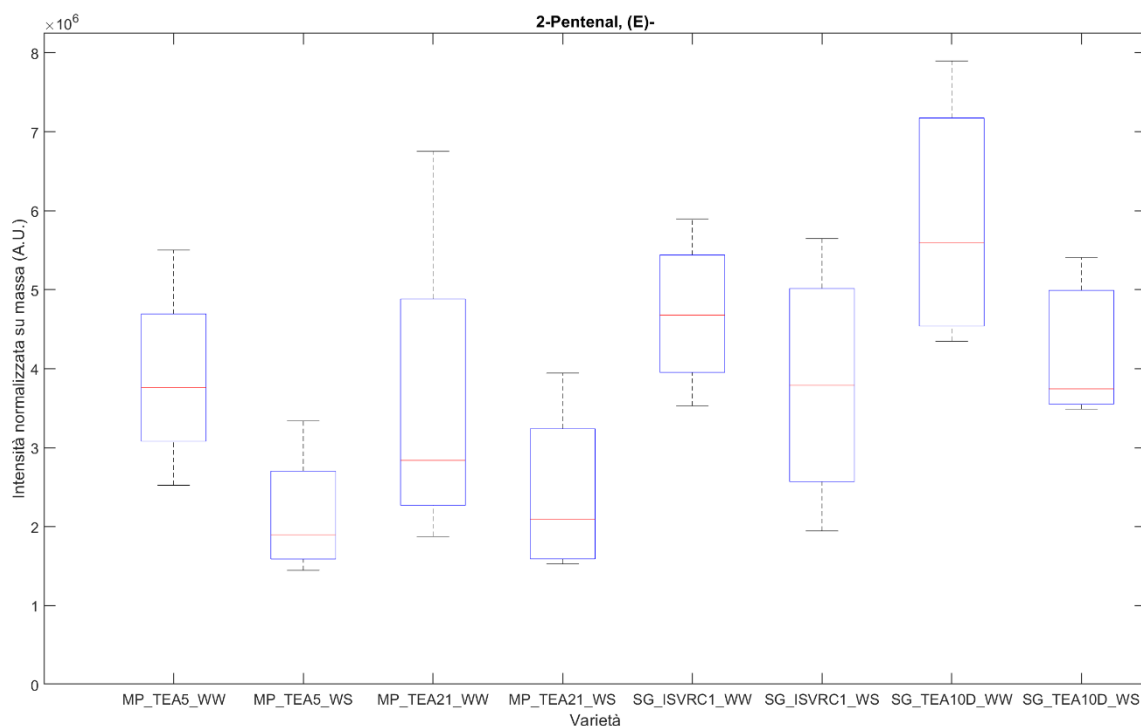


Figura 9. (*) Emissione di 2-pentental, (E)- in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

Per il composto non identificato con tempo di ritenzione 30,874 min. (Figura 10), è possibile notare un ulteriore *trend* che si discosta da quelli osservati fin'ora, per il quale si registra una differenza intervarietale dove le emissioni del composto in esame risultano maggiori in SG rispetto a MP, inoltre il comportamento all'interno della varietà Montepulciano non risulta omogeneo, in quanto si ha una lieve riduzione in TEA5 e un aumento in TEA21.

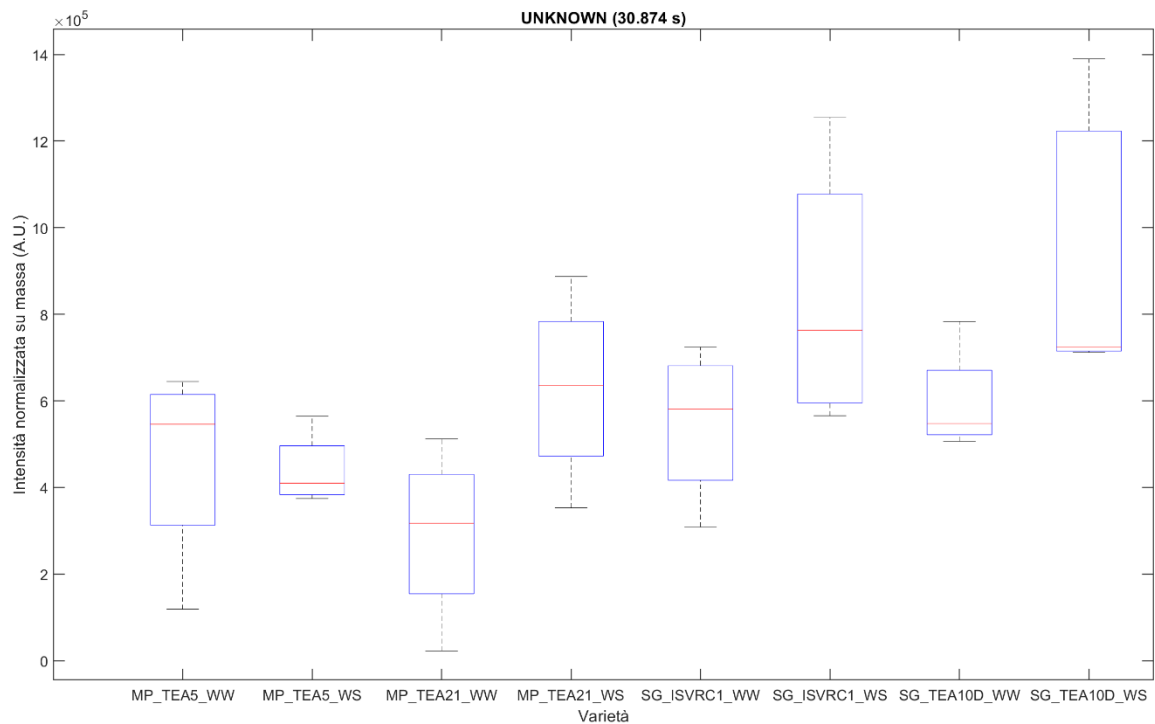


Figura 10. (*) Emissione di composto non identificato con tempo di ritenzione 30,874 min. in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

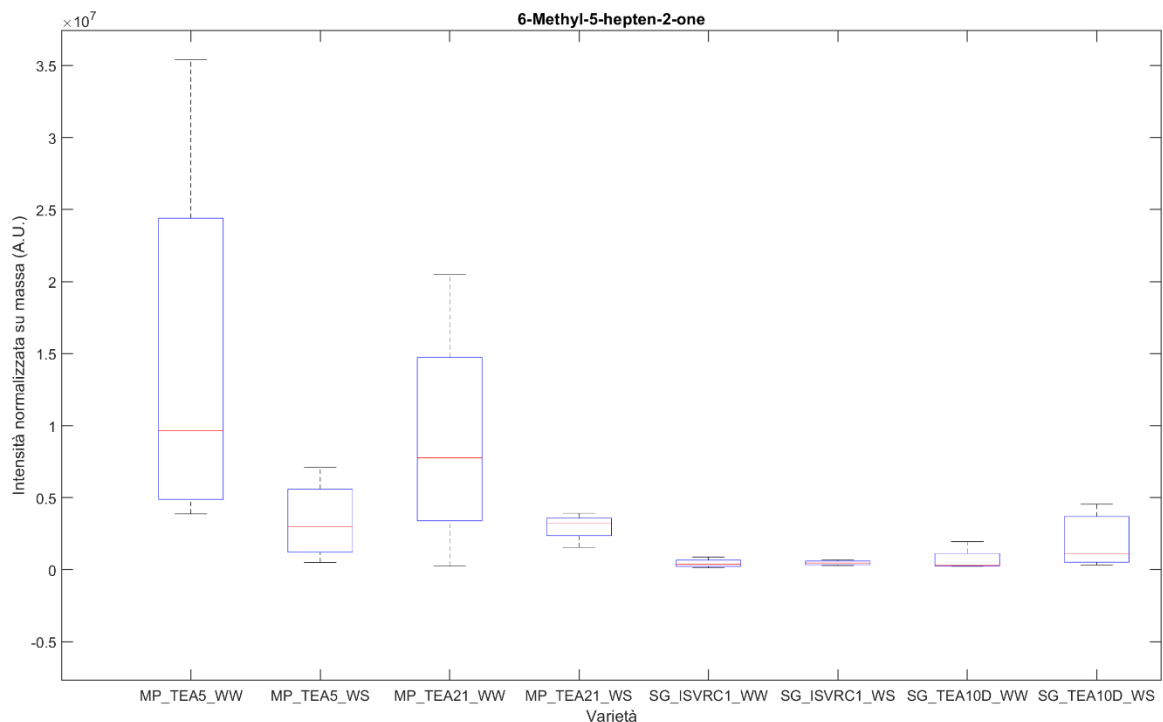


Figura 11. (*) Emissione di 6-methyl-5-hepten-2-one in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

Per 6-methyl-5-hepten-2-one (Figura 11), è sempre possibile notare una differenza intervarietale: le emissioni in MG risultano maggiori rispetto a quelle in SG ma sempre in calo in relazione allo stress. Come *trend* generale risulta simile ai primi osservati (Figura 7,8), salvo per la quasi nulla emissione

del composto in esame nella varietà Sangiovese. Una tendenza simile è osservata anche in ocimene (Figura 12), dove si nota un'emissione bassa in Sangiovese ed una differenza intravarietale in Montepulciano, con una diminuzione dell'emissione in TEA5 ed un lieve aumento in TEA21 a causa dello stress.

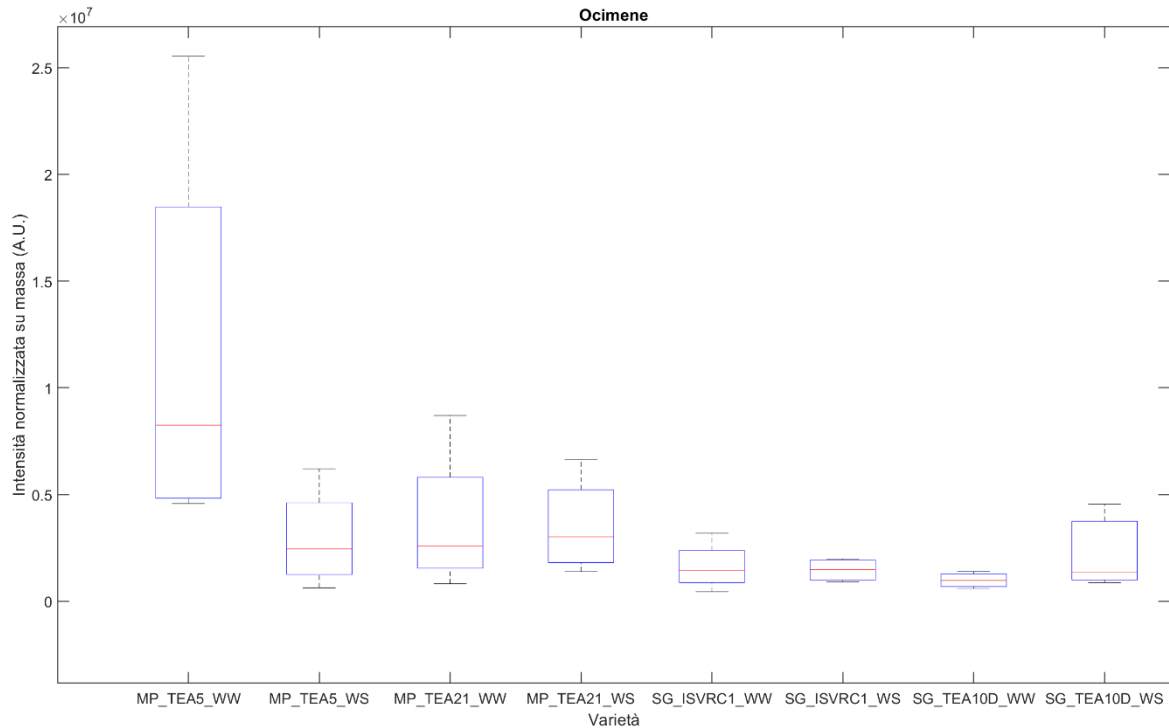


Figura 12. (*) Emissione di ocimene in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

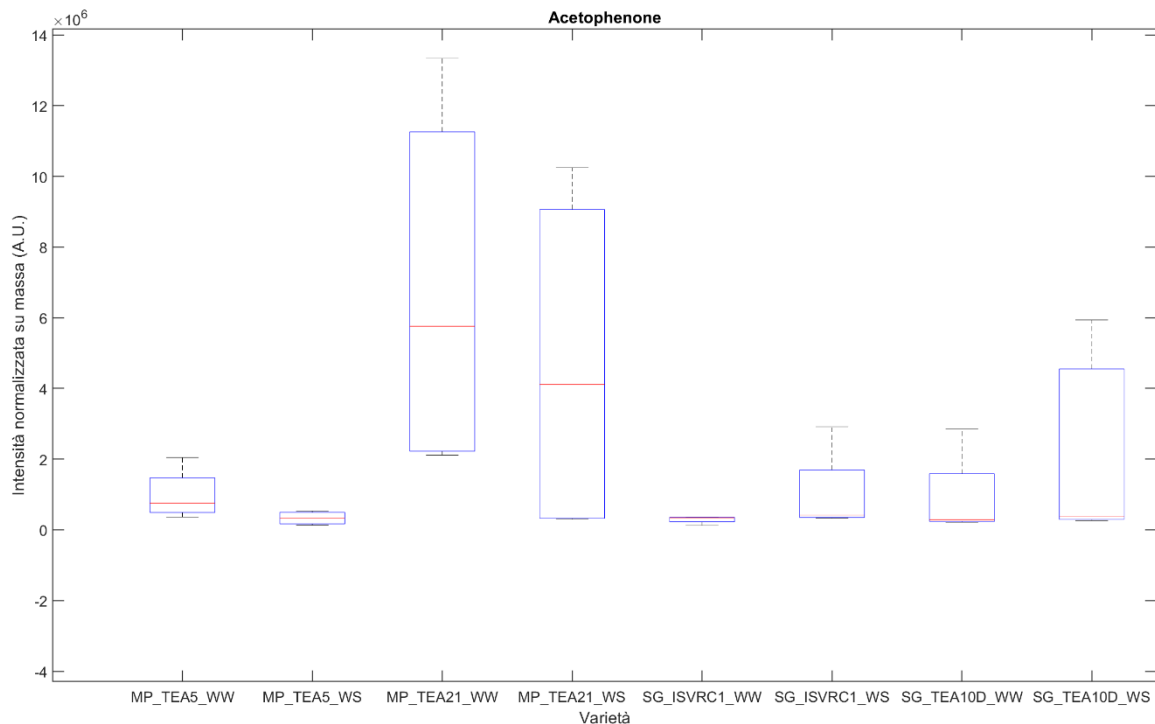


Figura 13. (*) Emissione di acetophenone in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

Anche per l'acetophenone (Figura 13) si riscontra un *trend* simile a quello di 6-methyl-5-hepten-2-one e ocimene (Figura 11,12), in questo caso è possibile notare una spiccata differenza intravarietale per Montepulciano: TEA5 emette in quantità molto ridotte rispetto a TEA21 ma sempre con un calo in relazione allo stress. Invece in Sangiovese l'emissione risulta quasi nulla e non è possibile osservare un calo od un aumento in relazione allo stress.

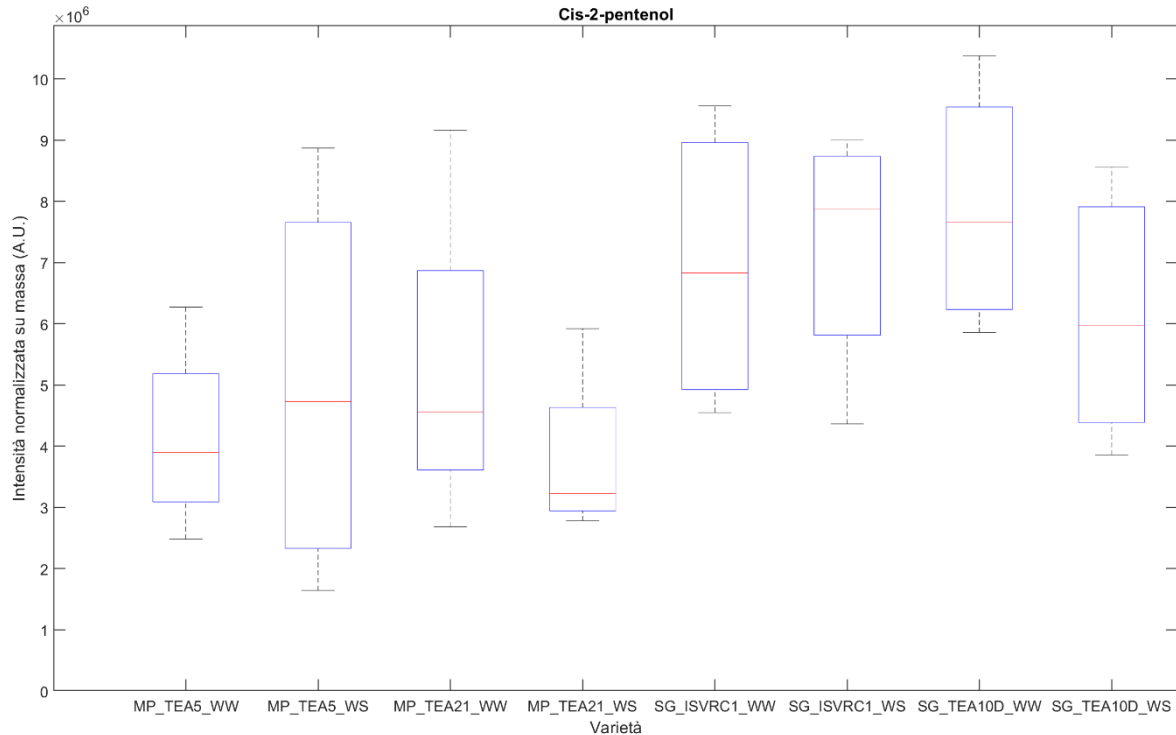


Figura 14. (n.s.) Emissione di cis-2-pentenol in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

Come si nota in Figura 14 l'emissione di cis-2-pentenol presenta differenze non significative tra tutte le tesi: la variabilità dell'emissione è superiore alle differenze intra e intervarietali e a quelle causate dallo stress. Un *trend* analogo è presente anche nell'emissione di 3-hexenal (Figura 15).

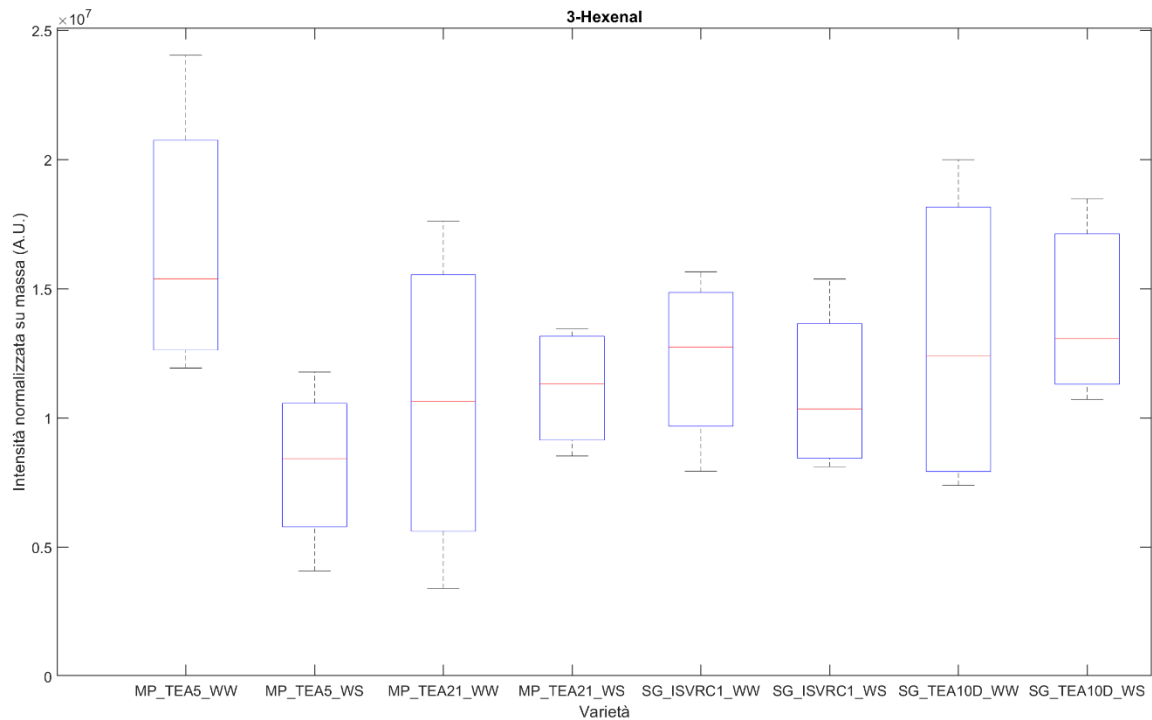


Figura 15. (n.s.) Emissione di 3-hexenal in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

In 4-methyl-5-hexen-2-ol (Figura 16) il *trend* di emissione osservata è diverso da quello in Figura 15 in quanto si nota un aumento delle emissioni in entrambe le varietà tranne per una differenza in Sangiovese in quanto in TEA10D l'emissione diminuisce.

L'emissione di 4-methyl-5-hexen-2-ol (Figura 16) risulta diversa; infatti, è possibile osservare un aumento dell'emissioni del composto in esame sia in Montepulciano che in Sangiovese tranne per una differenza intravarietale in Sangiovese con una diminuzione delle emissioni in TEA10D. Tuttavia, le differenze non sono statisticamente significative.

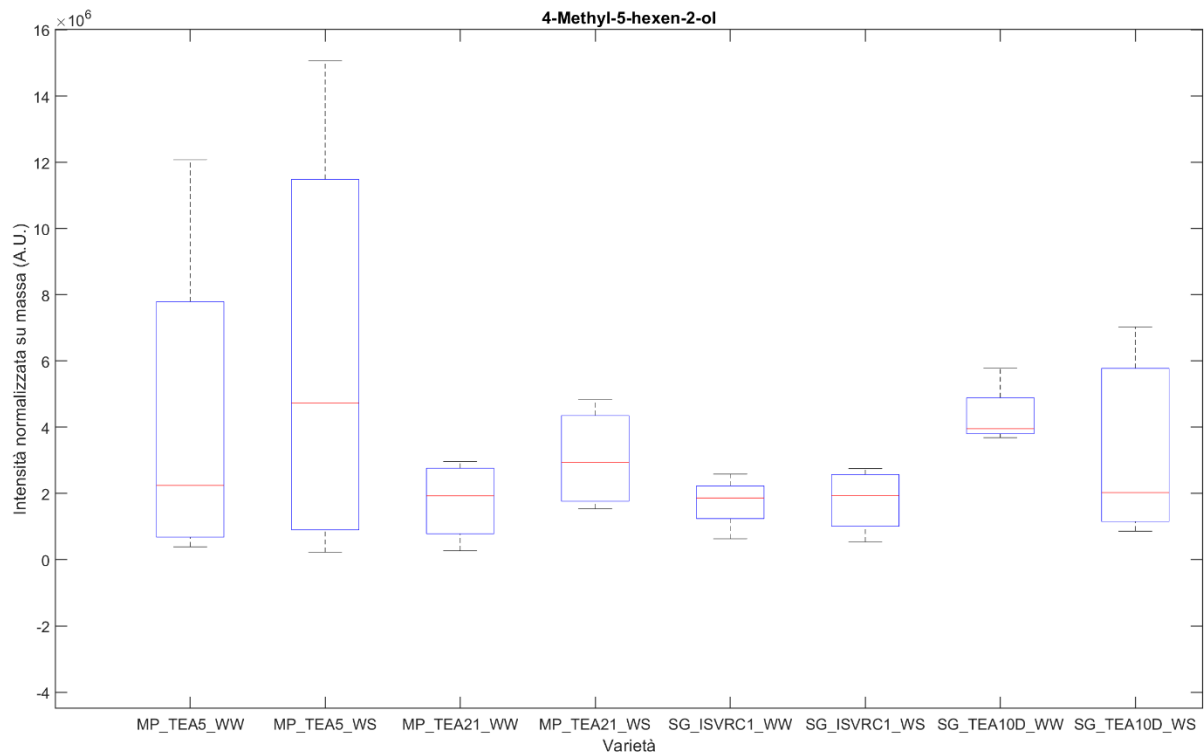


Figura 16. (n.s.) Emissione di 4-methyl-5-hexen-2-ol in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

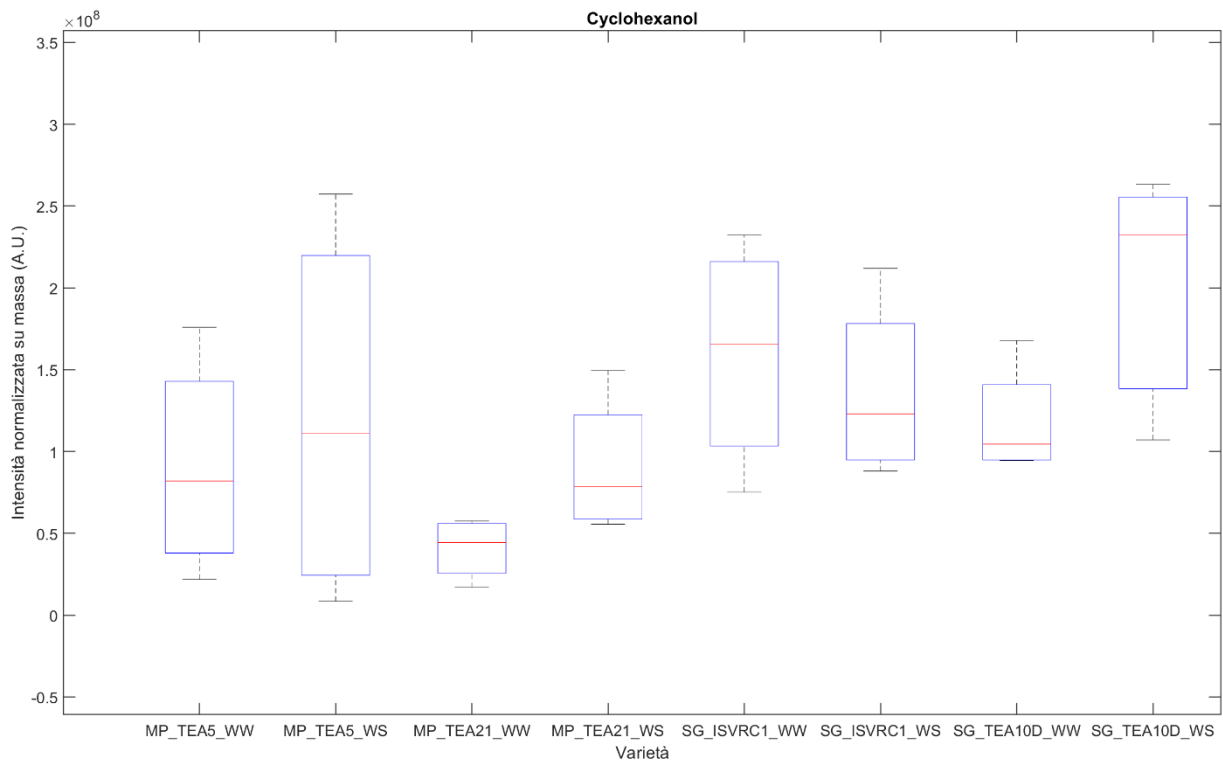


Figura 17. (n.s.) Emissione di cyclohexanol in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

Un *trend* analogo è riscontrabile anche in cyclohexanol (Figura 17) dove si osserva un aumento delle emissioni in entrambe le varietà tranne per il clone ISVRC1 di Sangiovese dove è presente una diminuzione dell'emissione. Al contrario in 2,4-hexadienal (Figura 18) si osserva un *trend* con

andamenti opposti in entrambe le varietà, in Montepulciano TEA5 diminuiscono le emissioni ed in TEA21 aumentano ma non quanto la diminuzione evidenziata in TEA5, in Sangiovese ISVRC1 le emissioni diminuiscono ed in TEA10D aumentano. Tuttavia, tutte queste differenze non sono statisticamente significative.

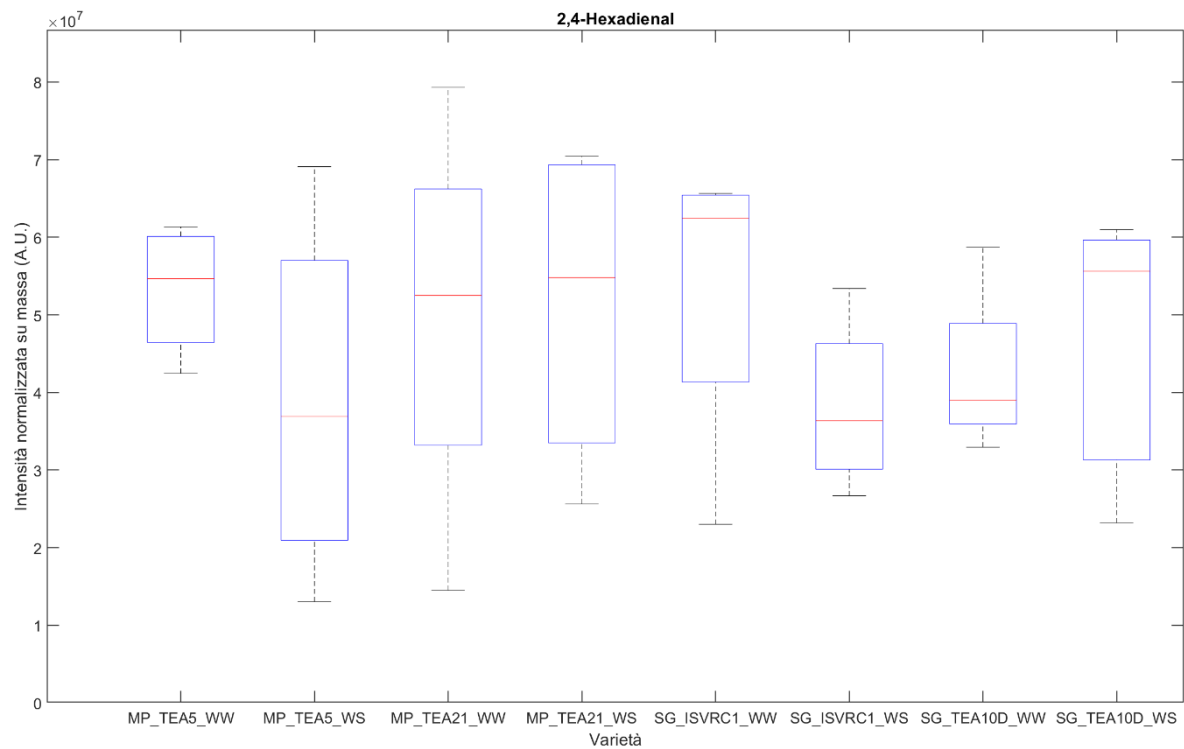


Figura 18. (n.s.) Emissione di 2,4-hexadienal in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

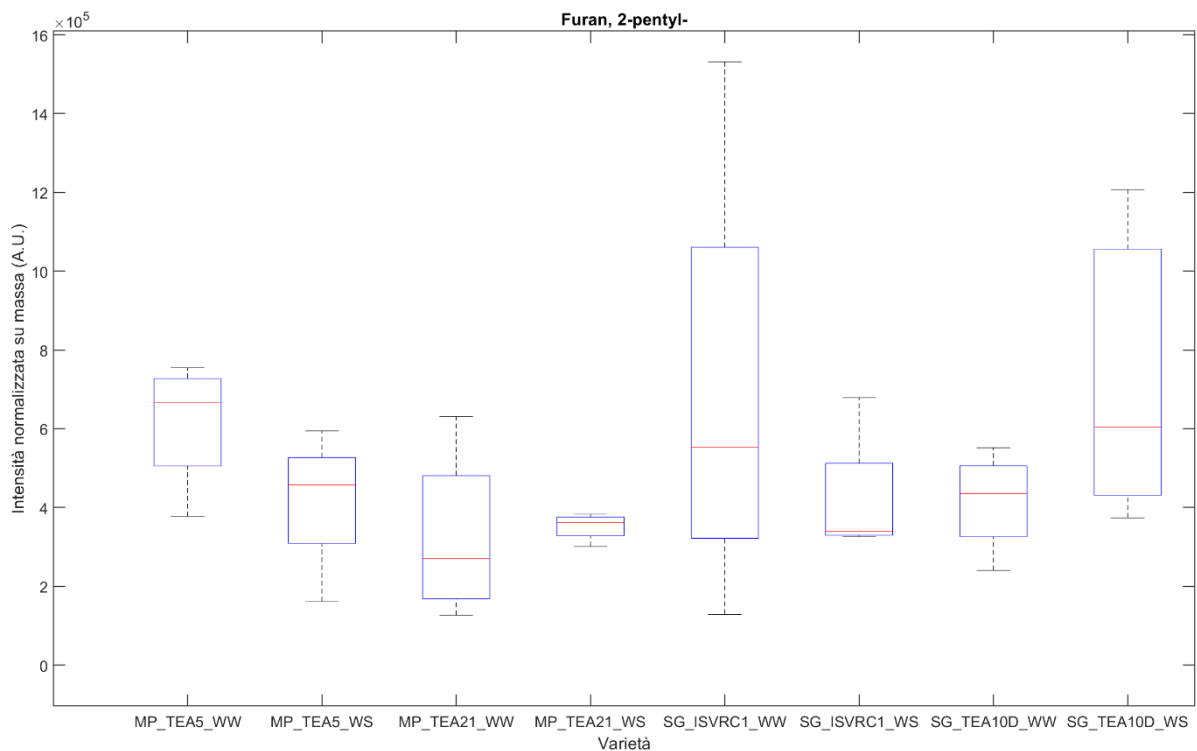


Figura 19. (n.s.) Emissione di furan,2-pentyl in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo

Anche per furan,2-pentyl (Figura 19) è possibile osservare un *trend* simile a quello in Figura 18, è quindi presente una diminuzione delle emissioni per Montepulciano TEA5 ed un aumento per TEA21, rispettivamente in Sangiovese ISVRC1 e TEA10D diminuiscono e aumentano le emissioni. Medesimo al furan,2-pentyl, è il *trend* del methyl salicylate (Figura 20), ma in questo caso l'aumento e la diminuzione delle emissioni è meno spiccata in Montepulciano. Tutte queste differenze non sono statisticamente significative.

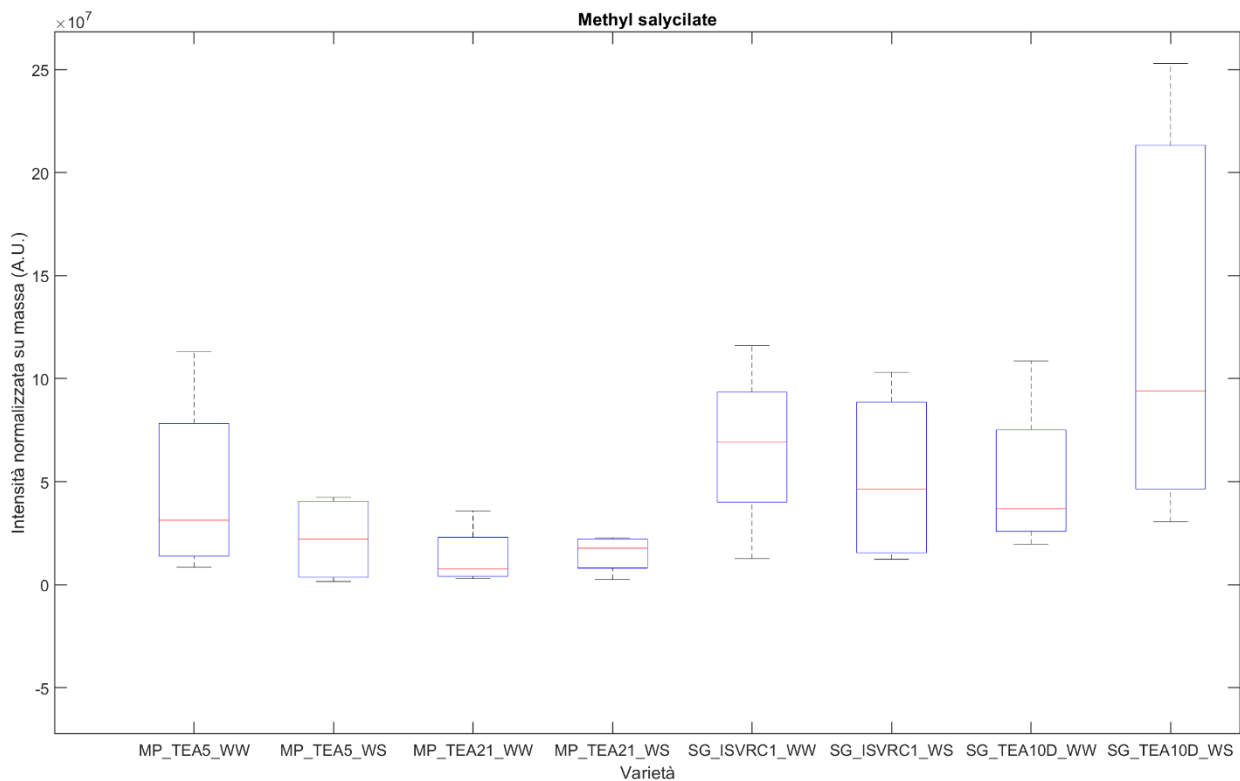


Figura 20. (n.s.) Emissione di methyl salicylate in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

Diverso è l'andamento per composto non identificato al tempo di ritenzione 53,289 min (Figura 21), in quanto si osserva un aumento delle emissioni in Montepulciano TEA5 ed una diminuzione in TEA21, per il Sangiovese invece ISVRC1 presenta una lieve diminuzione ed in TEA10D si osserva

una maggiore emissione. Tuttavia, tutte queste differenze non sono statisticamente significative.

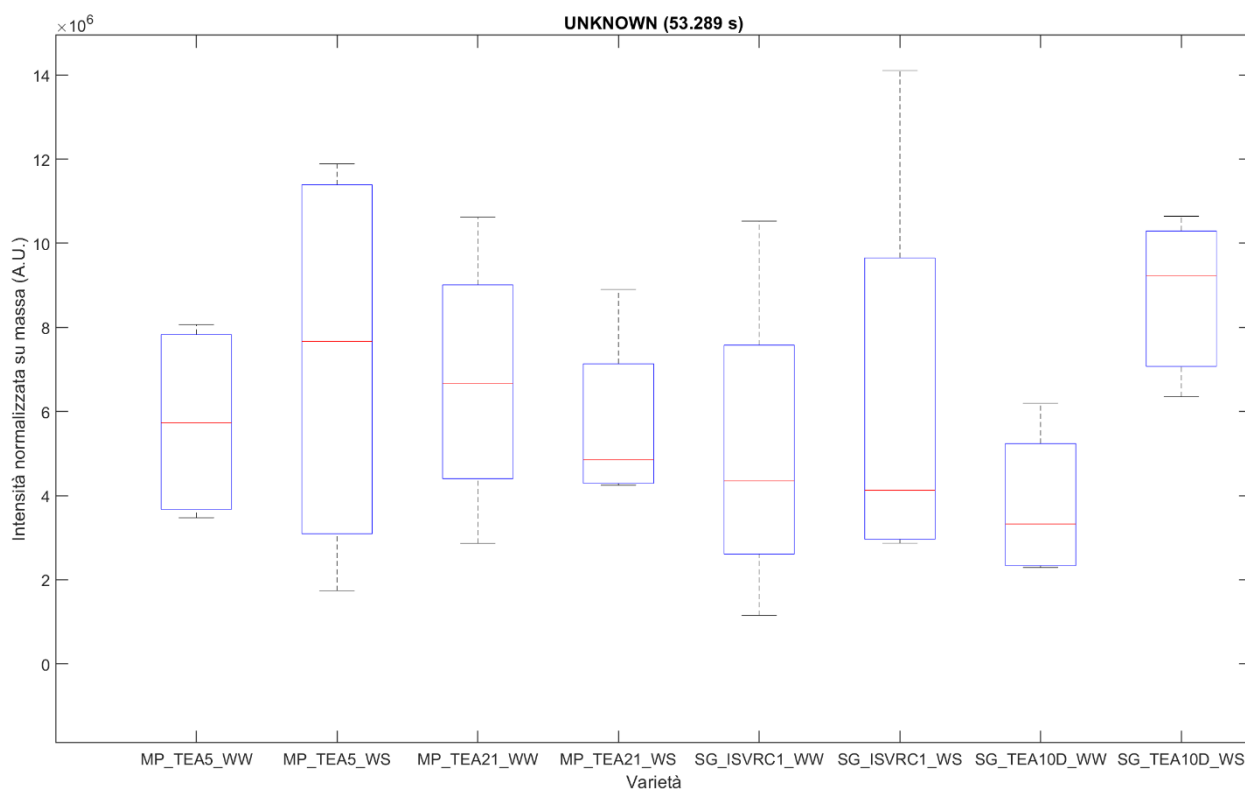


Figura 21. (n.s.) Emissione di un composto non identificato con tempo di ritenzione 53,289 min in tutti i cloni di Montepulciano (MP) e Sangiovese (SG) sottoposti a stress idrico comparata all'emissione delle piante di controllo.

3.3 Comparazione con la letteratura esistente

Dalla letteratura emerge che alcuni composti, tra cui monoterpeni, sesquiterpeni e alcoli, vengono emessi in quantità significativamente maggiori dalle piante in condizioni di stress idrico³⁰. Per quanto riguarda i monoterpeni, tuttavia, le evidenze riportate sono contrastanti: alcuni studi indicano un aumento della loro emissione in risposta alla siccità^{24,31}, mentre altri documentano una riduzione drastica in situazioni di stress idrico severo^{32,33}. Tali discrepanze potrebbero essere attribuibili alla variabilità nell'intensità e nella durata dello stress idrico, nonché alla diversa capacità di tolleranza alla siccità delle specie vegetali²³.

Nell'analisi effettuata si osservano andamenti simili a quelli presenti in uno studio di Griesser *et al*³⁴ nel quale viene evidenziata una maggior emissione di aldeidi e *Green Leaf Volatile* in risposta allo stress idrico.

In questa analisi, si nota un incremento delle emissioni di alcune aldeidi, tra cui benzaldehyde, 2-methyl butanal, 3-methyl butanal e pentanal. Tuttavia, i GLV mostrano un andamento opposto, con una riduzione delle emissioni, in particolare per 2-pentenal-(E), hexanal, 2-hexenal-(E) e 2,4-

hexadienal-(E). Per quanto riguarda i monoterpeni identificati, come detto precedentemente, si rilevano tendenze divergenti: l'ocimene presenta una diminuzione di emissione nel clone di Montepulciano TEA5 sottoposto a stress rispetto alla pianta di controllo, mentre l'1,8-cineole registra un aumento di emissioni nei cloni TEA5, TEA21 e TEA10D sottoposti a stress rispetto alle rispettive piante di controllo.

4. Conclusioni

Dall'analisi emerge una tendenza generale all'incremento dell'emissione di aldeidi a causa dello stress, come il pentanal, mentre i *Green Leaf Volatile* mostrano una riduzione, come nel caso per 2-pentenal, (E)-. Per quanto riguarda i monoterpeni, si riscontrano andamenti divergenti: per l'ocimene si evidenzia una diminuzione di emissione esclusivamente nel clone di Montepulciano TEA5 sottoposto a stress idrico mentre in TEA21 ed in Sangiovese TEA10D e ISVRC1 l'emissione risulta invariata in relazione allo stress, invece per l'1,8-cineole si evidenzia un aumento di emissione nei cloni di Montepulciano TEA5, TEA21 e Sangiovese TEA10D.

I risultati ottenuti evidenziano differenze parziali tra le piante di controllo e quelle sottoposte a stress idrico sia all'interno delle varietà Montepulciano e Sangiovese, sia tra le due varietà. Tuttavia, la maggior parte dei dati non risulta statisticamente significativa, e l'assenza di numerosi composti appartenenti alle classi dei terpeni, monoterpeni e sesquiterpeni ha impedito di individuare ulteriori differenze o tendenze congruenti tra i dati sperimentali e quelli riportati in letteratura.

Per future analisi di questo tipo sarà opportuno: aumentare il numero di campioni al fine di migliorare la robustezza statistica e di ottimizzare i parametri relativi alla corsa cromatografica, così da aumentare la capacità di rilevamento, in particolare dei sesquiterpeni.

5. Bibliografia

1. AR6 Synthesis Report: Climate Change 2023 — IPCC.
<https://www.ipcc.ch/report/sixth-assessment-report-cycle/>; accesso in rete 2024-09-17.
2. Meza, I.; Siebert, S.; Döll, P.; Kusche, J.; Herbert, C.; Eyshi Rezaei, E.; Nouri, H.; Gerdener, H.; Popat, E.; Frischen, J.; Naumann, G.; Vogt, J. V.; Walz, Y.; Sebesvari, Z.; Hagenlocher, M. Global-Scale Drought Risk Assessment for Agricultural Systems. *Nat. Hazards Earth Syst. Sci. Discuss.* **2019**, *19*, 2545–2573.
3. ISPRA: Bollettino Siccità.
https://www.isprambiente.gov.it/pre_meteo/siccitas/html/2024/index_2024.html; accesso in rete 2024-09-22.
4. Widhalm, J. R.; Jaini, R.; Morgan, J. A.; Dudareva, N. Rethinking How Volatiles Are Released from Plant Cells. *Trends Plant Sci.* **2015**, *20*, 545–550.
5. Rodríguez, A.; Alquézar, B.; Peña, L. Fruit Aromas in Mature Fleshy Fruits as Signals of Readiness for Predation and Seed Dispersal. *New Phytol.* **2013**, *197*, 36–48.
6. Cellini, A.; Spinelli, F. Composti volatili nelle interazioni ecologiche vegetali. *Italus Hortus* **2015**, *22* (2), 23–32.
7. Guenther, A.; Hewitt, C. N.; Erickson, D.; Fall, R.; Geron, C.; Graedel, T.; Harley, P.; Klinger, L.; Lerdau, M.; McKay, W. A.; Pierce, T.; Scholes, B.; Steinbrecher, R.; Tallamraju, R.; Taylor, J.; Zimmerman, P. A Global Model of Natural Volatile Organic Compound Emissions. *J. Geophys. Res. Atmospheres* **1995**, *100*, 8873–8892.
8. Bosman, R. N.; Lashbrooke, J. G. Grapevine Mono- and Sesquiterpenes: Genetics, Metabolism, and Ecophysiology. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, Article 1111392.
9. Lemaitre-Guillier, C.; Chartier, A.; Dufresne, C.; Douillet, A.; Cluzet, S.; Valls, J.; Aveline, N.; Daire, X.; Adrian, M. Elicitor-Induced VOC Emission by Grapevine Leaves: Characterisation in the Vineyard. *Molecules* **2022**, *27*, 6028.
10. Rodríguez-Decllet, A.; Castro-Marín, A.; Moretti Conti, L.; Lombini, A.; Chinnici, F.; Rombolà, A. D. Characterization of VOCs Emitted by Foliage of Grapevine Cv. Isabella for Prospecting Innovative Cropping Systems. *Agronomy* **2022**, *12*, 272.
11. Lazazzara, V.; Avesani, S.; Robatscher, P.; Oberhuber, M.; Pertot, I.; Schuhmacher, R.; Perazzolli, M. Biogenic Volatile Organic Compounds in the Grapevine Response to Pathogens, Beneficial Microorganisms, Resistance Inducers, and Abiotic Factors. *J. Exp. Bot.* **2022**, *73*, 529–554.
12. Lazazzara, V.; Bueschl, C.; Parich, A.; Simader, A.; Pertot, I.; Schuhmacher, R.; Perazzolli, M. Identification of Volatile Organic Compounds in Different Grapevine Genotypes after Inoculation with *Plasmopara Viticola*. *J. Plant Pathol.* **2015**, *97*, 93–102.
13. Dudareva, N.; Klempien, A.; Muhlemann, J. K.; Kaplan, I. Biosynthesis, Function and Metabolic Engineering of Plant Volatile Organic Compounds. *New Phytol.* **2013**, *198*, 16–32.

14. Tholl, D.; Hossain, O.; Weinhold, A.; Röse, U. S. R.; Wei, Q. Trends and Applications in Plant Volatile Sampling and Analysis. *Plant J.* **2021**, *106*, 314–325.
15. Tholl, D.; Boland, W.; Hansel, A.; Loreto, F.; Röse, U. S. R.; Schnitzler, J.-P. Practical Approaches to Plant Volatile Analysis. *Plant J.* **2006**, *45*, 540–560.
16. Schreier, P., Ed. *Analysis of Volatiles: Methods and Applications*; Proceedings, International Workshop, Würzburg, Federal Republic of Germany, September 28–30, 1983; de Gruyter: Berlin New York, 1984.
17. *Headspace Solid-Phase Microextraction: Fundamentals and Recent Advances. Adv. Sample Prep.* **2022**, *3*, Article 100035.
18. OIV. *State of the World Vine and Wine Sector in 2023.* https://www.oiv.int/sites/default/files/2024-04/OIV_STATE_OF_THE_WORLD_VINE_AND_WINE_SECTOR_IN_2023.pdf; accesso in rete 2024-11-20.
19. van Leeuwen, C.; Destrac-Irvine, A.; Dubernet, M.; Duchêne, E.; Gowdy, M.; Marguerit, E.; Pieri, P.; Parker, A.; de Rességuier, L.; Ollat, N. An Update on the Impact of Climate Change in Viticulture and Potential Adaptations. *Agronomy* **2019**, *9*, 514.
20. Moriondo, M.; Jones, G. V.; Bois, B.; Dibari, C.; Ferrise, R.; Trombi, G.; Bindi, M. Projected Shifts of Wine Regions in Response to Climate Change. *Clim. Change* **2013**, *119*, 825–839.
21. Droulia, F.; Charalampopoulos, I. Future Climate Change Impacts on European Viticulture: A Review on Recent Scientific Advances. *Atmosphere* **2021**, *12*, Article 495.
22. Tombesi, S.; Poni, S. Stress idrico in *Vitis vinifera*: variabilità delle risposte fisiologiche intraspecifiche e loro potenziale sfruttamento nella mitigazione degli effetti dei cambiamenti climatici.
23. Malik, T. G.; Sahu, L. K.; Gupta, M.; Mir, B. A.; Gajbhiye, T.; Dubey, R.; Clavijo McCormick, A.; Pandey, S. K. Environmental Factors Affecting Monoterpene Emissions from Terrestrial Vegetation. *Plants* **2023**, *12*, Article 3146.
24. Šimpraga, M.; Verbeeck, H.; Demarcke, M.; Joó, É.; Pokorska, O.; Amelynck, C.; Schoon, N.; Dewulf, J.; Van Langenhove, H.; Heinesch, B.; Aubinet, M.; Laffineur, Q.; Müller, J.-F.; Steppe, K. Clear Link between Drought Stress, Photosynthesis and Biogenic Volatile Organic Compounds in *Fagus Sylvatica* L. *Atmos. Environ.* **2011**, *45*, 5254–5259.
25. Haberstroh, S.; Kreuzwieser, J.; Lobo-do-Vale, R.; Caldeira, M. C.; Dubbert, M.; Werner, C. Terpenoid Emissions of Two Mediterranean Woody Species in Response to Drought Stress. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, Article 1071.
26. Sangiovese. Quattrocalici. <https://www.quattrocalici.it/vitigni/sangiovese/>; accesso in rete 2024-09-12.
27. Montepulciano. Quattrocalici.

<https://www.quattrocalici.it/vitigni/montepulciano/>; accesso in rete 2024-09-12.

28. *Centri Sample Preparation Platform* | Markes International. <https://markes.com/content-hub/brochures/centri>; accesso in rete 2024-10-02.
29. Zellner, B. d'Acampora; Bicchi, C.; Dugo, P.; Rubiolo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Linear Retention Indices in Gas Chromatographic Analysis: A Review. *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 297–314.
30. Brillì, F. L'impatto dello stress idrico e delle alte temperature sull'emissione di isoprene, sulla fotosintesi e respirazione.
31. Peñuelas, J.; Filella, I.; Seco, R.; Llusà, J. Increase in Isoprene and Monoterpene Emissions after Re-Watering of Droughted *Quercus Ilex* Seedlings. *Biol. Plant.* **2009**, *53*, 351–354.
32. Lavoit, A.-V.; Staudt, M.; Schnitzler, J. P.; Landais, D.; Massol, F.; Rocheteau, A.; Rodriguez, R.; Zimmer, I.; Rambal, S. Drought Reduced Monoterpene Emissions from the Evergreen Mediterranean Oak *Quercus Ilex*: Results from a Throughfall Displacement Experiment. *Biogeosciences* **2009**, *6*, 1167–1180.
33. Ormeño, E.; Mévy, J. P.; Vila, B.; Bousquet-Mélou, A.; Greff, S.; Bonin, G.; Fernandez, C. Water Deficit Stress Induces Different Monoterpene and Sesquiterpene Emission Changes in Mediterranean Species. Relationship between Terpene Emissions and Plant Water Potential. *Chemosphere* **2007**, *67*, 276–284.
34. Griesser, M.; Weingart, G.; Schoedl-Hummel, K.; Neumann, N.; Becker, M.; Varmuza, K.; Liebner, F.; Schuhmacher, R.; Forneck, A. Severe Drought Stress Is Affecting Selected Primary Metabolites, Polyphenols, and Volatile Metabolites in Grapevine Leaves (*Vitis Vinifera* Cv. Pinot Noir). *Plant Physiol. Biochem.* **2015**, *88*, 17–26.

Ringraziamenti

Un ringraziamento speciale al Prof. Luca Cappellin e al Dott. Daniele Zatta per la loro disponibilità, pazienza e competenza, nonché per il tempo e l'attenzione dimostrati durante la scrittura della mia tesi. Il loro prezioso supporto è stato essenziale per affrontare le sfide di questo percorso, rendendolo più stimolante e formativo.