



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

CURRICULUM PRODUZIONE E PROTEZIONE DELLE COLTURE

**VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ E
DELLA SUSCETTIBILITÀ A MUFFA
GRIGIA DI FRUTTI DI FRAGOLA
ATTRAVERSO ANALISI NIR**

**Evaluation of strawberry fruit quality and susceptibility
to gray mold by NIR analysis**

TESI SPERIMENTALE

**Studente:
FRANCESCO GAGLIARDI**

**Relatore:
PROF. FRANCO CAPOCASA**

**Correlatori:
DOTT. LUCA MAZZONI**

DOTT.SSA MANUELA MANCINI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	3
ELENCO DEI GRAFICI.....	4
ELENCO DELLE FIGURE	6
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	7
1.1 Origine e caratteristiche genetiche della fragola.....	9
1.2 Aspetti botanici	9
1.3 La classificazione delle cultivar.....	11
1.4 Il quadro produttivo italiano	12
1.4.1 Tecniche di programmazione colturale.....	13
1.5 Miglioramento genetico	15
1.6 La botrite in fragola (<i>Botrytis cinerea</i>)	16
1.7 La qualità in frutti di fragola.....	18
1.7.1 Fattori che determinano la qualità.....	19
1.8 Principali metodiche di analisi qualitative per le fragole.....	20
1.8.1 Spettroscopia NIR.....	20
CAPITOLO 2 SCOPO DELLA TESI.....	23
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI.....	24
3.1 Descrizione campo e tecnica colturale.....	24
3.2 Descrizione del materiale vegetale	25
3.3 Metodi di raccolta e campionamento frutti	27
3.4 Procedimento di analisi e valutazione dei parametri esaminati	27
3.5 Protocollo di sterilizzazione e contaminazione.....	28
3.6 Contenuto in solidi solubili.....	29
3.7 Acidità titolabile.....	29
3.8 Valutazione del danno da <i>Botrytis cinerea</i>	30
3.9 Spettroscopia NIR.....	30
3.10 Analisi multivariata dei dati.....	32
3.10.1 Pretrattamento dei dati spettrali	32
3.10.2 Principal Component Analysis (PCA).....	33
3.10.3 Partial Least Squares Regression (PLS)	34
CAPITOLO 4 RISULTATI E DISCUSSIONI	35

4.1 Contenuto in solidi solubili.....	35
4.2 Acidità titolabile.....	36
4.3 Differenze varietali: PCA e spettri medi.....	37
4.3.1 Stagione vegetativa 2020.....	37
4.3.2 Stagione vegetativa 2021.....	41
4.3.3 Interpretazione dati spettrali.....	47
4.4 Valutazioni stato fitosanitario.....	48
4.4.1 Stagione vegetativa 2020.....	48
4.4.2 Stagione vegetativa 2021.....	50
4.4.3 Interpretazione dati spettrali.....	54
4.5 Partial Least Squares Regression (PLS).....	55
4.5.1 Stagione vegetativa 2021: predizione del contenuto in solidi solubili.....	55
4.5.2 Stagione vegetativa 2021: predizione del contenuto in solidi solubili con dati ottenuti da FT-NIR e Micro-NIR.....	56
4.5.3 Risultati su acidità titolabile.....	58
CAPITOLO 5 CONCLUSIONI.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	61

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1 Cultivar di riferimento esaminate nella prova.....	26
Tabella 2 Parametri di acquisizione dello spettrofotometro FT-NIR (FT-NIR mod. Nicolet iS10, THERMO).....	31
Tabella 3 Parametri di acquisizione dello spettrofotometro Micro-NIR.....	31
Tabella 4 Contenuto in Solidi Solubili (°Brix) e relative deviazioni standard anno 2020	35
Tabella 5 Contenuto in Solidi Solubili (°Brix) e relative deviazioni standard anno 2021	35
Tabella 6 Contenuto in solidi solubili (°Brix) dei frutti delle varietà analizzate nei due anni di prova e variazione percentuale del contenuto in Solidi Solubili.....	36
Tabella 7 Acidità titolabile (% di acido citrico) e relative deviazioni standard anno 2020	36
Tabella 8 Acidità titolabile (% di acido citrico) e relative deviazioni standard anno 2021	37
Tabella 9 Acidità titolabile (% di acido citrico) dei frutti delle varietà analizzate nei due anni di prova e variazione percentuale del contenuto in Acidità.	37
Tabella 10 Lunghezza d'onda e interpretazione differenze tra le varietà.....	40
Tabella 11 Lunghezza d'onda e interpretazione differenze tra le varietà.....	47

ELENCO DEI GRAFICI

Grafico 1 Score-Plot della PCA di tutti i frutti raccolti nella stagione vegetativa del 2020. La matrice è stata pretrattata con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.	38
Grafico 2 Primo e secondo loading della PCA anno 2020.....	39
Grafico 3 Spettri medi delle 4 varietà di fragole considerate per l'anno 2020 utilizzando il pretrattamento di derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.	40
Grafico 4 Score-Plot della PCA calcolata sui dati spettrali ottenuti dallo strumento da banco FT-NIR (anno 2021) con pretrattamento di derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.	42
Grafico 5 primo e secondo loading della PCA calcolato con i dati dello strumento FT-NIR, stagione vegetativa 2021.	43
Grafico 6 Spettri medi delle varietà di fragole considerate per la stagione vegetativa 2021 ed analizzate con lo strumento da banco FT-NIR. I dati spettrali sono stati pretrattati utilizzando la derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.	44
Grafico 7 Score-Plot della PCA calcolata sui dati spettrali ottenuti dallo strumento Micro-NIR di tutti i frutti (anno 2021) con pretrattamento di derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.	45
Grafico 8 Primo e secondo loading della PCA calcolata sulla matrice dei dati microNIR, stagione vegetativa 2021.	46
Grafico 9 Spettri medi delle varietà di fragole considerate per la stagione vegetativa 2021 ed analizzate con lo strumento portatile Micro-NIR. La matrice è stata pretrattata con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.....	47
Grafico 10 Score-Plot delle PCA calcolate sui dati spettrali di ogni varietà ottenuti dallo strumento da banco FT-NIR nella stagione vegetativa 2020. I dati sono stati pretrattati con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.....	49

Grafico 11 Spettri medi delle tre classi di danno per ogni varietà considerata per la stagione vegetativa 2020 ed analizzate con lo strumento da banco FT-NIR. I dati sono stati pretrattati utilizzando la derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV. 50	50
Grafico 12 Score-Plot delle PCA calcolate sui dati spettrali di ogni varietà ottenuti dallo strumento da banco FT-NIR nella stagione vegetativa 2021. I dati sono stati pretrattati con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV..... 51	51
Grafico 13 Spettri medi delle tre classi di danno per ogni varietà considerata per la stagione vegetativa 2021 ed analizzate con lo strumento da banco FT-NIR. I dati sono stati pretrattati utilizzando la derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV. 52	52
Grafico 14 Score-Plot delle PCA calcolate sui dati spettrali di ogni varietà ottenuti dallo strumento portatile microNIR nella stagione vegetativa 2020. I dati sono stati pretrattati con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV..... 53	53
Grafico 15 Spettri medi delle tre classi di danno per ogni varietà considerata per la stagione vegetativa 2021 ed analizzate con lo strumento portatile Micro-NIR. I dati sono stati pretrattati con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV 54	54
Grafico 16 Retta di validazione (rosso) e retta di calibrazione (blu) del modello ottenuto con pretrattamento derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale), SNV e media delle repliche 56	56
Grafico 17 Retta di validazione (rosso) e retta di calibrazione (blu) del modello ottenuto dai dati di FT-NIR con pretrattamento derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale), SNV e media delle repliche 57	57
Grafico 18 Retta di validazione (rosso) e retta di calibrazione (blu) del modello ottenuto dai dati di Micro-NIR (spettro completo) con pretrattamento derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale), SNV e media delle repliche 58	58
Grafico 19 Retta di validazione (rosso) e retta di calibrazione (blu) del modello ottenuto dai dati di Micro-NIR (spettro ridotto) con pretrattamento derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale), SNV e media delle repliche 58	58

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. Varie forme di frutti di fragola	11
Figura 2 Regioni dello spettro elettromagnetico con espansione della regione infrarossa	21
Figura 3 Procedura di lavoro.....	28
Figura 4 Frutti della varietà Romina al t4. A sinistra frutti non contaminati, a destra frutti contaminati.....	30

Capitolo 1

INTRODUZIONE

La fragola è una pianta di origine europea che si trova spontanea nei boschi. Le varietà coltivate sono degli ibridi derivanti soprattutto dalla specie *Fragaria x ananassa*, fortemente dipendente dall'interazione genotipo-ambiente.

Questo frutto rientra nella più ampia categoria dei piccoli frutti (berries) ed è uno dei prodotti che gode delle più alte aspettative sugli incrementi di consumo pro-capite a livello globale. Nel mondo nel 2017, secondo i dati Faostat, sono state prodotte 9.223.815 tonnellate su una superficie di 395.844 ettari. Il Paese leader è la Cina con 3.801.865 tonnellate su una superficie di 133.114 ettari. Seguono poi gli Usa con 1.449.280 tonnellate (su 21.327 ettari) e Messico con 658.436 tonnellate (su 13.850 ettari). L'Italia è al quattordicesimo posto mondiale con 125.335 tonnellate e 4.855 ettari ed è quinto in Europa.

La fragolicoltura negli ultimi trent'anni è stata rivoluzionata dalla ricerca dei breeder di varietà che si avvicinassero sempre più alle richieste dei consumatori, ma allo stesso tempo, che fossero capaci di adattarsi ai differenti areali di coltivazione, offrendo alte produzioni.

I programmi di miglioramento genetico avviati all'inizio degli anni '80 in Italia, hanno portato all'ottenimento di varietà adatte soprattutto a coltivazioni in ambienti con condizioni pedoclimatiche tipiche del Nord (Emilia-Romagna), delle zone montane (Trentino e Piemonte) e del Sud, in terreni generalmente bromurati ampiamente diffusi nelle aree di coltivazione intensiva della fragola. Le nuove varietà ottenute dal programma ebbero grande successo, tanto da rappresentare alla fine degli anni '90 la maggior parte delle varietà coltivate nelle principali aree di produzione del Nord (Pianura Padana).

Nel 2005 però, la Comunità Europea ha emanato il divieto d'uso della bromurazione, che assieme alla crescente esigenza di prodotti a basso impatto con garanzie per il consumatore, obbliga gli attuali breeder a ricercare nuovi genotipi di fragola. Inoltre, la crescente attenzione su parametri qualitativi, quali il contenuto zuccherino e il contenuto di acidità, su parametri nutrizionali, come il contenuto di composti bioattivi all'interno dei frutti di fragola e l'assenza di fitopatologie hanno determinato una variazione degli obiettivi: si cerca di individuare quelle

varietà che meglio si adattino a determinate condizioni pedoclimatiche per ottenere frutti con caratteristiche qualitative, nutrizionali e sanitarie elevate.

Le tecniche più utilizzate al giorno d'oggi per misurare i parametri sopra citati nella maggior parte dei casi sono di tipo distruttivo, comportano quindi la perdita di integrità del frutto e risultano lente e dispendiose a livello economico.

La spettroscopia nel vicino infrarosso rappresenta una importante alternativa alle tecniche tradizionali essendo una tecnica di analisi che utilizza la regione infrarossa dello spettro elettromagnetico per indagare in modo non distruttivo sulle proprietà chimico-fisiche dei campioni, trovando notevoli riscontri in campo agro-alimentare.

I migliori risultati si ottengono quando la spettroscopia NIR (Near InfraRed) è accoppiata a metodi chemiometrici e all'analisi statistica multivariata dei dati. Queste tecniche, infatti, permettono di mettere in relazione tramite metodi statistici e matematici i dati spettrali con le caratteristiche chimico-fisiche del campione analizzato ed ottenere dei modelli predittivi.

L'uso di questa tecnica sia in campo che nelle aziende di lavorazione garantirebbe una maggiore sicurezza dal punto di vista fitosanitario e maggiore uniformità non solo in termini di aspetto esteriore, ma anche in termini di shelf life e qualità intesa come contenuto in zuccheri e acidità, principali responsabili del sapore del frutto.

1.1 Origine e caratteristiche genetiche della fragola

La Fragola è una pianta dicotiledone che appartiene al genere *Fragaria*, famiglia delle *Rosaceae*, sottofamiglia *Rosoideae*; al genere *Fragaria* appartengono numerose specie, che si differenziano principalmente per il livello di ploidia, ovvero il numero di copie di cromosomi presenti nel nucleo. Le specie più comuni sono diploidi, tetraploidi, esaploidi e ottoploidi. Le specie diploidi hanno un assetto cromosomico caratterizzato dalla presenza nel nucleo cellulare di cromosomi aventi ognuno due copie morfologicamente uguali ($2n = 2x = 14$ cromosomi).

Tra le specie diploidi possiamo individuare *F. viridis* e *F. vesca*, nota come fragola di bosco e diffusa dalla Sicilia al nord Europa. Il nome *Fragaria vesca*, deriva dal latino *fragus* che indica fragranza (ossia l'aroma) e *vescus*, che denota ciò che è molle (ossia il frutto). Questa specie è caratterizzata da piccoli frutti aromatici di forma rotonda e allungata, ma presenta molti acheni risultando quindi di difficile digeribilità.

Le specie tetraploidi hanno un assetto cromosomico caratterizzato dalla presenza nel nucleo cellulare di cromosomi aventi ognuno quattro copie morfologicamente uguali ($2n=4x=28$). Le specie tetraploidi sono *F. moupinensis* e *F. orientalis*.

Le specie esaploidi hanno un assetto cromosomico caratterizzato dalla presenza nel nucleo cellulare di cromosomi aventi ognuno sei copie morfologicamente uguali ($2n=6x=42$). *F. moschata* è l'unica specie esaploide. Questa specie ha come limite meridionale l'areale della Val Padana, ed è riconosciuta per i suoi fiori perfetti, frutti piuttosto grossi, aromatici e di forma arrotondata.

Le specie ottoploidi hanno un assetto cromosomico caratterizzato dalla presenza nel nucleo cellulare di cromosomi aventi ognuno otto copie morfologicamente uguali ($2n=8x=56$). Le specie ottoploidi, *F. ovalis*, *F. chiloensis* e *F. virginiana*, sono caratterizzate da un frutto grosso. È dall'incrocio casuale delle specie *F. virginiana* e *F. chiloensis* che si è creato l'ibrido interspecifico ottoploide attualmente coltivato *Fragaria x ananassa*.

1.2 Aspetti botanici

La Fragola è una dicotiledone perenne, considerata, erroneamente, di tipo erbaceo; essa è costituita da un apparato radicale fascicolato, da un fusto raccorciato (corona o rizoma), da un apparato fogliare, da stoloni radicanti, dalle infiorescenze e dai frutti.

L'apparato radicale si sviluppa dalla corona, vicino alla superficie del terreno, è di tipo fascicolato e, generalmente, l'80-90% si trova nei primi 25-30 cm della rizosfera.

Le radici si distinguono in:

- radici primarie, originatesi direttamente dalla corona;
- radici secondarie, originatesi dalla diramazione di quelle primarie.

Questo apparato è adibito alla duplice funzione di assorbimento dell'acqua e degli elementi nutritivi presenti nel suolo che sono necessari per lo sviluppo vegetativo e per la fruttificazione e di immagazzinamento delle sostanze di riserva, principalmente zuccheri e lipidi.

Il fusto, raccorciato, è lungo fino a 10 cm e ha la funzione di accumulo di sostanze di riserva. Le foglie sono costituite da lunghi piccioli e sono composte da tre foglioline di forma ovale più o meno allungata, seghettate e riunite a rosetta: svolgono la funzione di fotosintesi e sono ricche di stomi per garantire una buona traspirazione.

Alla base delle foglie, a ridosso della corona, si formano delle gemme che in base al fotoperiodo, quindi in base al numero di ore in luce e ai valori di temperatura giornalieri, potranno dare origine a infiorescenze produttive, a germogli o a stoloni.

I grappoli fiorali sono inseriti sul fusto e sui germogli all'ascella delle foglie e sono composti da un asse primario, due assi secondari, 4 terziari e così via, in relazione al loro sviluppo scalare che porta ad una scalarità di produzione con differenze morfologiche significative dei frutti. Negli apici degli assi fiorali si inseriscono i fiori che sono riuniti in infiorescenze.

La parte edule dell'infruttescenza della fragola viene detta "falso frutto" perché deriva dalla crescita del ricettacolo e non dell'ovario (come avviene nelle *Rosaceae*). In realtà il vero frutto è l'achenio, un frutto secco e indeiscente derivato dalla fecondazione dell'ovario e comunemente reputato erroneamente come il seme. Gli acheni si dispongono sulla superficie della porzione edule del frutto in modo affiorante o sommerso.

Le dimensioni del frutto possono essere molto piccole, piccole, medie, grosse o molto grosse; il frutto può avere forma reniforme, subsferica, sferica, conica, bi-conica, quasi cilindrica, incuneata, ovoidale e cuoriforme; il colore può variare dall'aranciato chiaro, al rosso-aranciato e al rosso intenso. Per avere frutti di forma regolare è necessario che tutti i pistilli vengano fecondati; se la fecondazione avviene in maniera non uniforme darà origine a frutti deformati non commerciabili.

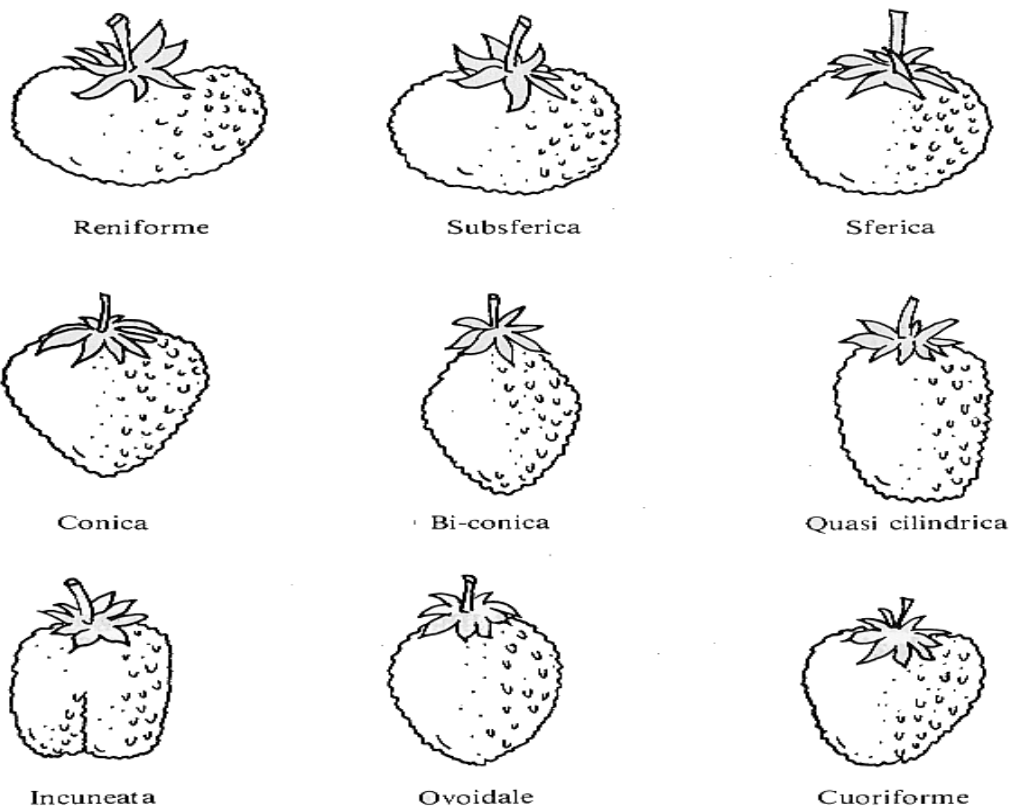


Figura 1. Varie forme di frutti di fragola

1.3 La classificazione delle cultivar

Le numerose cultivar, in base alla loro reazione al fotoperiodo vengono in genere classificate nelle seguenti categorie:

- **Cultivar Brevidiurne (Short Day) – Unifere:** in seguito alla differenziazione delle gemme a fiore in autunno, le piante fioriscono una sola volta nell'anno (in primavera), sono quindi unifere e vengono chiamate brevidiurne (SD "short day"). Esse infatti richiedono, per l'induzione a fiore delle gemme, una lunghezza di luce giornaliera inferiore alle 12 ore e temperature inferiori a 15°C, dunque nel nostro emisfero le cultivar unifere differenziano in autunno, dalla fine di settembre fino alle prime gelate invernali. La pianta durante l'inverno entra in riposo vegetativo, mentre la fioritura delle gemme avviene in primavera, consentendo una produzione che matura in un periodo di tempo più o meno lungo a seconda di vari fattori.
- **Cultivar Neutrodiurne (Day Neutral) – Rifiorenti:** indifferenti al fotoperiodo e differenziano gemme indipendentemente dalla durata del giorno: il principale fattore limitante dell'induzione florale è rappresentato dalla temperatura (15° - 16° C).

Appartengono a questa categoria tutte le cultivar “rifioventi” oggi più coltivate nel mondo.

- Cultivar Longidiurne (Long Day) – Rifioventi: sono caratterizzate dalla differenziazione delle gemme a fiore nel periodo primaverile-estivo, quando si hanno giornate con 14 ore di luce o più, quindi quelle diffuse nei climi temperati (dal 40° al 60° parallelo) differenziano in estate e fruttificano dalla primavera fino all'autunno.

1.4 Il quadro produttivo italiano

Secondo i dati di Cso Italy, nel 2020 le superfici specializzate dedicate alla fragola sono state pari a 3.646 ha, con un calo del 4% circa rispetto al 2019. Si rileva, pertanto, una lieve diminuzione dopo un periodo di crescita che aveva portato a guadagnare oltre 250 ha nel quadriennio 2016-2019. L'83% delle superfici investite sono in coltura protetta e solamente il 17% resiste ormai in pieno campo. Circa 250 ha sono coltivati con tecnica biologica.

La fragolicoltura italiana è da tempo in fase di concentrazione nelle regioni meridionali e anche il 2020 conferma questa tendenza con una diminuzione del 7% nelle aree settentrionali e del 6% in quelle meridionali. Attualmente, Basilicata e Campania raggruppano attorno al 50% delle superfici complessive, mentre il complesso delle 4 maggiori regioni del Nord supera di poco il 22%.

Nel Nord Italia, sono soprattutto Veneto ed Emilia-Romagna a evidenziare le maggiori sofferenze, con una perdita del 20% delle superfici coltivate nell'ultimo quinquennio, mentre Piemonte e Trentino-Alto Adige evidenziano maggiore stabilità. Ciò è in parte un riflesso delle difficoltà che si riscontrano nelle aree produttive i cui raccolti si concentrano soprattutto nelle fasi centrali della campagna, mentre chi è in grado di arrivare sul mercato nelle fasi più estreme, precoci o tardive, riesce ancora a opporre una più tenace resistenza alla concorrenza estera, rappresentata ovviamente in larga parte dalla Spagna.

Nelle aree produttive settentrionali, la coltivazione della fragola è ormai diffusa soprattutto in aziende dirette coltivatrici di piccole o medio-piccole dimensioni, a differenza del Sud Italia dove si riscontrano anche centri produttivi di maggiore rilievo dimensionale. Rispetto agli altri Paesi, in cui la fragolicoltura si concentra in larga parte in una sola area, l'Italia mantiene un'apprezzabile diversificazione produttiva e, grazie a condizioni climatiche piuttosto differenziate tra le regioni produttrici, anche un panorama varietale piuttosto articolato.

In particolare, si assiste a una progressiva specializzazione di ogni area in determinate cultivar, come per la Basilicata, dove l'80% degli investimenti sono dedicati a *Sabrosa*, o la Campania con il 67% delle superfici suddivise fra *Sabrina* e *Melissa*. Anche la Sicilia è specializzata in

una sola varietà, *Florida Fortuna*, idonea alle produzioni molto precoci. Nelle regioni del Nord Italia, al contrario, il grado di specializzazione varietale è inferiore con numerose varietà che compongono il quadro produttivo.

La produzione annua è attestata attorno a 130.000 t, con oscillazioni da 125.000 fino a quasi 150.000 t.

1.4.1 *Tecniche di programmazione colturale*

Nel nostro Paese la fragola viene coltivata, con differenti tecniche di programmazione colturale, da Nord a Sud, dal livello del mare, isole comprese, fino ad altitudini di 1700 metri, in aree tra loro molto diversificate in termini di durata ed entità del freddo autunnale e invernale. I parametri termofotoperiodici sono in grado di influenzare notevolmente la differenziazione delle gemme e quindi il comportamento vegeto-produttivo delle piante.

La programmazione colturale nella fragolicoltura permette al produttore di diversificare la propria produzione commerciale attraverso una destagionalizzazione di essa, oltre che diversificarla sulla base di parametri produttivi e qualitativi.

La fragola attualmente in Italia è considerata ancora un prodotto stagionale; infatti, negli anni '80, tra il mese di aprile e quello di maggio si concentrava più dell'80% della produzione a livello nazionale. Questo aspetto ha creato in alcune annate pericolose concentrazioni di prodotto sul mercato che insieme ad altre ragioni (aumento costi di produzione) hanno determinato la crisi che ha interessato la fragola negli anni successivi, sul nostro territorio.

La destagionalizzazione della produzione permette di distribuire l'offerta del prodotto nell'arco dell'anno evitando le pericolose concentrazioni di prodotto in un'epoca ristretta; viene messa in atto attraverso una programmazione accurata dell'impianto fragolico, facendo attenzione a utilizzare cultivar in grado di adattarsi all'ambiente pedoclimatico regionale e alla tecnica di coltivazione caratteristica dell'areale; le varietà utilizzate devono essere scelte in base a diversi criteri, quali:

- Termofotoperiodo
- Epoca di maturazione (indice di precocità)
- Fabbisogno di ore in freddo
- Caratteristiche produttive/qualitative proprie della cultivar
- Rusticità della cultivar
- Tipo di materiale di propagazione
- Epoca di impianto colturale
- Tecniche colturali adottate

La scelta dei criteri in relazione con il pedoclima territoriale e la scelta dell'epoca di trapianto del materiale vegetale, permette di avere un calendario di maturazione nazionale che ricopre quasi tutto l'anno solare.

Negli ambienti centro-settentrionali la messa a dimora avviene nei mesi di luglio-agosto con piante frigo-conservate (A/A+), con medio-alto fabbisogno in freddo, sia in coltura tradizionale di pieno campo che in coltura protetta con tunnel singoli o multipli; la raccolta è concentrata in 3-4 settimane nella primavera successiva. Nella regione Marche si esegue quasi esclusivamente la coltura tradizionale in pieno campo, invece in Piemonte, Trentino-Alto Adige ed Emilia-Romagna sono diffuse la coltura protetta, in suolo e fuori suolo, e la coltura in pieno campo, estiva, con varietà rifioventi; l'impianto è effettuato ad aprile utilizzando piante frigo-conservate; questa tecnica è subentrata da poco tempo nell'areale e permette una raccolta che ricopre tutto il periodo estivo e parte di quello autunnale.

Negli ambienti meridionali viene utilizzata la coltura tradizionale protetta con tunnel multipli, impiantando il campo tra settembre e ottobre con piante, a basso fabbisogno di ore in freddo, fresche a radice nuda o cime radicate; questo permette di avere una raccolta destagionalizzata, che inizia nel mese di dicembre ed è prolungata fino maggio andando ad accavallarsi con le produzioni centro-settentrionali.

Nel veronese si utilizza la coltura protetta autunnale in suolo o fuori suolo; la messa a dimora è svolta in estate, utilizzando piante frigo-conservate ingrossate di tipo A+ o Tray Plant; questa tecnica di programmazione offre un doppio flusso produttivo, il primo dopo 45-50 giorni dalla piantagione (raccolta autunnale) e il secondo nella primavera successiva. La tendenza attuale è di accentuare ulteriormente questo trend, cercando di allungare il periodo di produzione dei principali areali fragolicoli, sia con l'impiego di adeguate tecniche di programmazione colturale, finalizzate sempre più alla destagionalizzazione della coltura, sia attraverso l'impiego di cultivar rifioventi (Faedi et al., 2009).

La fragolicoltura italiana è ormai in grado di fornire produzioni in tutti i periodi dell'anno, grazie alla disponibilità di validi standard varietali e di diverse tecniche colturali. Le produzioni meridionali iniziano già in fine dicembre/inizio di gennaio; la Sicilia, in particolare, è l'areale che consente il massimo anticipo di produzione (primi frutti a Natale). Dopo la seconda-terza decade di giugno, e per tutti i mesi estivi, la produzione di fragole diminuisce fortemente e le uniche aree in grado di fornire produzioni di qualità sono quelle più fresche di montagna, con coltivazioni di varietà unifere (fino alla prima decade di luglio), ma soprattutto con le colture programmate attraverso l'impiego di piante ingrossate (A+, WB, TP), messe a dimora in suolo o fuori suolo, e l'utilizzo di varietà rifioventi. Le produzioni di montagna

terminano coi primi freddi autunnali, ma il flusso produttivo di fragole prosegue fino a novembre, nell'area veronese grazie alla tecnica colturale autunnale (Faedi et al., 2009).

1.5 Miglioramento genetico

Negli anni '60 le prime attività di ricerca e innovazione varietale sulla fragola in Italia furono condotte in Emilia-Romagna dall'Istituto di Coltivazioni Arboree (ICA), dell'Università di Bologna, dirette dal Prof. E. Baldini. Le sperimentazioni dell'incrocio interspecifico di varietà della specie *F. x ananassa* diedero buoni risultati, con il licenziamento di cinque nuove cultivar, le quali ebbero una scarsa diffusione commerciale. Nello stesso decennio anche l'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura (ISF) di Roma, con la supervisione del Professor P. Rosati, avviò dei programmi di miglioramento genetico licenziando due nuove varietà, *Francesco* e *Savio*, anch'esse di scarso interesse commerciale. Dai primi anni '70 il miglioramento genetico si è basato su incroci controllati tra le varietà europee e il materiale genetico americano del Fruit Laboratory USDA del Maryland (USA) per la realizzazione del programma dell'ISF di Roma, grazie alla collaborazione scientifica del Prof. P. Rosati con il direttore dell'USDA; le selezioni americane erano caratterizzate da scarsa produttività, compensata da frutti di grossa pezzatura, di elevata consistenza e resistenza/tolleranza a molte malattie. Successivamente nel 1978 venne creata una collaborazione con l'ICA di Bologna che indirizzò il miglioramento genetico verso la ricerca di caratteri di resistenza alle fitopatie più diffuse; da questi programmi di breeding furono selezionate in Romagna e poi diffuse commercialmente (1982) varietà molto importanti come Addie, Brio, Cesena e Dana, che determinarono lo sviluppo e l'affermazione della fragolicoltura del Nord Italia fino a verso la fine degli anni '90. La forte innovazione varietale, dovuta al forte incremento della pezzatura dei frutti e alla loro maggiore resistenza ai patogeni, consentì di aumentare le produzioni unitarie (da 12 a 25 t/ha) e ridurre sensibilmente i costi di raccolta, quindi di produzione.

Il programma di ricerca dell'ISF di Roma, dal 1978 ebbe quasi continuamente il supporto finanziario della regione Emilia-Romagna, tramite l'ERSO (ora Centro Ricerche Produzioni Vegetali) di Cesena; questo programma di miglioramento genetico fu poi esteso dalla Sezione di Forlì (ora CRA-FRF) dell'ISF di Roma anche nelle aree meridionali del Metaponto, Piana del Sele, Lamezia Terme e Marsala, in collaborazione con numerose Istituzioni pubbliche, ma anche nelle aree di Verona, Cuneo, Trento, Bolzano (Val Martello), Terracina (LT) e Francavilla al Mare in Abruzzo. In tutti questi territori il CRA-FRF sta ancora coordinando specifiche azioni di breeding realizzate con la collaborazione e il supporto finanziario di molti organi pubblici e privati. Questi progetti di ricerca hanno portato alla realizzazione di

numerose varietà italiane che stanno espandendo il loro mercato in Europa, ma anche all'estero (Canada, USA, Messico, Brasile, Cile, Australia, Turchia, Russia) (Andreotti et al., 2010). A questi numerosi programmi, svolti da enti di ricerca pubblici, susseguendosi nella seconda metà del secolo scorso, si sono aggiunti in Italia altri pochi ma importanti progetti privati: quelli del CIV di Ferrara, avviati nel 1984 licenziando, negli anni, varietà di grande interesse commerciale (come Marmolada, Onebor, Tetis, Elsinore, CIVRI30-rifiorante) che hanno avuto forti impatti sulle coltivazioni sia del nord che del sud Italia; quelli di New Fruits di Cesena, operante dal 1992 nel settore del miglioramento genetico della fragola: i suoi partners principali sono Raggi Vivai e Geoplant Vivai da cui è nata la volontà comune di attuare un programma di miglioramento genetico con lo scopo di ottenere selezioni e/o varietà interessanti da poter sfruttare a livello commerciale; quelli di Nova Siri Genetics, fondata nel 2005 con l'obiettivo di sviluppare varietà di fragole che si adattino alle nuove esigenze del mercato, alla domanda degli agricoltori e a pratiche colturali sostenibili.

Anche nelle Marche è da tempo (1994) attivo un programma di miglioramento genetico della fragola coordinato dal Prof. Bruno Mezzetti, grazie al contributo del progetto nazionale "Frutticoltura", finanziato dal Ministero dell'agricoltura e delle foreste. Il programma del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche, iniziato dal Prof. Pasquale Rosati presso l'Azienda Agraria Didattica Sperimentale "P. Rosati" di Agugliano, ha ottenuto due varietà, a maturazione tardiva licenziate nel 2003, Adria e Sveva e nel 2011 due varietà, la prima a maturazione precoce e l'altra a maturazione tardiva, Romina e Cristina adatte a climi temperato freddi. Inoltre, nel 2019, lo stesso programma di miglioramento genetico ha portato alla registrazione di altre 4 cultivar: Dina adatta a climi temperato caldi e Francesca (a maturazione precoce), Lauretta (a maturazione intermedia) e Silvia (a maturazione tardiva) adatte a climi temperato freddi.

Attualmente tutti i centri di miglioramento genetico continuano a selezionare i propri prodotti per rispondere all'evoluzione delle esigenze reali e future del mondo.

1.6 La botrite in fragola (*Botrytis cinerea*)

Nel corso degli ultimi anni il quadro relativo alle malattie fungine della fragola si è progressivamente modificato, soprattutto in seguito alla diffusione di nuove tecniche colturali, alla concentrazione in alcune aree di impianti specializzati e alla costituzione e diffusione di nuove varietà più rispondenti alle richieste del mercato ma, in alcuni casi, più suscettibili nei confronti di alcune avversità. Anche l'introduzione di materiali di moltiplicazione da altri

Paesi o continenti ha contribuito alla diffusione di nuovi patogeni fungini o di ceppi già presenti ma con differenti livelli di patogenicità.

Botrytis cinerea è un fungo Ascomicete della famiglia *Sclerotiniaceae* ed è un patogeno saprofita e polifago in quanto attacca molte specie di piante. È la causa del marciume dei frutti: sulle piante che presentano botrite si notano fragole con muffa grigia vellutata su tutta la superficie del frutto, che diventa più abbondante, biancastra e quasi cotonosa in presenza di elevata umidità. L'infezione può avvenire per penetrazione del fungo attraverso i fiori (nei petali, stami e calici), frutti o le ferite e per contatto, e possono avvenire sia in campo che dopo la raccolta.

In genere il micelio cresce da saprofita nel materiale vegetale, in altri casi, il fungo rilascia le spore che si depositano sulla pianta. Per poter germinare necessitano di un film d'acqua che può persistere più a lungo quando è presente tra le parti fiorali; le spore che germogliano in questo punto possono iniziare l'infezione allo sbocciare dei fiori. Sui frutti, invece, la maturazione induce piccole variazioni del tasso di germinabilità delle spore; di conseguenza, le fragole infette possono non essere notate subito, e la muffa può manifestarsi dopo la raccolta e commercializzazione.

Le condizioni ottimali per lo sviluppo della botrite sono 15 – 20 °C e umidità relativa maggiore del 90% mantenute per più di 28 ore; piogge, nebbia ed eccessiva densità d'impianto ne favoriscono lo sviluppo. Tuttavia, l'infezione è in grado di avvenire anche con temperature di circa 0° C.

La botrite è una delle patologie che crea più sofferenza nelle piante di fragole, sia in pieno campo che in coltura protetta.

Le piante non riescono ad autoprotettersi perché non esiste ad oggi una varietà immune e/o tollerante a questo fungo; dunque, è fondamentale un lavoro di prevenzione sia nell'evitare che la malattia si diffonda, sia che i frutti infetti vengano raccolti e contaminino i frutti sani nel post raccolta.

Visto l'impatto che questo patogeno può avere sulla qualità e la produzione di fragola, numerosi progetti di ricerca stanno attualmente valutando diverse opzioni per la protezione di questa coltura dall'attacco di questo fungo, che non prevedano l'uso massiccio di fungicidi. Tra questi, il progetto "Medberry", finanziato nell'ambito del programma di ricerca europeo "PRIMA", ha come scopo lo sviluppo di una serie di alternative e soluzioni competitive per ridurre drasticamente l'uso di fungicidi di sintesi nella coltivazione della fragola e per gestire emergenze fitosanitarie e la diffusione di nuove malattie causate dalle temperature presenti nell'area mediterranea. A questo scopo, nel progetto è prevista la valutazione della

suscettibilità a botrite di diverse cultivar di fragola, in modo da identificare meglio le cultivar più resistenti da utilizzare per la coltivazione, e le cultivar più suscettibili da utilizzare come modello per la sperimentazione di nuovi strumenti biotecnologici per la prevenzione della malattia.

1.7 La qualità in frutti di fragola

L'aspetto e le caratteristiche nutrizionali e organolettiche delle fragole sono molto considerati dal consumatore, che preferisce frutti attraenti ed uniformi, con una carica sensoriale ben definita e ricca, corredata da un buon apporto di elementi nutritivi (Testoni e Lovati, 2004).

L'aspetto dei frutti è un elemento comune di valutazione qualitativa di tutti i soggetti della filiera ed alcune componenti come il colore, il peso, la freschezza sono parametri oggettivi considerati ormai da più di un decennio nei vari studi eseguiti sulle valutazioni qualitative delle fragole (Lovati et al., 2000; Nuzzi et al., 2002;).

Il contenuto in solidi solubili e l'acidità delle fragole sono due indici facilmente determinabili e costantemente monitorati nella valutazione delle nuove accessioni, poiché il loro rapporto influenza il sapore del frutto, che rimane l'elemento di giudizio più tangibile del consumatore. L'apprezzamento non è univoco, essendo legato alle diverse abitudini di consumo ed alle influenze alimentari delle differenti aree geografiche, ma un equilibrato rapporto acidi/zuccheri rende più graditi i frutti a fasce molto ampie di consumatori. Le fragole, in virtù del loro aroma e del sapore, sono i frutti più richiesti dall'industria della trasformazione. L'aroma dei frutti è determinato per la maggior parte dalla presenza di sostanze volatili, che raggiungono le cellule olfattive attraverso due vie: dalle narici durante l'inspirazione, e dalle vie di comunicazione tra la bocca e il naso durante la masticazione del prodotto.

Per quel che concerne la salubrità, essa può essere definita secondo due aspetti principali: l'uno riferito all'assenza di residui chimici di sintesi e assenza di agenti patogeni, l'altro legato alle caratteristiche intrinseche delle fragole, ove assume crescente significato la presenza di composti ad effetto nutraceutico. Le attese dei consumatori verso alimenti sani e genuini, contenenti sostanze volte ad accrescere il benessere fisico e con valenza farmacologico-terapeutica, sono notevolmente cresciute anche sulla spinta dei "media" che estrapolano ed enfatizzano risultati di studi clinico-dietologici su singoli composti (Sansavini, 2003).

1.7.1 Fattori che determinano la qualità

L'espressione delle caratteristiche qualitative e nutrizionali delle fragole è notoriamente sotto controllo del genotipo ed infatti l'attività di breeding ha permesso miglioramenti delle caratteristiche qualitative dei frutti; tuttavia, la qualità è la risultante di numerosi fattori, (non solo genetici) che interagiscono tra loro.

La dolcezza, espressa in solidi solubili totali ($^{\circ}$ Brix), si riduce quando, in prossimità della raccolta, si verificano basse temperature e nuvolosità (Kader, 1988; Morris e Sistrunk, 1991), condizioni che inducono anche ad un innalzamento dell'acidità titolabile (Kidmose et al., 1996); valori elevati di temperatura diurna/notturna, attorno ai 30/22°C, nel periodo successivo alla fioritura fino alla raccolta, determinano scarsi contenuti di solidi solubili e di acidità dei frutti, mentre valori di temperatura \leq di 25°C, ma con escursione termica fra giorno e notte pari a 7÷8°C, favoriscono l'incremento di entrambi i parametri (Wang e Camp, 2000). L'acidità titolabile ha un controllo genetico più forte rispetto al contenuto di solidi solubili totali (SST), questo infatti è maggiormente dipendente dalle condizioni ambientali.

L'aroma si esalta se, nel periodo della maturazione, ci sono notti fresche e giornate molto soleggiate (Morris e Sistrunk, 1991).

Per quanto riguarda l'aspetto nutrizionale, studi condotti su semenzali ottenuti da combinazioni di incrocio fra genotipi caratterizzati da diversi contenuti di polifenoli totali (PFT), contenuto in acido ascorbico (AA) e capacità antiossidante (CAT), hanno messo in evidenza che predisponendo appositi incroci fra parentali con frutti di elevate caratteristiche nutrizionali, si può incrementare il quantitativo contenuto nei frutti della progenie (Battino et al., 2004; Capocasa et al., 2008). In particolare, si è visto che utilizzando genotipi di *Fragaria virginiana glauca* come parentale di incrocio, si aumenta la CAT dei frutti di fragola (Mezzetti et al., 2005). Anche il profilo nutrizionale risente delle condizioni climatiche durante il periodo della raccolta: il contenuto in acido ascorbico è più alto nei frutti raccolti in giorni soleggiate e con temperature non molto elevate (18÷25°C); i polifenoli totali e la capacità antiossidante invece, aumentano con l'innalzarsi delle temperature minime notturne (Wang e Camp, 2000; Wang e Zheng, 2001; Davik et al., 2006).

I sistemi di produzione a basso impatto ambientale, come le tecniche di coltivazione integrate o biologiche, destano un notevole interesse presso i consumatori per la maggiore "salubrità" intesa come limitati o nulli contenuti in residui di antiparassitari. Limitate sono le informazioni sugli effetti di questi sistemi di coltivazione sulla qualità dei frutti. Esperienze condotte in Finlandia e Spagna (Cayuela et al., 1997) non hanno evidenziato differenze significative tra alcuni caratteri dei frutti raccolti in coltura biologica ed integrata.

1.8 Principali metodiche di analisi qualitative per le fragole

Le caratteristiche qualitative di frutti sono tradizionalmente determinate mediante analisi di tipo distruttivo che, se da una parte garantiscono informazioni piuttosto chiare ed attendibili, d'altra parte presentano diversi limiti sia in termini di ampiezza del campione di prodotto analizzabile, in quanto trattandosi di metodologie distruttive è possibile applicarle soltanto ad un certo numero rappresentativo di frutti, sia in termini di tempo necessario alla realizzazione delle analisi.

Per cercare di far fronte a questo problema, nel corso degli ultimi anni si è andati sempre più alla ricerca di tecniche non distruttive e veloci grazie a tecnologie ottiche, meccaniche ed elettromagnetiche.

Dunque, per analizzare i parametri qualitativi della fragola si può fare ricorso ad una vasta serie di strumenti e di tecniche.

Esempi di dispositivi distruttivi per la misura della qualità sono: penetrometro, rifrattometro, titolatore e HPLC.

Analisi di tipo non distruttivo sono molto più veloci rispetto a quelle distruttive e possono essere effettuate su tutti i campioni, non solo su una porzione di essi: questo permette di essere statisticamente più affidabili. Esempi di strumenti non distruttivi sono: colorimetro, calibro e bilancia.

Nel corso degli anni, inoltre, si stanno sviluppando tecniche non distruttive che riscontrano sempre maggior successo, come le tecnologie elettromagnetiche: NIR, fluorescenza e raggi X e γ ; e tecnologie elettrochimiche come il naso elettronico. Tutte queste metodologie di analisi permettono di individuare uno o più parametri senza danneggiare minimamente l'integrità del frutto.

1.8.1 Spettroscopia NIR

La spettroscopia infrarossa (IR) è una tecnica che si basa sull'assorbimento di radiazioni con lunghezze d'onda comprese nella regione infrarossa dello spettro elettromagnetico. Come è possibile osservare nella *Figura 2* questa gamma spettrale viene suddivisa in tre regioni principali:

- Vicino infrarosso (NIR) 12500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} (800 nm a 2500 nm)
- Medio infrarosso (MIR) 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} (2500 nm a 25000 nm)
- Lontano infrarosso (FIR) 400 cm^{-1} a 20 cm^{-1} (25000 nm a 500000 nm)

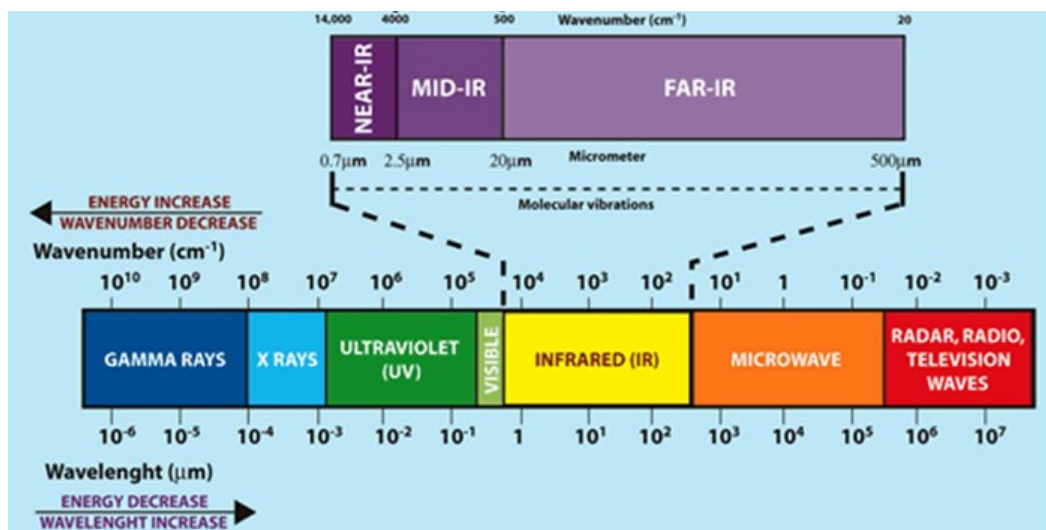


Figura 2 Regioni dello spettro elettromagnetico con espansione della regione infrarossa

Nel campo della spettroscopia analitica i range spettrali più utilizzati sono il NIR e il MIR. La principale differenza è che l'assorbimento nel medio infrarosso corrisponde alle bande fondamentali delle vibrazioni molecolari, mentre assorbimenti nel vicino infrarosso corrispondono a sovratoni (overtone) e combinazioni di queste. Inoltre, la diffusione della luce è molto maggiore nella tecnica NIR rispetto al MIR, pertanto gli spettri dei primi saranno molto più influenzabili da fattori che interagiscono con la diffusione della luce, come ad esempio la presenza o meno di acqua (Taberelli, 2014) che è alla base della composizione della frutta. Infine, alle lunghezze d'onde che caratterizzano il NIR corrispondono i legami chimici tipici dei gruppi contenenti idrogeno come C-H, N-H, O-H, che spesso costituiscono i componenti principali e più caratterizzanti della materia organica.

La spettroscopia NIR per via delle sue caratteristiche di rapidità di analisi, invasività praticamente nulla e affidabilità viene comunemente considerata come un valido strumento analitico nei settori alimentare e farmaceutico, in applicazione al controllo della qualità e dei processi produttivi [Everard, McDonnell, Fagan, 2012].

La tecnica si basa sull'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche nel range del vicino infrarosso, in grado di riflettere la struttura di una determinata molecola, per mezzo di fotoni che modificano lo stato dei suoi legami chimici, provocando il passaggio da uno stato vibrazionale fondamentale ad uno eccitato (Blanco e Villarroya, 2002). L'energia che colpisce i legami tra molecole e che viene specificatamente assorbita dalle stesse (cioè assorbe solo determinate lunghezze d'onda), è in relazione alla struttura, al numero di legami e al tipo di proprietà chimica. Come risultato si ottiene un grafico dove sull'asse delle ascisse vengono riportate le lunghezze d'onda, mentre in ordinata la percentuale di assorbanza, il cui valore

crebbe all'aumentare dell'energia che è stata assorbita da un determinato campione. Si costruisce così una matrice di dati, con i campioni riportati nelle righe e i valori di assorbanza nelle colonne.

Mediante la chemiometria e l'analisi multivariata i dati di tipo spettrale ottenuti permettono di estrapolare informazioni di tipo chimico, da cui ricavare predizioni sui parametri qualitativi della fragola.

I lavori riguardanti l'applicazione della spettroscopia come metodo non-distruttivo per la stima di parametri in frutti di fragola non sono molti e riguardano soprattutto indici chimici come il contenuto in solidi solubili, l'acidità ed il contenuto acquoso.

Nel nostro lavoro di tesi triennale ci occupammo della costruzione di modelli di predizione del contenuto in solidi solubili, dell'acidità, della consistenza del frutto e del colore. Il modello più performante risultò quello applicato alla predizione del contenuto in solidi solubili, un buon modello risultò anche quello della predizione del parametro durezza, mentre i modelli costruiti per la predizione di acidi e colore risultarono insoddisfacenti.

Capitolo 2

SCOPO DELLA TESI

La determinazione della qualità per parametri come acidità e contenuto di solidi solubili è possibile mediante tecniche e metodologie affidabili e perfezionate nel tempo; tuttavia, essendo tecniche distruttive risulta impossibile effettuare quest'analisi su tutti i frutti, oltre alle problematiche legate poi alle tempistiche e all'applicabilità lungo tutte le fasi della filiera. Per ottenere questo risultato, risulta quindi fondamentale applicare una tecnica non distruttiva che riesca a prevedere con una certa efficacia il contenuto di zuccheri ed acidi dei frutti di fragola. Inoltre, valutare lo stato fitosanitario di un frutto prima della sua raccolta e soprattutto prima della sua commercializzazione è un'operazione fondamentale, che riduce notevolmente la contaminazione dei frutti sani ed allunga la shelf-life del prodotto. L'analisi visiva del frutto potrebbe essere sufficiente, ma non risulta la tecnica migliore, in quanto gli stadi iniziali di diverse fitopatologie sono impercettibili all'occhio umano; i metodi tradizionali come analisi microbiologiche e/o fisico-chimiche tradizionali sono costose lunghe e laboriose, da qui l'esigenza di trovare delle tecniche più efficienti nella rilevazione di frutti contaminati. In questo caso, il patogeno oggetto di studio è *botrytis cinerea*, il fungo che causa la muffa grigia, in quanto la valutazione della suscettibilità delle cultivar oggetto di studio rientra negli obiettivi del progetto "Medberry" a cui questa tesi risulta collegata.

Gli obiettivi della tesi sono stati:

- Migliorare dei modelli quantitativi previsionali per i parametri acidità e contenuto in solidi solubili di frutti di fragola tramite spettroscopia del vicino infrarosso (NIR)
- Cercare nel NIR un metodo per rilevare precocemente l'infezione fungina da *botrytis cinerea* in frutti di fragola di diverse varietà
- Confrontare i risultati ottenuti dallo spettrofotometro da banco con i risultati ottenuti dallo spettrofotometro portatile

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 Descrizione campo e tecnica colturale

La coltivazione delle fragole analizzate è avvenuta nel campo sperimentale dell'Azienda Agraria Didattico-Sperimentale "Pasquale Rosati" dell'Università Politecnica delle Marche, nel comune di Agugliano (AN), a circa 20 km di distanza dal mare e ad una altitudine di circa 80 m s.l.m.

Il campo è situato in un appezzamento pianeggiante e le analisi del terreno evidenziano le condizioni tipiche dell'areale della media collina marchigiana: tessitura franco-argillosa, pH subalcalino, alta dotazione di calcare attivo (12,1%), basso contenuto di sostanza organica (1,14%), scarsa dotazione di N totale e P assimilabile, ma alto contenuto in basi di scambio (Mg e K) con alta capacità di scambio cationico (CSC).

Il clima di Agugliano, secondo la classificazione di Köppen e Geiger, è classificabile come temperato umido con estati molto calde (Cfa) (<http://it.climate-data.org/>), poiché la temperatura media del mese più freddo oscilla tra $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $+18\text{ }^{\circ}\text{C}$, la temperatura media del mese più caldo è superiore ai $22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Le precipitazioni sono più abbondanti in primavera/autunno e scarse nei mesi invernali/estivi con medie annue che si attestano a 739 mm, mediamente distribuite in 83 giorni, con minimo relativo in inverno, picco massimo in autunno e massimo secondario in estate per gli accumuli totali stagionali.

L'umidità relativa media annua fa registrare il valore di 75,7% con minimo di 71% a luglio e massimo di 82% a novembre; mediamente si contano 36 giorni all'anno con episodi nebbiosi (www.clima.meteoam.it/AtlanteClimatico/).

3.2 Descrizione del materiale vegetale

Le valutazioni sui parametri qualitativi e sullo stato fitosanitario nell'anno 2020 sono state effettuate su quattro cultivar di fragole: Romina, Cristina, Sibilla e Silvia.

Nell'anno 2021 a queste quattro varietà si è aggiunta una quinta: Sveva. Nella *Tabella 1* vengono descritti il costituente, il paese di origine e le principali caratteristiche varietali.

VARIETÀ	COSTITUTTORE	PAESE DI ORIGINE	DESCRIZIONE
CRISTINA	D3A-UNIVPM	ITALIA	Varietà a maturazione tardiva con elevata produzione ed epoca di fioritura tardiva. La pianta presenta un buon vigore e messa a frutto tardiva. Il frutto presenta pezzatura elevata, forma conica corta, colore rosso-aranciato abbastanza brillante. La polpa presenta buona consistenza con un medio-elevato sapore. Non risulta particolarmente sensibile ai principali patogeni.
ROMINA	D3A-UNIVPM	ITALIA	Varietà unifera adatta a terreni non fumigati, per produzioni a basso impatto. Presenta frutti di forma conica o biconica, a maturazione molto precoce, di sapore dolce e molto buono (buon contenuto di zuccheri e bassa acidità). L'elevata consistenza e conservabilità ne fa un frutto idoneo per la commercializzazione nella grande distribuzione.
SIBILLA	Consorzio Italiano Vivaisti (CIV)	ITALIA	Varietà unifera ad alto fabbisogno in freddo adatta per ambienti continentali, con epoca di maturazione tardiva, vigorosa ed elevato potenziale produttivo. Dotata di buona tolleranza

			alle malattie ed agli stress. Il frutto è molto bello, di forma conico-allungata, regolare e di buona pezzatura. Il colore è rosso brillante, polpa ben colorata internamente e di forte consistenza e buona resistenza ai danni da pioggia. Il sapore è molto buono, gradevole e di dolcezza elevata.
SILVIA	D3A-UNIVPM	ITALIA	Varietà unifera a maturazione tardiva con elevato fabbisogno in freddo. Pianta di elevata rusticità, selezionata in condizione di terreno non fumigato, con media densità del fogliame e medio-elevata produttività. Il frutto è di forma conico-corta, regolare, con colorazione rosso intensa e buona consistenza. Il sapore del frutto è medio, con medio contenuto in zuccheri e acidità titolabile. Buona shelf-life
SVEVA	D3A-UNIVPM CRA - Unità di ricerca per la frutticoltura (Forlì)	ITALIA	Varietà unifera a maturazione tardiva o molto tardiva adatta agli ambienti centro-settentrionali. La pianta presenta elevata rusticità, elevata vigoria, elevata produttiva, buon accostamento ed adattabilità della pianta a terreni non fumigati e di tipo argilloso e calcareo. Il frutto è di pezzatura e consistenza elevata, di forma conico-allungata, regolare, di colore rosso intenso che tende a divenire scuro a piena maturazione

Tabella 1 Cultivar di riferimento esaminate nella prova

3.3 Metodi di raccolta e campionamento frutti

La raccolta delle fragole avviene selezionando solo i frutti che hanno raggiunto la maturazione commerciale, ovvero con colorazione rossa uniforme, dalla consistenza tipica della cultivar e privi di danni che andrebbero ad alterare la loro conservazione e/o le analisi da effettuare.

I frutti vengono selezionati da varie parcelle al fine di ottenere un dato statisticamente valido e vengono prelevati durante la terza o quarta raccolta per evitare di analizzare frutti primari, frutti prodotti alla fine del ciclo vegetativo o comunque diversi dallo standard della varietà.

3.4 Procedimento di analisi e valutazione dei parametri esaminati

Lo studio in oggetto inizia con la raccolta in campo; il giorno stesso, i frutti vengono portati in laboratorio e qui selezionati, sterilizzati ed in parte contaminati. A questo segue una valutazione visiva giornaliera del danno e l'analisi NIR. Le fragole vengono poi congelate a -80°C ed infine scongelate e sottoposte all'analisi di zuccheri e acidi. Tutte le fasi presentate in *Figura 3* sono state descritte più dettagliatamente nei capitoli successivi.

I parametri considerati sono: stato fitosanitario del frutto, contenuto in solidi solubili e acidità. Il primo potrebbe compromettere la qualità e la sicurezza del frutto, mentre gli ultimi due ne descrivono quasi completamente il sapore.

Il lavoro di tesi si è svolto nelle annate 2020 e 2021 per avere un buon numero di dati e per verificare che i modelli di predizione e le l'interpretazione dei dati fosse affidabile e indipendente dalla stagione vegetativa.

Nell'annata 2020 sono stati esaminati rispettivamente 108 frutti per le varietà Cristina, Romina, Sibilla e Silvia, effettuando due prove da 54 frutti ciascuna, 27 destinate al controllo e 27 alla contaminazione.

La prova per ogni varietà è stata svolta nell'arco di una settimana dal lunedì (t_0) al venerdì (t_4).

Le fragole raccolte al t_0 vengono portate in laboratorio, selezionate, numerate, sterilizzate ed in parte contaminate. Per tutte le fragole si effettua una valutazione visiva della presenza di botrite, registrando il danno con un numero da 1 a 5.

Le prime 3 e le ultime 6 sono sottoposte ad analisi NIR, ed infine le prime 3 fragole delle due prove si congelano a temperatura -80°C .

I 96 frutti rimanenti (48 per prova, 24 controllo e 24 trattati) vengono divisi e destinati ai quattro rimanenti giorni della settimana, conservandoli in cella climatica a 25°C e circa 90% di umidità.

Ogni giorno si effettua la stessa operazione: valutazione dello stato fitosanitario di tutti i frutti, analisi NIR delle prime 6 fragole e delle ultime 6, ed infine il congelamento delle prime 6. Al t4 si conclude l'analisi con il congelamento degli ultimi 24 frutti (12 per prova, 6 controlli e 6 trattati).

Lo stesso processo è stato messo in atto per l'annata 2021, con la differenza di usare 120 frutti per varietà, potendo così congelare 6 frutti anche al t0 ed aggiungendo la varietà Sveva alle già presenti Cristina, Romina, Sibilla e Silvia.

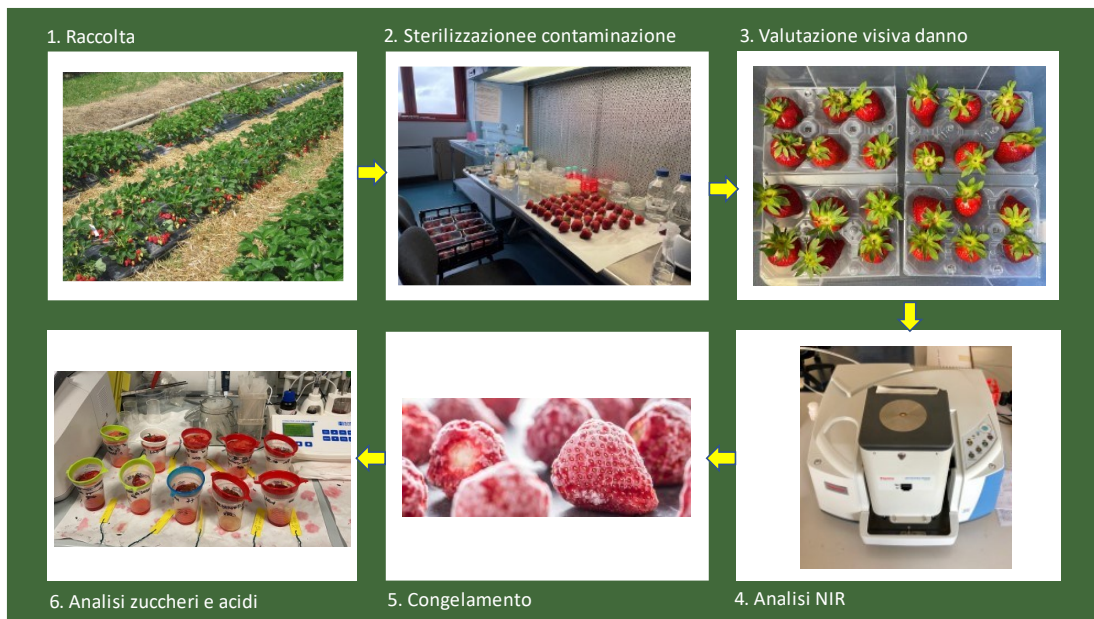


Figura 3 Procedura di lavoro

3.5 Protocollo di sterilizzazione e contaminazione

Si prepara una sospensione con acqua sterilizzata e conidi di *botrytis cinerea* coltivati precedentemente in piastre Petri. Occorre un volume tra i 50 e i 100 ml sufficiente ad immergere completamente le fragole da contaminare, fondamentale è però la concentrazione dei conidi che deve essere di 10^6 per ml di soluzione. Affinché questa misura sia corretta, prima di preparare la sospensione, si fa la conta delle UFC al microscopio ottico e si prepara una adeguata diluizione o in caso contrario si aumenta la concentrazione fino a quella desiderata. La prova è divisa in controllo e trattamento: per entrambe le operazioni si utilizzano 3 becher con acqua distillata e candeggina al 5%, i frutti vengono immersi uno dopo l'altro all'interno di ogni becher in maniera tale che ognuno di esso subisca 3 lavaggi dalla durata di 30 secondi ciascuno.

In seguito, i frutti per il controllo vengono immersi per 30 secondi in un becher contenente acqua distillata, mentre i frutti da trattare vengono immersi per 30 secondi nella sospensione conidica precedentemente ottenuta.

Infine, i frutti vengono numerati, valutati e riposti nei rispettivi contenitori.

3.6 Contenuto in solidi solubili

La misurazione del contenuto in solidi solubili (SS) serve ad identificare la concentrazione zuccherina del frutto ed è stata effettuata tramite l'utilizzo del rifrattometro digitale a compensazione automatica della temperatura (Palette PR101 α , Atago, Giappone).

Il rifrattometro si basa sul principio fisico della rifrazione di un fascio di luce attraverso una soluzione secondo il quale, all'aumentare della densità della soluzione, l'indice di rifrazione cresce proporzionalmente. Quindi maggiore è il contenuto in zuccheri della fragola e maggiore sarà il valore misurato dal rifrattometro, espresso in gradi Brix ($^{\circ}$ Brix).

Per effettuare questa analisi si estrae il succo schiacciando singolarmente i frutti utilizzati precedentemente per le analisi NIR, dopo averli lasciati scongelare. Dopo aver filtrato e raccolto in un becher il succo, se ne preleva un'aliquota, si posiziona sulla superficie del vetrino di caricamento del rifrattometro e si legge il valore in $^{\circ}$ Brix.

3.7 Acidità titolabile

Per acidità titolabile si intende tutto il quantitativo di acidi liberi presenti nel succo di fragola (principalmente acido ascorbico, malico, succinico e citrico) che contribuiscono, insieme agli zuccheri solubili, a definire il sapore del frutto.

Questo parametro è stato calcolato con un titolatore automatico (Hanna HI84532) che misura la concentrazione di ioni idrogeno titolabili contenuti nei campioni utilizzando un metodo di analisi preprogrammato ottimizzato con un algoritmo che determina il completamento della reazione di titolazione mediante l'utilizzo di un elettrodo pH con corpo in vetro. Il titolatore misura l'acidità dei campioni di succhi di frutta attraverso neutralizzazione a pH fisso con una soluzione fortemente basica iniettata tramite dosaggi precisi con una pompa a pistone.

Per effettuare l'analisi si utilizzano 5 ml di succo, estratto esclusivamente da ogni singola fragola scongelata in precedenza, con aggiunta di 45 ml di acqua distillata. L'acidità titolabile viene espressa in percentuale di acido citrico.

3.8 Valutazione del danno da *Botrytis cinerea*

Ogni giorno, a partire dal t0 fino al t4, è stata effettuata una valutazione visiva del danno causato dall'infezione di *Botrytis cinerea* (Figura 4) a cui seguiva l'analisi spettrale e il congelamento.

La gravità dell'infezione è stata registrata in tabella secondo una scala empirica a sei livelli:

- 0: frutto sano,
- 1: dall'1% al 20% della superficie del frutto infetta,
- 2: dal 21% al 40% della superficie del frutto infetta,
- 3: dal 41% al 60% della superficie del frutto infetta,
- 4: dal 61% all'80% della superficie del frutto infetta,
- 5: dall'81% al 100% della superficie del frutto infetta (Feliziani et. al., 2015).



Figura 4 Frutti della varietà Romina al t4. A sinistra frutti non contaminati, a destra frutti contaminati

3.9 Spettroscopia NIR

Per l'anno 2020 le prove sono state eseguite esclusivamente con lo spettrofotometro a trasformata di Fourier, FT-NIR (FT-NIR mod. Nicolet iS10, THERMO), montando una sfera integrativa. Il range di interesse è stato quello della regione del vicino infrarosso, nello specifico da 4000 a 10000 cm^{-1} . Le analisi sono state condotte utilizzando un flusso continuo di azoto che ha lo scopo di minimizzare il contenuto di umidità all'interno dello strumento durante le prove, riducendo quindi la variabilità dell'analisi spettrale. I parametri utilizzati per le analisi sono quelli riportati nella *Tabella 2*.

PARAMETRO	Unità DI MISURA	VALORE
N° scansioni	-	32
Risoluzione	cm ⁻¹	8
Intervallo	cm ⁻¹	10000÷4000
Background	-	Ogni ora
N° scansioni background	-	32

Tabella 2 Parametri di acquisizione dello spettrofotometro FT-NIR (FT-NIR mod. Nicolet iS10, THERMO)

Ogni frutto è stato analizzato due volte, posizionandolo sulla finestra di lettura prima su un lato, e poi sul lato opposto.

Ogni ora è stato effettuato il background, scansione in cui viene riflesso tutto il segnale elettromagnetico per intero, così da considerare e controllare l'ambiente esterno di analisi, e ridurre la variabilità associata ad esso e non al campione.

Per l'anno 2021 le prove sono state eseguite utilizzando sia lo strumento precedentemente descritto, che il MicroNIR™ OnSite distribuito da Viavi Solutions Inc. (JDSU Corporation, Milpitas, USA). L'acquisizione degli spettri è stata eseguita in riflettanza, nella regione spettrale 950–1650 nm (10.526–6.061 cm⁻¹), con un tempo di integrazione di 6,7 ms e con una risoluzione spettrale nominale di 6,25 nm. Ogni dieci minuti è stato effettuando un background acquisendo un riferimento scuro (assorbanza totale) e un riferimento chiaro (riflettanza totale) utilizzando la Spectralon.

I parametri utilizzati per le analisi sono quelli riportati nella *Tabella 3*

PARAMETRO	Unità DI MISURA	VALORE
N° scansioni	-	100
Risoluzione	nm	6,25
Intervallo	nm	950÷1650
Background	-	Ogni dieci minuti
N° scansioni background	-	100

Tabella 3 Parametri di acquisizione dello spettrofotometro Micro-NIR

Inoltre, per quest'annata e per entrambi gli strumenti utilizzati, ogni frutto è stato analizzato tre volte, effettuando la lettura lungo la circonferenza del frutto, ciò per descrivere meglio la

variabilità del frutto. Infatti, se da un lato si è deciso di dare continuità al progetto con il Nicolet, dall'altro si è voluto cercare delle risposte e delle alternative con il MicroNIR che a differenza del primo è uno strumento portatile e meno costoso sia nell'acquisto che nella sua gestione e può restituire dei risultati direttamente in campo, evitando di staccare i frutti dalla pianta e possibili danni durante il trasporto.

3.10 Analisi multivariata dei dati

La chemiometria è una branca della chimica che studia l'applicazione dei metodi matematici o statistici ai dati chimici e biologici e permette di correlare i parametri qualitativi analizzati attraverso i metodi classici, con le curve di assorbimento dello spettro nell'intervallo del vicino infrarosso.

Le elaborazioni avvengono sulla matrice dei dati spettrali, che riporta sulle righe i campioni e sulle colonne i valori spettrali di assorbanza. Il software utilizzato è The Unscrambler X 10.4 che permette di effettuare analisi di tipo qualitativo utilizzando la tecnica della Principal Component Analysis (PCA) e analisi di tipo quantitativo attraverso la tecnica della Partial Least Squares Regression (PLS).

3.10.1 *Pretrattamento dei dati spettrali*

Prima di passare al calcolo dei vari modelli PCA e PLS è necessario pretrattare i dati spettrali affinché il segnale ricevuto sia il più interpretabile e chiaro possibile: questi pretrattamenti hanno lo scopo di minimizzare il "rumore", cioè di limitare il più possibile la visualizzazione di tutte quelle informazioni di variabilità non utili a rappresentare il dato permettendo di focalizzare l'attenzione su ciò che effettivamente influenza la variabilità e la distribuzione dei dati nei grafici. Quelli più utilizzati sono:

- SNV (Standard Normal Variate) e MSC (Multiplicative Scatter Correction): riduzione del fenomeno di scattering (effetto fisico di divergenza dei raggi luminosi in diverse direzioni a causa della granulometria del materiale);
- Derivata prima: amplifica assorbanze in regioni di lunghezza d'onda specifiche per evidenziare differenze attraverso la misura della pendenza delle curve;
- Derivata seconda: separa picchi di lunghezza d'onda vicini "nascosti" misurando i cambiamenti di pendenza delle curve.

Nelle derivate gli smoothing points scelti, legati alla tecnica di sostituzione di ogni valore di lunghezza d'onda con quello medio delle stesse repliche, sono stati 9, 13 e 21.

La media non viene considerata un pretrattamento, anche se tende ad uniformare il dato e, per questo lavoro di tesi, viene sempre calcolata dopo ogni pretrattamento sul numero di repliche effettuate per ogni campione. Tale operazione è stata effettuata dopo aver verificato che non ci fossero dei campioni outlier tra le repliche effettuate per ogni campione.

3.10.2 *Principal Component Analysis (PCA)*

La PCA è un'analisi esplorativa, il cui scopo principale è quello di mostrare la varianza statistica dei campioni sulla base delle caratteristiche analizzate, sintetizzando la somiglianza spettrale, su base chimica, all'interno di un insieme di campioni analizzati. Si può così cogliere se si creano gruppi di campioni, differenti gli uni dagli altri, o se la distribuzione è omogenea ed uniforme.

È una procedura statistica che utilizza una trasformazione ortogonale per convertire le variabili originali della matrice (nel caso specifico le lunghezze d'onda) in una serie di variabili lineari non correlate dette PCs (Principal Components) in grado di massimizzare la varianza. Il numero di PCs è minore o uguale a quello delle variabili originali: le prime contengono la maggior parte dell'informazione originale, mentre le successive possiedono sempre meno informazioni rilevanti. Attraverso lo studio del grafico della varianza residua (ovvero il grafico della varianza spiegata per ciascuna PC) è possibile scegliere un numero di PCs adeguato a descrivere la varianza dei dati raccolti filtrando il rumore (dato non utile). Per tale motivo la PCA è anche definita come una tecnica di riduzione delle variabili.

Uno dei principali risultati della PCA è lo score plot, sistema di assi cartesiani in cui due componenti principali (es. PC-1 e PC-2), sostituiscono rispettivamente l'asse delle ascisse e delle ordinate e rappresentano lo spazio di distribuzione dei campioni. Si crea quindi un nuovo grafico in cui i campioni si andranno a posizionare sulla base del valore degli scores delle due PCs prese in considerazione.

Grazie allo score plot, si può verificare se esiste una evidente differenziazione tra i campioni in gruppi/classi di somiglianza in base alle caratteristiche chimiche dei campioni stessi. Infatti, campioni con composizione e caratteristiche simili hanno valori di scores simili e si raggruppano nella stessa area dello score plot. Inoltre, la PCA permette di riconoscere campioni anomali (outliers) che hanno una distribuzione totalmente differente.

L'analisi del loading plot assume importanza nel caso siano evidenti gruppi di somiglianza in quanto va a spiegare la motivazione della separazione dei campioni nello score plot. Il grafico identifica i picchi di lunghezze d'onda, sia negativi che positivi, riferiti a specifiche proprietà chimiche: più il picco è alto, più quel parametro influenza la distribuzione dei campioni e definisce il motivo del loro differenziamento all'interno dello score plot.

3.10.3 *Partial Least Squares Regression (PLS)*

L'analisi PLS è una tecnica di analisi multivariata di tipo quantitativo che valuta le relazioni tra valori spettrali indipendenti (X) e non spettrali dipendenti (Y) (Blanco e Villarroya, 2002), costruendo una retta di regressione.

Il parametro Y ruota per trovare la massima correlazione, intesa come covarianza con la matrice dei dati spettrali X. La tecnica permette infatti di sviluppare modelli predittivi utilizzando poche variabili latenti (LVs). Il loro numero è scelto in modo tale da garantire una sufficiente predittività e descrivere la variabilità della matrice.

Per effettuare queste predizioni, il modello deve essere validato. Per questo lavoro di tesi è stata usata la tecnica della cross-validation per gruppi di cancellazione (nello specifico 10 gruppi di cancellazione). Questa tecnica comporta la divisione della matrice in n gruppi e nell'escludere uno alla volta i gruppi di dati dall'elaborazione del modello stesso, simulando l'inserimento virtuale dei campioni in un "test-set" per la predizione. In questo modo può essere calcolato un errore di predizione.

I modelli PLS vengono valutati sulla base di parametri specifici che forniscono una importante indicazione sulla robustezza del modello elaborato e quindi sulla sua capacità di stima di campioni incogniti. I parametri sono:

- R^2 o coefficiente di determinazione: proporzione tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico utilizzato. Valori di R^2 compresi tra 0.50 e 0.65 indicano che si può distinguere tra contenuti alti o bassi di Y. Un R^2 con il valore compreso tra 0.66 e 0.81 indica una predizione quantitativa approssimativa, mentre fra 0.82 e 0.90 la predittività è considerata buona. Oltre questi valori è eccellente [Williams, 2001];
- RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation): rappresenta l'errore, cioè la differenza tra valori predetti dal modello e quelli realmente osservati;
- BIAS: misura del discostamento dei dati dalla retta di regressione;
- RER (Range Error Ratio): rapporto tra il range dei valori del parametro di riferimento Y e l'errore RMSECV. Valori di RER inferiori a 6 indicano un modello scadente, valori compresi tra 7 e 20 indicano un modello idoneo ad essere utilizzato in un'applicazione di screening, mentre valori superiori a 20 indicano un ottimo modello.
- RPD (Ratio of Performance to Deviation): rapporto tra la deviazione standard dei valori della Y e l'errore RMSECV. Valori di RPD di 2-3, 3-4 e > 4 indicano rispettivamente un modello discreto, buono ed eccellente.

Capitolo 4

RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Contenuto in solidi solubili

I solidi solubili identificano il contenuto zuccherino del frutto.

Nell'annata 2020 il grado zuccherino più elevato è stato raggiunto dai frutti della varietà Sibilla con una media di 7,8 °Brix, il più basso dai frutti della varietà Silvia con una media di 5,0° Brix. Romina e Cristina raggiungono rispettivamente una media di 6,3 e 7,2 °Brix.

CULTIVAR	SOLIDI SOLUBILI (°BRIX)
CRISTINA	7,2 ± 1,1
ROMINA	6,3 ± 1,4
SIBILLA	7,8 ± 1,5
SILVIA	5,0 ± 1,0

Tabella 4 Contenuto in Solidi Solubili (°Brix) e relative deviazioni standard anno 2020

Nell'annata 2021 si può notare che il range dei solidi solubili è simile a quello dell'anno precedente, con le varietà Sibilla e Silvia che rappresentano rispettivamente i valori maggiori e minori del grado zuccherino (7,5 e 5,4 °Brix). Cristina, Romina e Sveva hanno raggiunto valori di 6,2 6,7 e 6,0 °Brix.

CULTIVAR	SOLIDI SOLUBILI (°BRIX)
CRISTINA	6,2 ± 1,6
ROMINA	6,7 ± 0,9
SIBILLA	7,5 ± 1,2
SILVIA	5,4 ± 1,3
SVEVA	6,0 ± 1,6

Tabella 5 Contenuto in Solidi Solubili (°Brix) e relative deviazioni standard anno 2021

Nella *Tabella 6* si può notare come la stagione vegetativa abbia influito sul tenore in solidi solubili.

SOLIDI SOLUBILI (°BRIX)

Cultivar	2020	2021	Variazione
<i>Cristina</i>	7,2	6,2	-14%
<i>Romina</i>	6,3	6,7	6%
<i>Sibilla</i>	7,8	7,5	-4%
<i>Silvia</i>	5,0	5,4	8%
<i>Sveva</i>	\	6,0	\

Tabella 6 *Contenuto in solidi solubili (°Brix) dei frutti delle varietà analizzate nei due anni di prova e variazione percentuale del contenuto in Solidi Solubili.*

4.2 Acidità titolabile

L'acidità è un parametro molto delicato in quanto un frutto troppo acidulo non è apprezzato dal consumatore medio. I valori medi registrati nelle due annate rientrano comunque in un range accettabile.

Nell'annata 2020 i frutti della varietà Sibilla hanno un contenuto in acido citrico più elevato (0,77 %), i frutti di Romina invece sono meno acidi con valori medi di 0,49 %. I frutti delle cultivar Silvia e Cristina hanno mostrato valori rispettivamente di 0,66 e 0,72.

CULTIVAR	ACIDITÀ (% AC. CITRICO)
CRISTINA	0,72 ± 0,14
ROMINA	0,49 ± 0,11
SIBILLA	0,77 ± 0,20
SILVIA	0,66 ± 0,18

Tabella 7 *Acidità titolabile (% di acido citrico) e relative deviazioni standard anno 2020*

Nell'annata 2021 la cultivar più acida risulta essere Silvia con un valore dello 0,9 %, mentre la più bassa si conferma Romina con lo 0,65 %. Valori intermedi e simili sono stati registrati nelle cultivar Cristina, Sibilla e Sveva con 0,75 %, 0,79% e 0,75%.

CULTIVAR	ACIDITÀ (% AC. CITRICO)
CRISTINA	0,75 ± 0,15
ROMINA	0,65 ± 0,09
SIBILLA	0,79 ± 0,11
SILVIA	0,90 ± 0,18
SVEVA	0,78 ± 0,20

Tabella 8 Acidità titolabile (% di acido citrico) e relative deviazioni standard anno 2021

Nella *Tabella 9* si possono notare le variazioni percentuali registrate rispetto all'anno 2020.

Cultivar	ACIDITÀ (% AC. CITRICO)		
	2020	2021	Variazione
<i>Cristina</i>	0,72	0,75	0,04%
<i>Romina</i>	0,49	0,65	0,33%
<i>Sibilla</i>	0,77	0,79	0,03%
<i>Silvia</i>	0,66	0,90	0,36%
<i>Sveva</i>	\	0,78	\

Tabella 9 Acidità titolabile (% di acido citrico) dei frutti delle varietà analizzate nei due anni di prova e variazione percentuale del contenuto in Acidità.

4.3 Differenze varietali: PCA e spettri medi

La tecnica della PCA è stata utilizzata per esplorare la variabilità dei frutti di fragola raccolti, per riconoscere eventuali differenze legate alla genetica, alla qualità e allo stato fitosanitario del frutto. In questo capitolo vengono riportate le analisi PCA relative alle differenze tra le diverse cultivar.

4.3.1 Stagione vegetativa 2020

La PCA è stata effettuata per indagare tra le differenze delle cultivar e valutare la possibilità di riuscire ad identificare una specifica varietà.

Nello score plot della PCA (*Grafico 1*) è possibile notare una discreta separazione tra le cultivar esaminate. In particolare:

- Cristina è descritta prevalentemente da valori negativi della PC-1 e da valori positivi della PC-2
- Romina è descritta prevalentemente da valori positivi della PC-1

- Sibilla assume valori positivi sia in PC-1 che in PC-2
- Silvia al contrario ha valori negativi sia in PC-1 che in PC-2

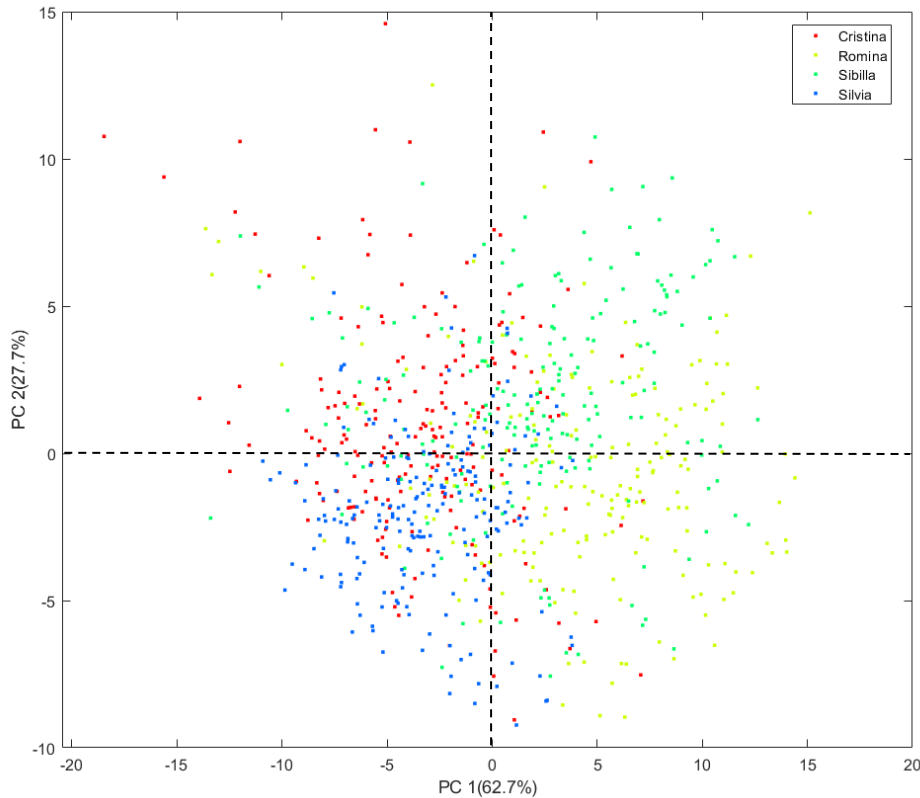


Grafico 1 Score-Plot della PCA di tutti i frutti raccolti nella stagione vegetativa del 2020. La matrice è stata pretrattata con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

Notando una separazione delle quattro varietà sia sulla PC-1 che sulla PC-2, si analizzano i primi due loadings (*Grafico 2*). Nel primo loading è possibile individuare due picchi (5299 e 7235 cm^{-1}), mentre nel secondo quattro picchi (5272, 5361, 7178, e 8767 cm^{-1}). Queste lunghezze d'onda in derivata prima sono responsabili della separazione delle quattro cultivar nel grafico dello score plot. Dato il pretrattamento in derivata prima utilizzato per pretrattare la matrice dei dati spettrali, si osservano i punti in cui la funzione è al punto di 0.

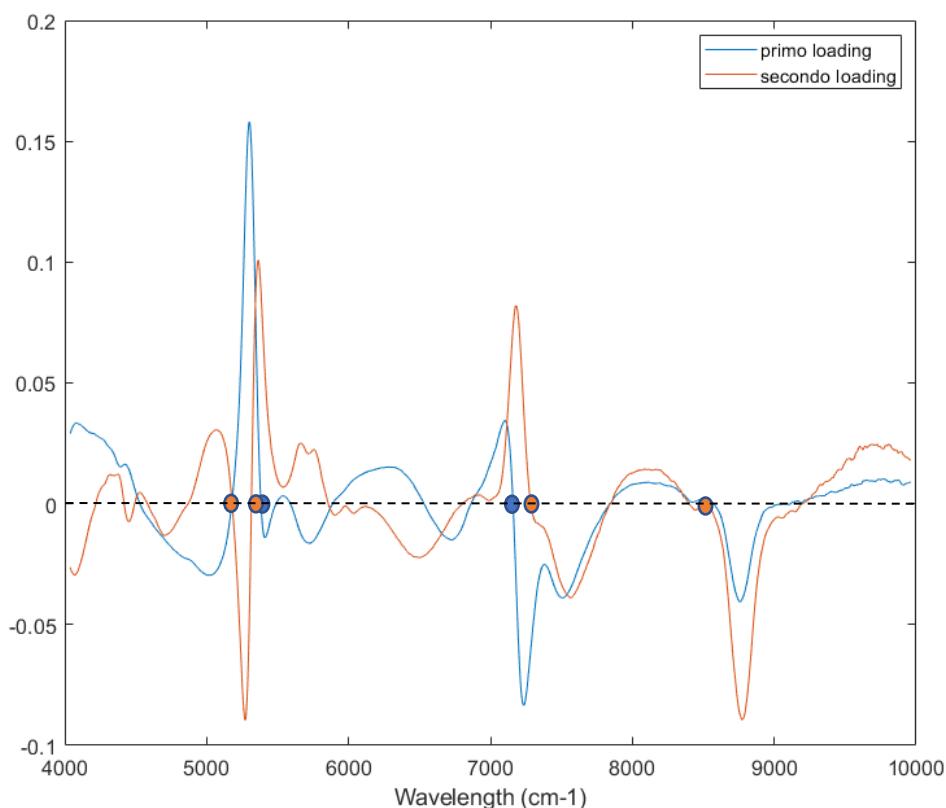


Grafico 2 Primo e secondo loading della PCA anno 2020

Per individuare le differenze tra le varietà abbiamo estrapolato gli spettri medi per ogni cultivar. Com'è possibile notare nel *Grafico 3*, l'andamento spettrale delle quattro varietà è molto simile e le differenze più marcate si sono registrate nella regione compresa tra 4778 e 5014 cm^{-1} e alle lunghezze d'onda di 5334, 5704, 7208, 8763 cm^{-1} . Queste lunghezze d'onda indicano i picchi numerati nel grafico sottostante e molte corrispondono alle lunghezze d'onda individuate nel loading plot. È importante sottolineare che la posizione del picco in derivata prima può deviare dalla posizione nello spettro grezzo e possono manifestarsi degli shift che possono superare i 20 cm^{-1} (Schwanninger et al., 2011). Questo aspetto è fondamentale per l'assegnazione delle bande poiché esse in letteratura possono essere basate sugli spettri grezzi o sulle loro derivate.

Considerando il pretrattamento di derivata prima, il picco nello spettro originale corrisponde allo 0 in derivata prima; quindi, si osservano i punti di 0 dei picchi presi in considerazione.

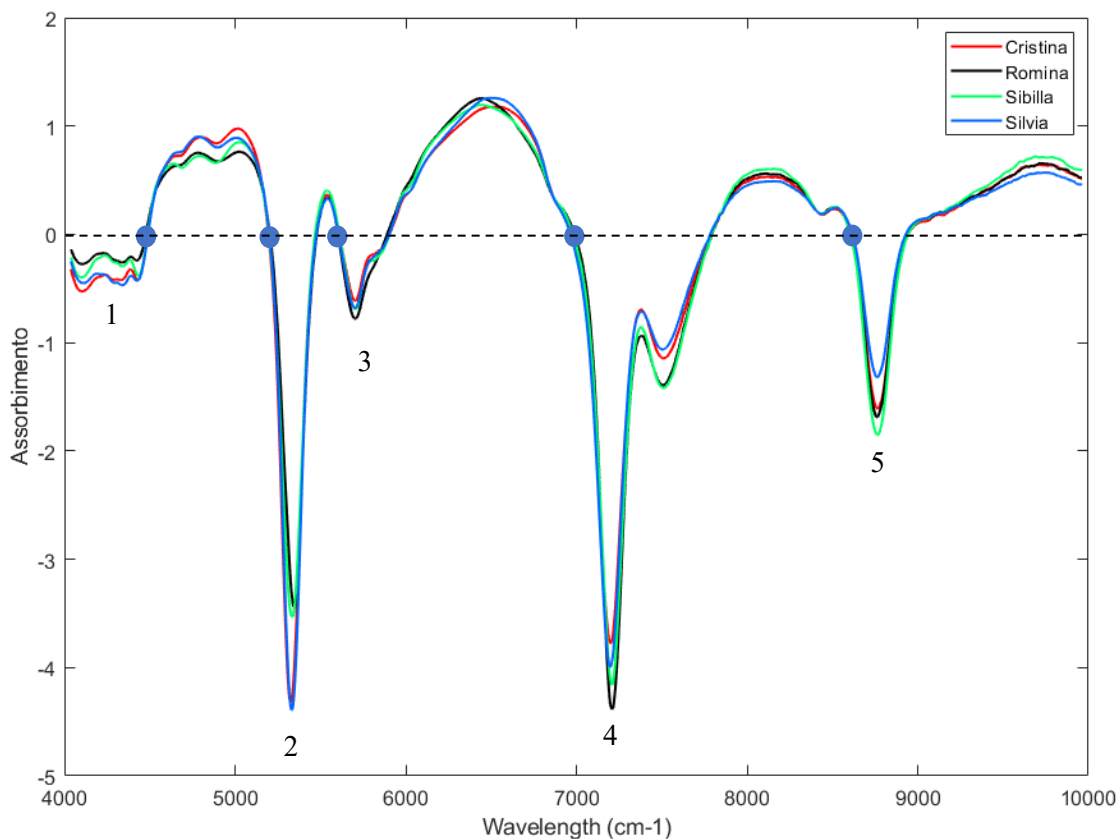


Grafico 3 Spettri medi delle 4 varietà di fragole considerate per l'anno 2020 utilizzando il pretrattamento di derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

Nella *Tabella 10* sono riportate le lunghezze d'onda in cui si possono notare le principali differenze spettrali e un'assegnazione relativa ai rispettivi legami.

Picco di assorbimento	Lunghezza d'onda	Interpretazione
1	4.466 cm^{-1}	Bande di assorbimento dei carboidrati (Siedliskaa et. al, 2018).
2	5.207 cm^{-1}	Stretching e deformazione legame O-H associati all'acqua (Magwaza et al. 2012)
3	5608 cm^{-1}	Primo OT C-H stretching (Magwaza et al. 2012)
4	6965 cm^{-1}	C-H associato agli antociani (Siedliskaa et. al, 2018).
5	8.606 cm^{-1}	Bande di assorbimento dei carboidrati (Siedliskaa et. al, 2018).

Tabella 10 Lunghezza d'onda e interpretazione differenze tra le varietà

4.3.2 Stagione vegetativa 2021

Nell'annata 2021, oltre allo strumento da banco, FT-NIR, è stato utilizzato anche uno strumento portatile, il Micro-NIR. Questo al fine di valutare la possibilità di effettuare un primo screening qualitativo già in campo senza la necessità di dover raccogliere il frutto. Alle cultivar già presenti, è stata aggiunta Sveva, altra varietà oggetto di studio.

Si è indagata la possibilità di poter distinguere le differenze varietali nello stesso modo del 2020, ovvero utilizzando la tecnica della PCA. Nel *Grafico 4* è stato riportato il grafico dello score plot della PCA calcolata con i dati spettrali ricavati dallo strumento da banco FT-NIR. Nonostante i campioni esaminati siano molti e così come il numero di varietà prese in considerazione, è possibile osservare che:

- Romina è descritta prevalentemente da valori positivi della PC-1 e PC-2
- Cristina si distribuisce attorno all'origine degli assi, occupando perlopiù l'area negativa delle PC-2
- Sveva e Sibilla occupano soprattutto l'area negativa della PC-2
- Silvia ha prevalentemente valori negativi in PC-1 e valori positivi in PC-2.

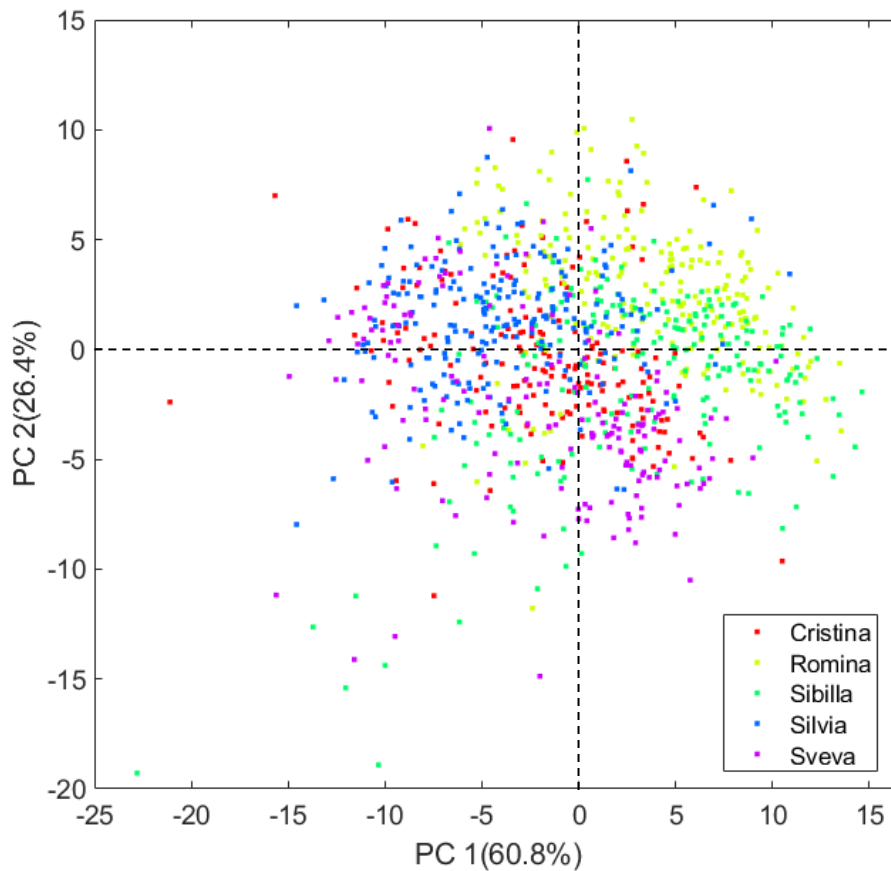


Grafico 4 Score-Plot della PCA calcolata sui dati spettrali ottenuti dallo strumento da banco FT-NIR (anno 2021) con pretrattamento di derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

Anche in questo caso sono stati analizzati i primi due loadings per indagare sulle lunghezze d'onda responsabili delle separazioni delle varietà nello score plot. Nel primo loading sono stati individuati picchi a 5318, 7135, 8767 cm^{-1} mentre nel secondo a 5280, 7200 cm^{-1} (Grafico 5).

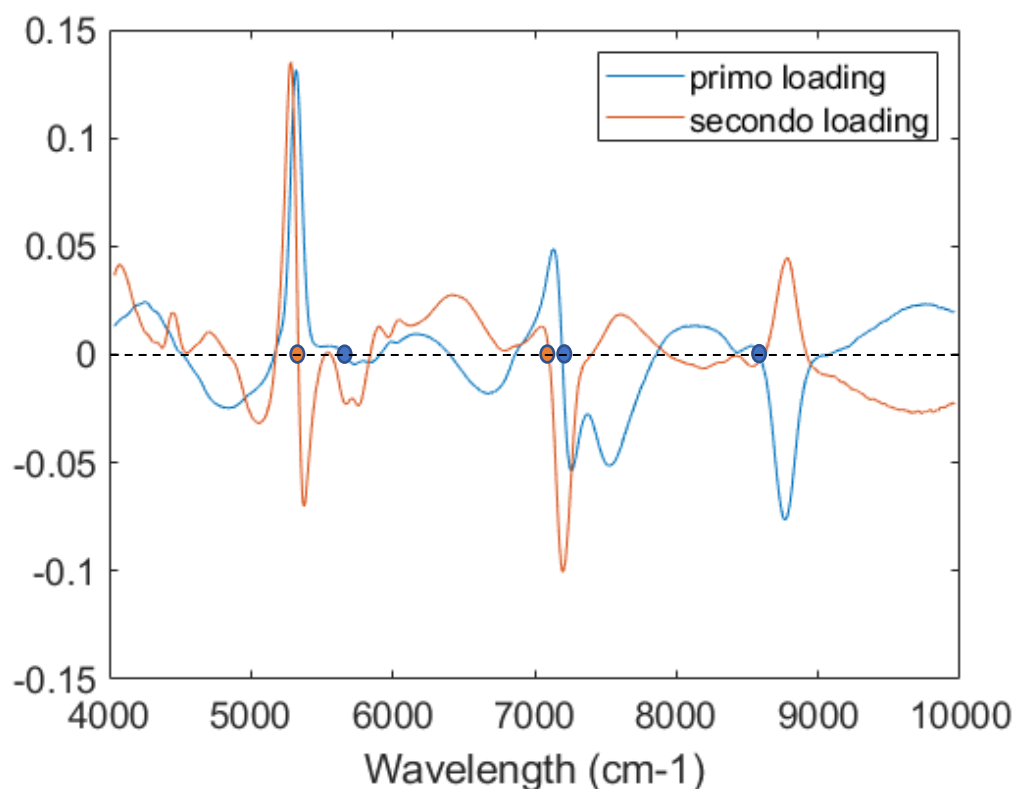


Grafico 5 primo e secondo loading della PCA calcolato con i dati dello strumento FT-NIR, stagione vegetativa 2021.

Com'è possibile notare dal *Grafico 6* anche per l'annata 2021, l'andamento spettrale è simile tra le varietà e le differenze vengono evidenziate soprattutto nella regione compresa tra 4694 e 5033 cm^{-1} e alle lunghezze d'onda 5334, 5704, 7216, e 8763 cm^{-1} . Queste lunghezze d'onda indicano i picchi numerati nel grafico sottostante e la maggior parte corrispondono alle lunghezze d'onda individuate nel loading plot.

In particolare, le cultivar Silvia, Sveva e Cristina hanno un maggior valore di assorbimento nel picco 2, assegnato ai legami OH dell'acqua, infatti soprattutto i frutti della varietà Cristina, da valutazioni reiterate negli anni, risultano quelli con un contenuto di acqua maggiore. a regione spettrale compresa tra 5500 e 7000 cm^{-1} , correlata allo stretching di legami CH e alla presenza di antociani, è interessante notare come Sveva abbia un andamento diverso rispetto alle altre varietà e quasi opposto alla cultivar Romina. Al picco 4 l'assorbimento maggiore è registrato della varietà Romina, mentre al picco 5 gli assorbimenti maggiori sono stati quelli registrati dalle cultivar Romina e Sibilla, mentre quello minore è stato quello registrato dalla cultivar Silvia. Queste differenze di assorbimento confermano la distribuzione dei campioni e delle diverse varietà nello score plot.

Inoltre, questi risultati confermano anche quelli dell'annata precedente (tranne per Sveva assente nel 2020).

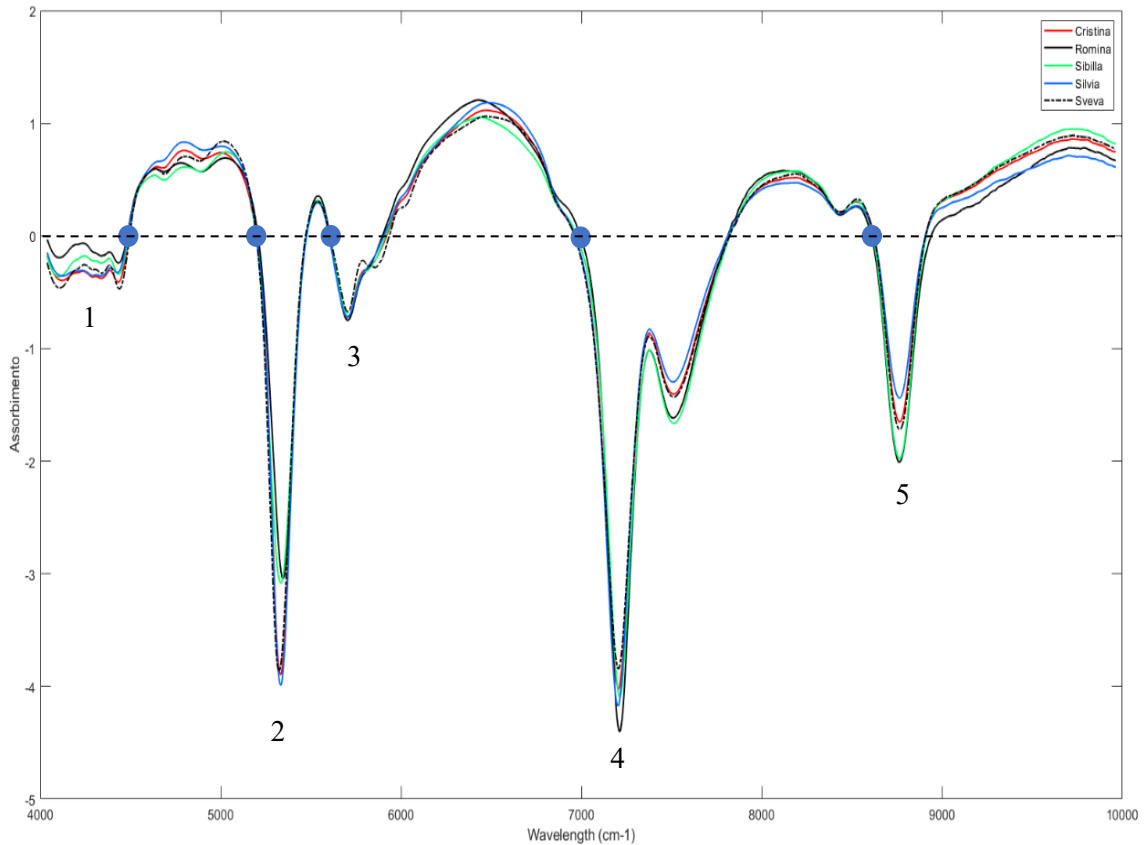


Grafico 6 Spettri medi delle varietà di fragole considerate per la stagione vegetativa 2021 ed analizzate con lo strumento da banco FT-NIR. I dati spettrali sono stati pretrattati utilizzando la derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

Si è passati poi all'analisi PCA dei dati spettrali ottenuti dallo strumento portatile Micro-NIR. E' importante tenere in considerazione che sono state analizzate le stesse fragole e le stesse varietà e che tali elaborazioni sono utili al fine di determinare la fattibilità di ottenere risposte qualitative non distruttive e direttamente sul campo.

La disposizione dei campioni nello score-plot riportato nel *Grafico 7* risulta essere più dispersiva rispetto a quella ottenuta con i dati estrapolati dal FT-NIR; tuttavia, bisogna considerare il costo vantaggioso dello strumento e l'elevato numero di campioni assieme alla loro elevata variabilità.

Osservando con attenzione il grafico, si può ben notare la differenza tra la disposizione di Sibilla e Silvia: la prima occupa la parte negativa della PC-1 e positiva della PC-2, mentre la seconda occupa la parte positiva della PC-1 e la parte sia positiva che negativa della PC-2. Cristina occupa prevalentemente la parte negativa sia della PC-1 che della PC-2. Romina si dispone esclusivamente nella parte positiva della PC-2, al contrario di Sveva che si dispone prevalentemente nell'area negativa della PC-2.

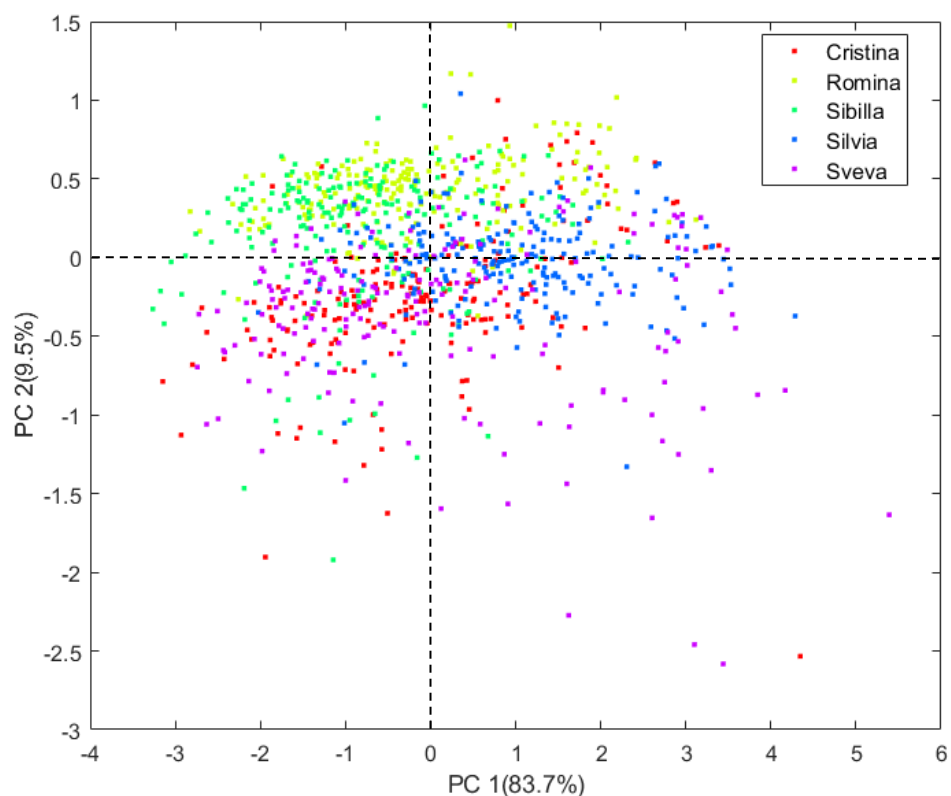


Grafico 7 Score-Plot della PCA calcolata sui dati spettrali ottenuti dallo strumento Micro-NIR di tutti i frutti (anno 2021) con pretrattamento di derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

L'unità di misura adottata dal Micro-NIR per la lettura spettrale è il nanometro. Anche in questo caso sono stati presi in considerazione i primi due loadings in quanto maggiormente responsabili della separazione delle cultivar nello score plot (*Grafico 8*). Analizzando il primo loading si osservano i picchi a 1131, 1397 nm⁻¹ (corrispondenti a 8842, 7158 cm⁻¹) mentre nel secondo a 1112, 1335, 1502 nm⁻¹ (corrispondenti a 8993, 7491, 6658 cm⁻¹).

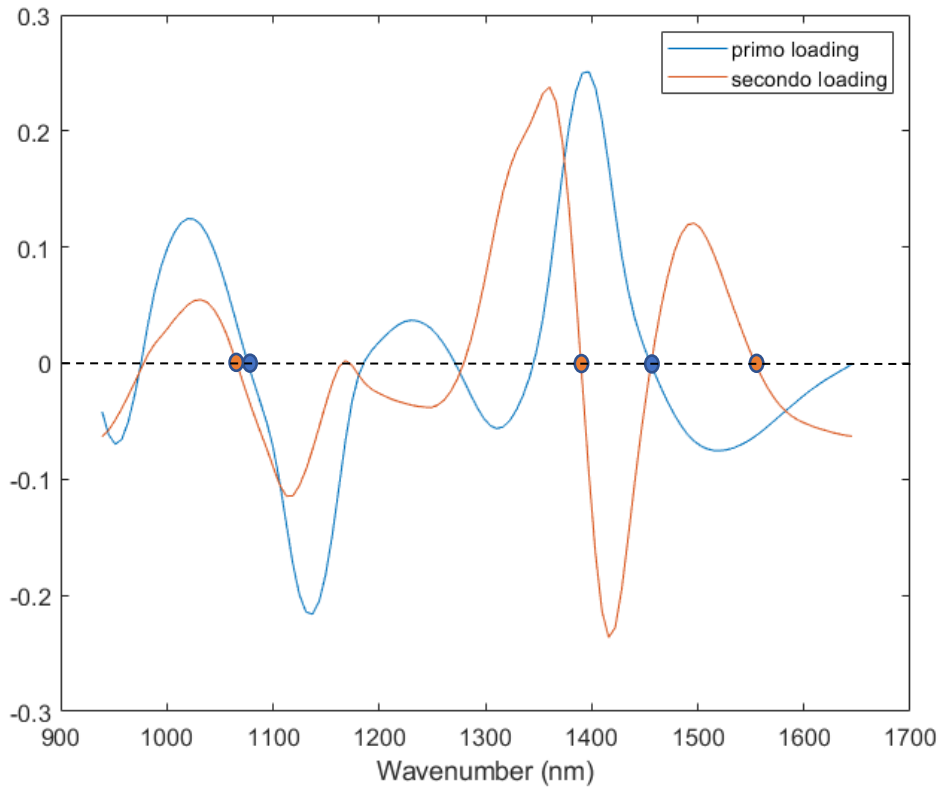


Grafico 8 Primo e secondo loading della PCA calcolata sulla matrice dei dati microNIR, stagione vegetativa 2021.

Dal grafico degli spettri medi di ciascuna varietà (*Grafico 9*) si notano due picchi a 1137 e 1366 nm^{-1} (corrispondenti a 8795 e 7321 cm^{-1}). In questo caso non si osservano delle chiare differenze, tranne che per le cultivar Sibilla e Silvia, ulteriore conferma della loro disposizione opposta nello score-plot.

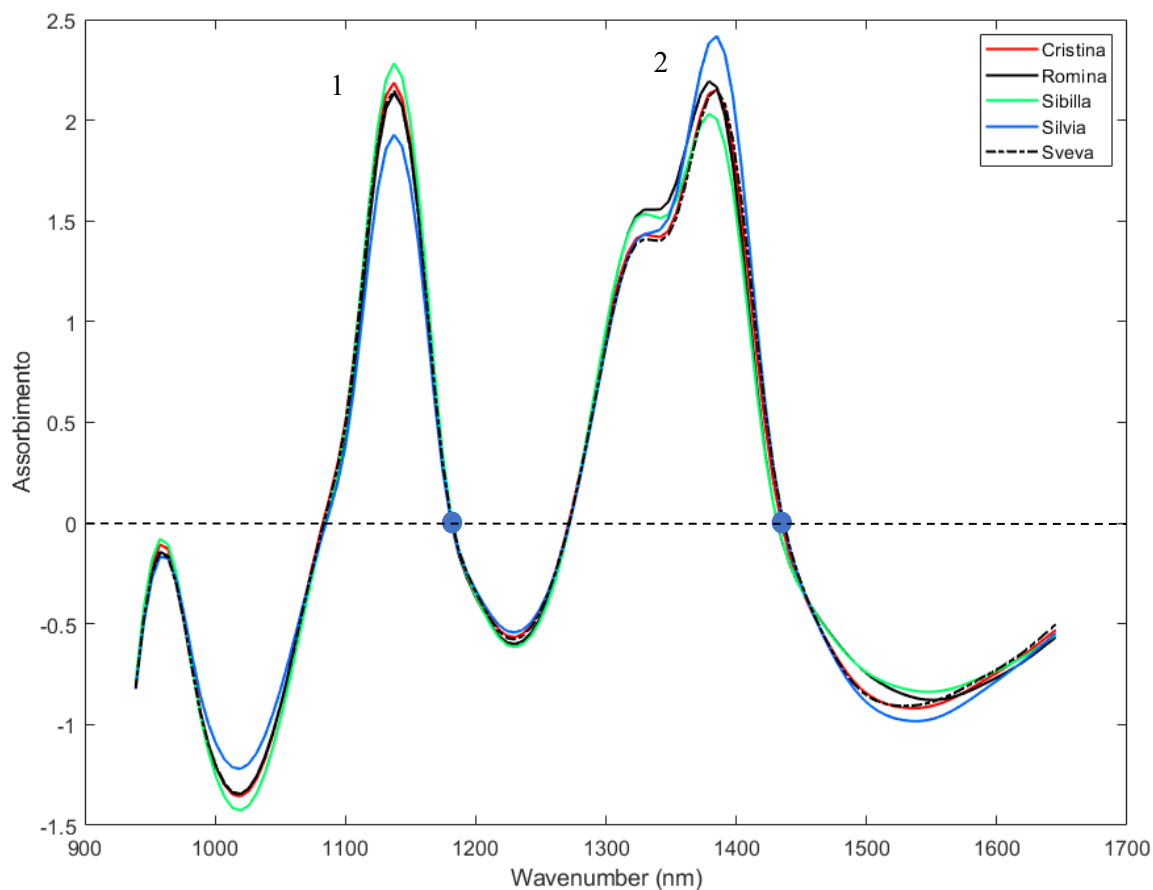


Grafico 9 Spettri medi delle varietà di fragole considerate per la stagione vegetativa 2021 ed analizzate con lo strumento portatile Micro-NIR. La matrice è stata pretrattata con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

Come già anticipato, il picco nello spettro originale corrisponde allo 0 in derivata prima, quindi si osservano i punti di 0 dei picchi presi in considerazione. L'interpretazione degli assorbimenti è spiegata nella *Tabella 5*.

Picco di assorbimento	Lunghezza d'onda (nm)	Lunghezza d'onda cm^{-1}	Interpretazione
1	1195	8368	?
2	1445	6920	C-H associato agli antociani (Siedliskaa et. al, 2018)

Tabella 11 Lunghezza d'onda e interpretazione differenze tra le varietà

4.3.3 Interpretazione dati spettrali

Confrontando i dati raccolti con FT-NIR nelle due annate si notano molte similitudini nella distinzione tra le cultivar analizzate, possiamo notare infatti che:

- al picco 2 gli assorbimenti maggiori sono registrati dalle cultivar Cristina e Silvia (anche Sveva nel 2021), legati prevalentemente alla maggior presenza di acqua,
- al picco 5 gli assorbimenti maggiori sono registrati nelle cultivar Sibilla e Romina dovuto alle vibrazioni di gruppi funzionali CH, zuccheri e cellulose.

Questi risultati confermano che a prescindere dalle stagioni vegetative si riescono ad individuare delle regioni spettrali strettamente connesse alle caratteristiche genetiche della varietà.

L'interpretazione dei dati ottenuti dal Micro-NIR risulta meno chiara rispetto a quella dello strumento da banco, dato che le differenze tra le varietà sono meno marcate soprattutto nei due picchi, dove si evidenzia esclusivamente una netta separazione tra le cultivar Sibilla e Silvia. Nel secondo picco vengono leggermente evidenziate delle differenze visibili sia nell'assorbimento che nello shift tra i picchi correlabili alla quantità di antociani.

4.4 Valutazioni stato fitosanitario

Per effettuare delle valutazioni sullo stato fitosanitario del frutto si è ricorsi ancora una volta alla tecnica della PCA. Come già effettuato per lo studio delle differenze varietali è stata calcolata una PCA per ognuno dei tre dataset: i) strumento da banco stagione vegetativa 2020, ii) strumento da banco stagione vegetativa 2021 e iii) strumento portatile stagione vegetativa 2021. I risultati ottenuti non sono stati soddisfacenti in quanto le differenze genetiche e varietali prevalevano rispetto alle differenze tra i diversi livelli di danno da *Botrytis cinerea*. Di conseguenza si è deciso di analizzare ed indagare all'intero di ogni varietà, in modo che l'unica differenza presente tra i campioni fosse il diverso grado d'infezione.

4.4.1 Stagione vegetativa 2020

Come anticipato è stata effettuata una PCA per ogni varietà classificando i campioni in base al grado di infezione da *botrytis cinerea*.

Il *Grafico 10* riporta i diversi score plot delle PCA calcolate tenendo in considerazione i dati spettrali ottenuti per ogni varietà con lo strumento da banco FT-NIR nella stagione vegetativa 2020. Da questi grafici è possibile notare per tutte le varietà, tranne che per Silvia (*Grafico 10.D*), una distinzione tra le classi di danno: la prima classe (colore rosso) indica grado d'infezione 0-1, la seconda (colore verde) indica grado d'infezione 2-3 e la terza (colore blu) indica grado d'infezione 4-5.

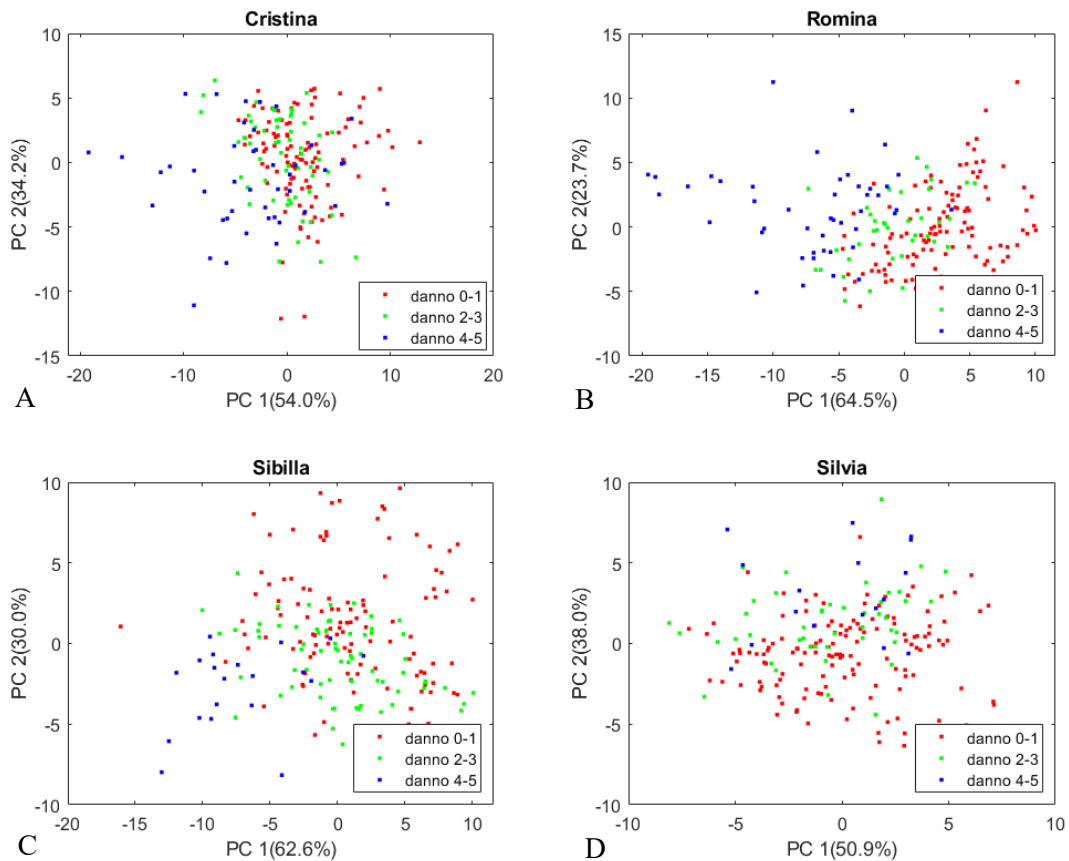


Grafico 10 Score-Plot delle PCA calcolate sui dati spettrali di ogni varietà ottenuti dallo strumento da banco FT-NIR nella stagione vegetativa 2020. I dati sono stati pretrattati con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

All'interno di ogni varietà è stato calcolato uno spettro medio per ogni classe di danno (*Grafico 11*), così da poter identificare le principali differenze spettrali e le lunghezze d'onda responsabili della separazione dei tre gruppi negli score plot della PCA.

Com'è possibile notare dagli spettri sottostanti:

- A. Cristina mostra delle marcate differenze a 5014, 7208, 8783 cm^{-1}
- B. Romina a 5014, 5334, 7208 cm^{-1}
- C. Sibilla a 5014, 5332, 7208 e 8783 cm^{-1}
- D. In Silvia invece le differenze tra gli spettri medi delle diverse classi di danno, sono minime, ciò spiega anche la separazione meno marcata tra le diverse classi nello score plot della PCA.

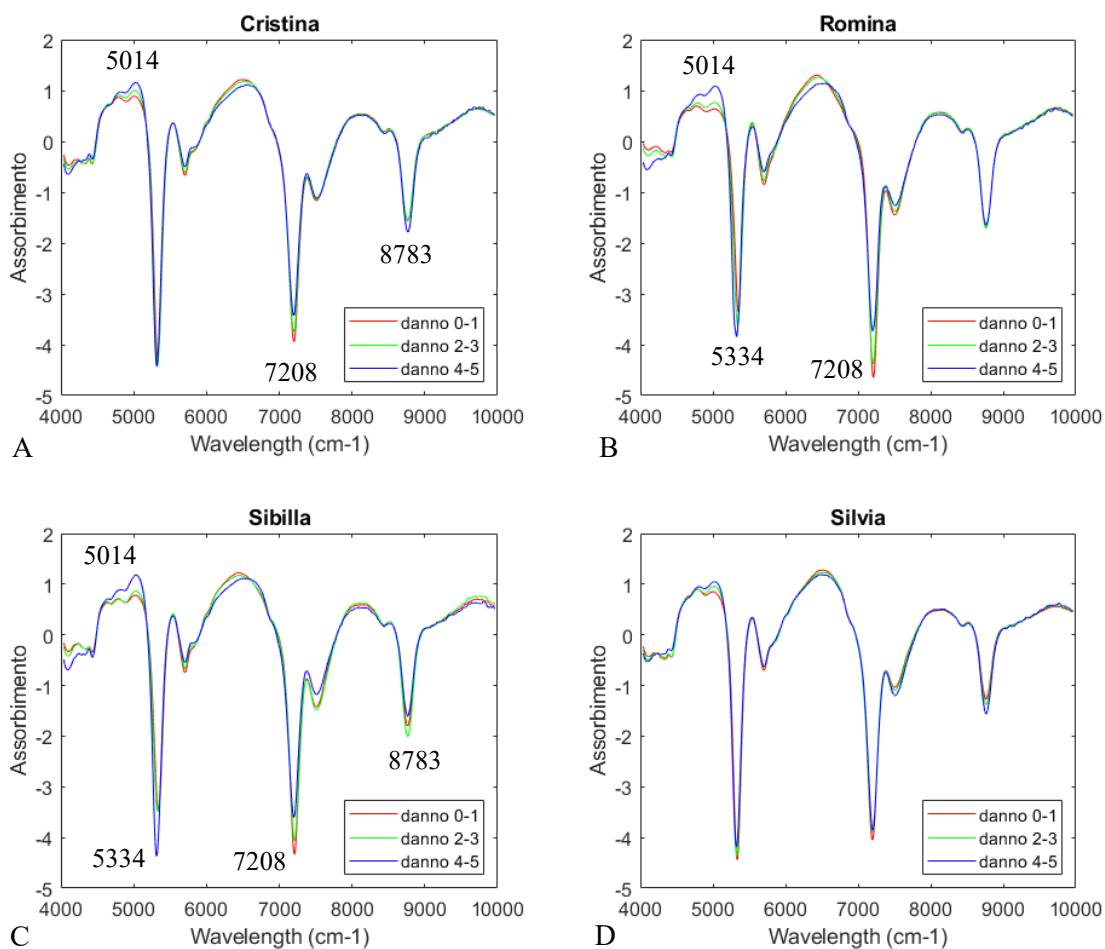


Grafico 11 Spettri medi delle tre classi di danno per ogni varietà considerata per la stagione vegetativa 2020 ed analizzate con lo strumento da banco FT-NIR. I dati sono stati pretrattati utilizzando la derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

4.4.2 Stagione vegetativa 2021

Per l'anno 2021 il procedimento è rimasto invariato e come nel paragrafo 4.3.2 si è ricorso prima allo studio dei dati ottenuti dallo strumento da banco FT-NIR e poi quelli ottenuti dallo strumento portatile Micro-NIR.

È stata quindi calcolata una PCA utilizzando i dati spettrali ottenuti con lo strumento da banco, separando le varietà e classificandole in base al grado di infezione da *botrytis cinerea* (Grafico 12). Anche per questa stagione vegetativa, la separazione nello score plot tra i frutti sani e i frutti contaminati è rimasta valida, tranne che per la varietà Silvia che conferma una distribuzione uniforme dei campioni con classi di danni differenti.

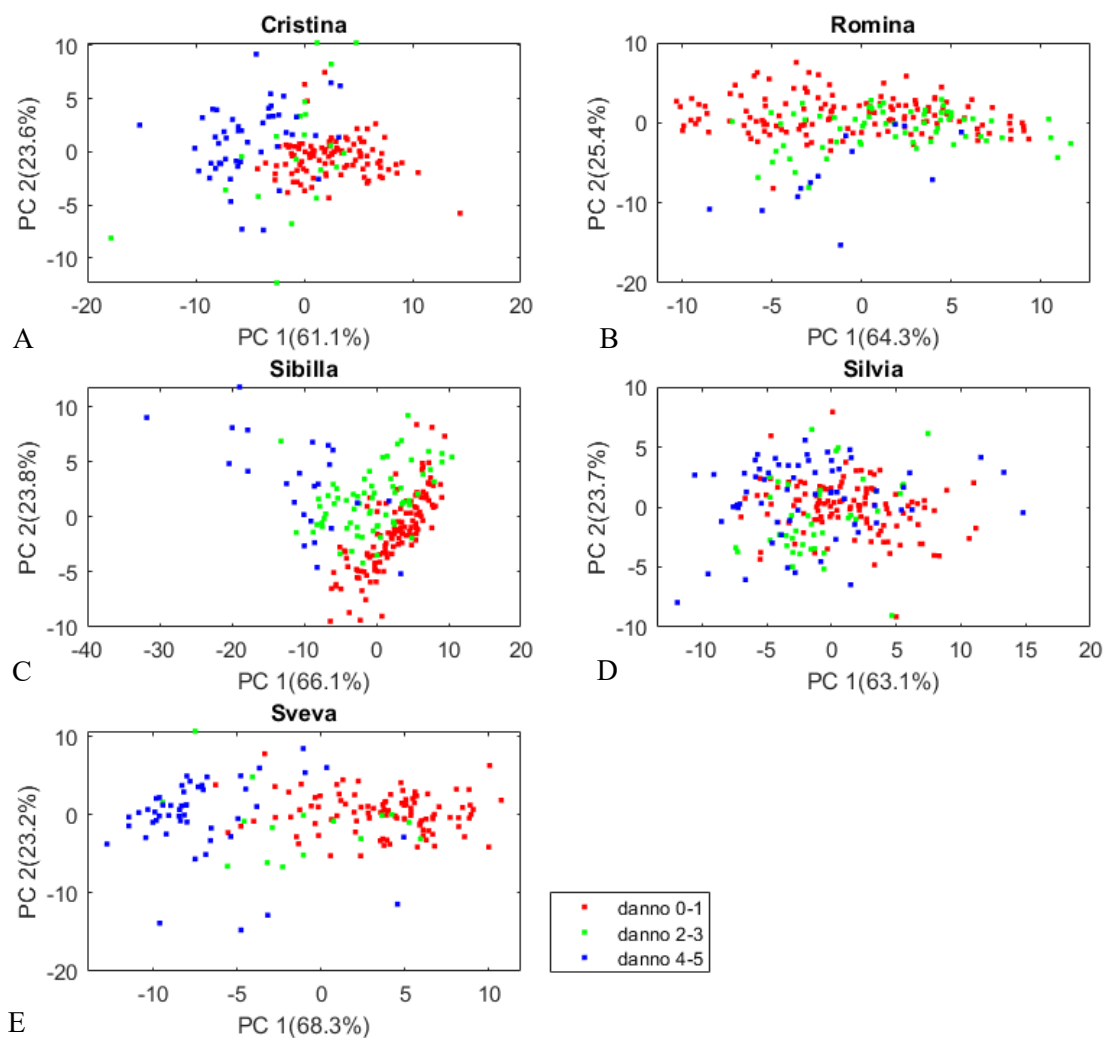


Grafico 12 Score-Plot delle PCA calcolate sui dati spettrali di ogni varietà ottenuti dallo strumento da banco FT-NIR nella stagione vegetativa 2021. I dati sono stati pretrattati con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

Per quanto riguarda le differenze spettrali tra le classi di danno nel *Grafico 13* sono stati riportati gli spettri medi per ogni varietà e per ogni classe di danno. È possibile notare un andamento diverso a seconda della varietà presa in considerazione:

- Cristina mostra delle differenze di assorbimento a 5334, 7208 e 8763 cm^{-1}
- Romina evidenzia innanzitutto un picco a 5033 cm^{-1} per la classe di danno 4-5, uno shift tra i picchi nella regione compresa tra 5303 e 5349 cm^{-1} , differenze chiare a 7208 e 8763 cm^{-1}
- Sibilla è la varietà che meglio evidenzia le differenze tra le classi di danno, si possono notare infatti differenze tra i picchi a 5033, 5334, 7208 e 8763 cm^{-1}

D. Silvia è quella che mostra le differenze meno marcate e presenti solo a 5334 e 8763 cm^{-1} .

E. Sveva manifesta differenze a 5334 e 8763 cm^{-1}

Tuttavia, quanto detto per la stagione vegetativa del 2020 è valido anche per la stagione vegetativa 2021.

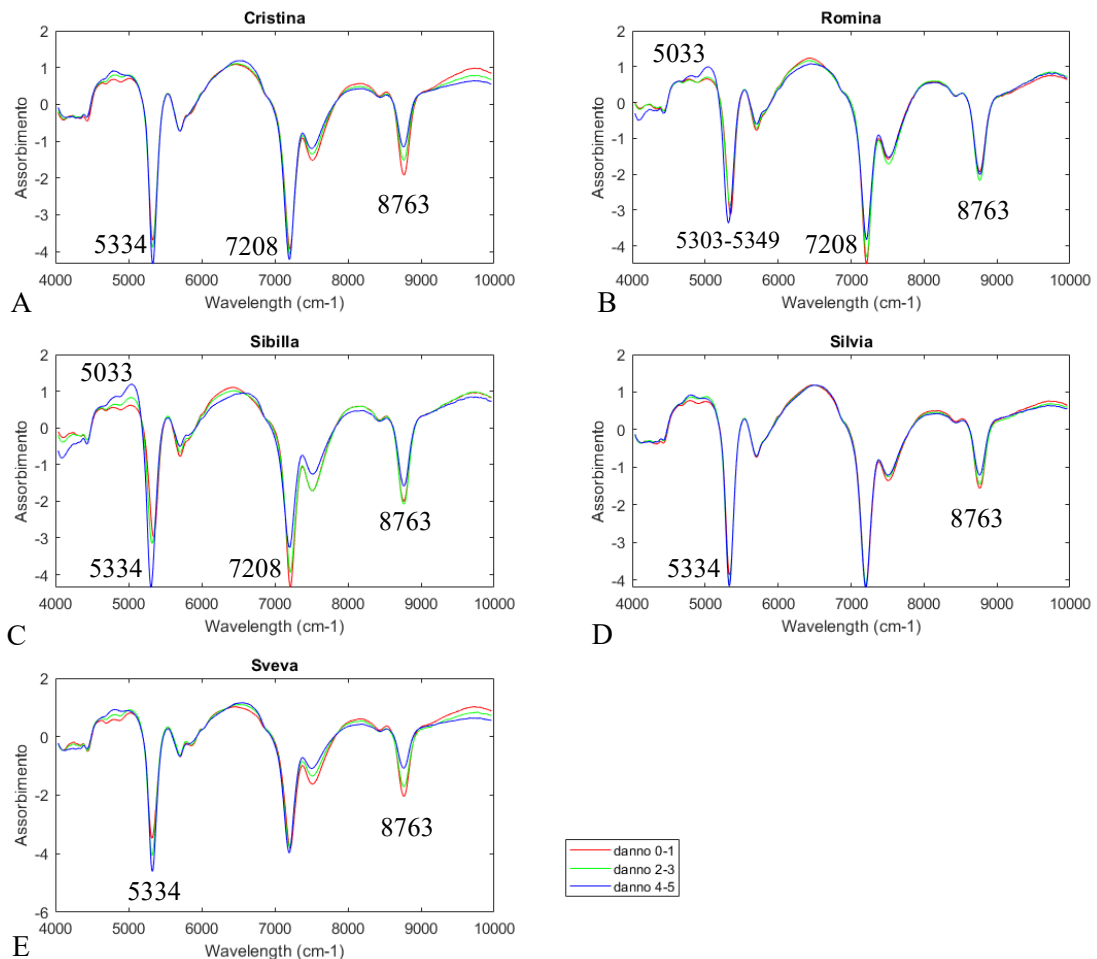


Grafico 13 Spettri medi delle tre classi di danno per ogni varietà considerata per la stagione vegetativa 2021 ed analizzate con lo strumento da banco FT-NIR. I dati sono stati pretrattati utilizzando la derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

Gli score plot ricavati dal calcolo delle PCA sui dati del Micro-Nir (*Grafico 14*) risultano meno chiari rispetto a quelli ottenuti con FT-NIR, tuttavia, tranne che per la cultivar Romina è sempre possibile osservare una separazione chiara tra le classi estreme 0-1 e 4-5.

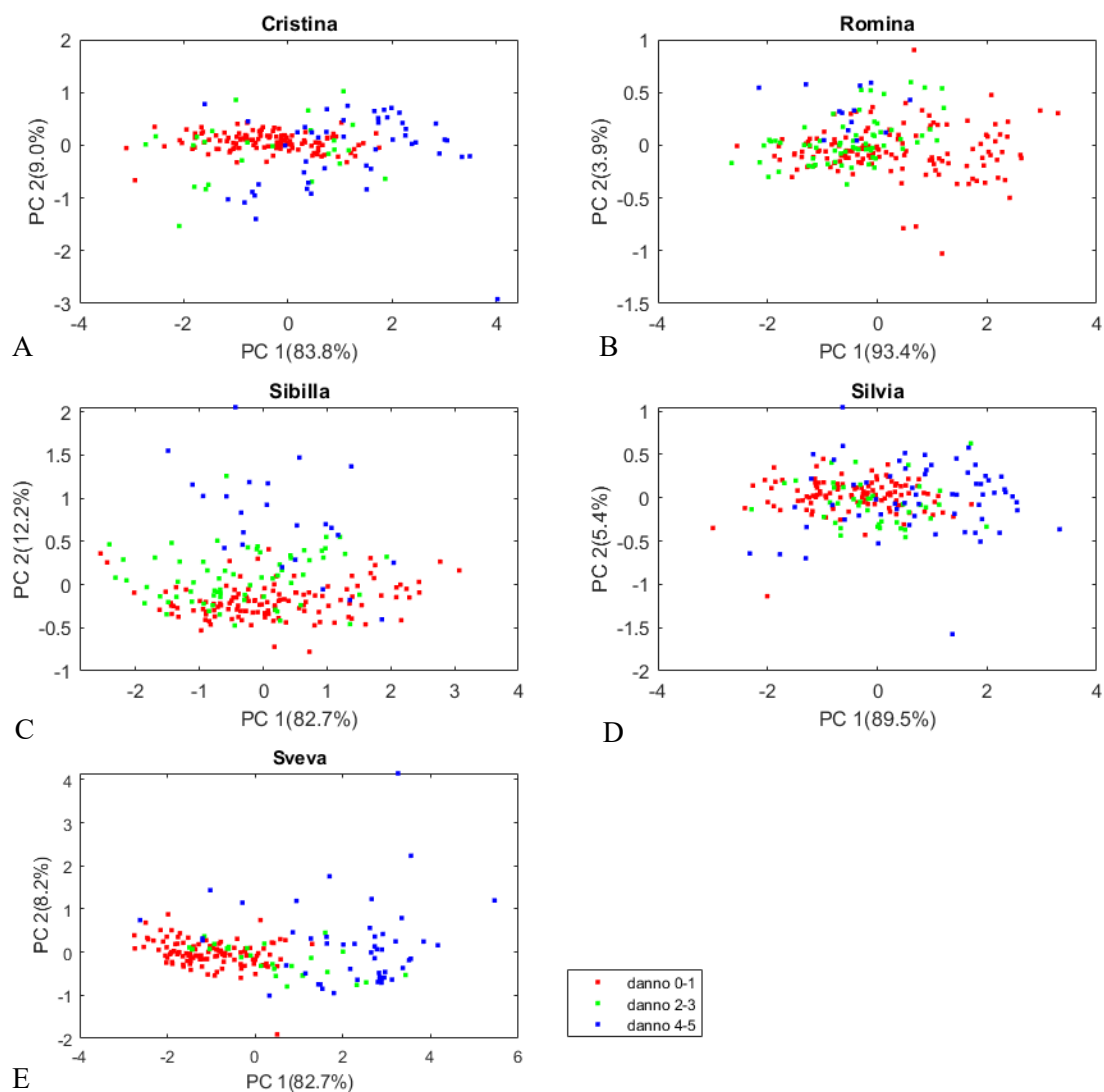


Grafico 14 Score-Plot delle PCA calcolate sui dati spettrali di ogni varietà ottenuti dallo strumento portatile microNIR nella stagione vegetativa 2020. I dati sono stati pretrattati con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV.

Analizzando invece gli spettri medi delle diverse classi di danno all'interno di ogni varietà (Grafico 15) si notano delle differenze più marcate:

- Cristina, Romina e Sveva (Grafico 15.A, 15.B, 15.E) manifestano delle chiare differenze ai picchi 1137 e 1366 nm^{-1}
- Sibilla (Grafico 15.C) non mostra particolari differenze al picco 1137 nm^{-1} , mentre alla lunghezza d'onda 1366 nm^{-1} si nota uno shift tra i picchi degli spettri medi
- Silvia (Grafico 15.D) manifesta una marcata separazione soprattutto per lo spettro medio del danno 4-5 ai picchi 1137 e 1366 nm^{-1}

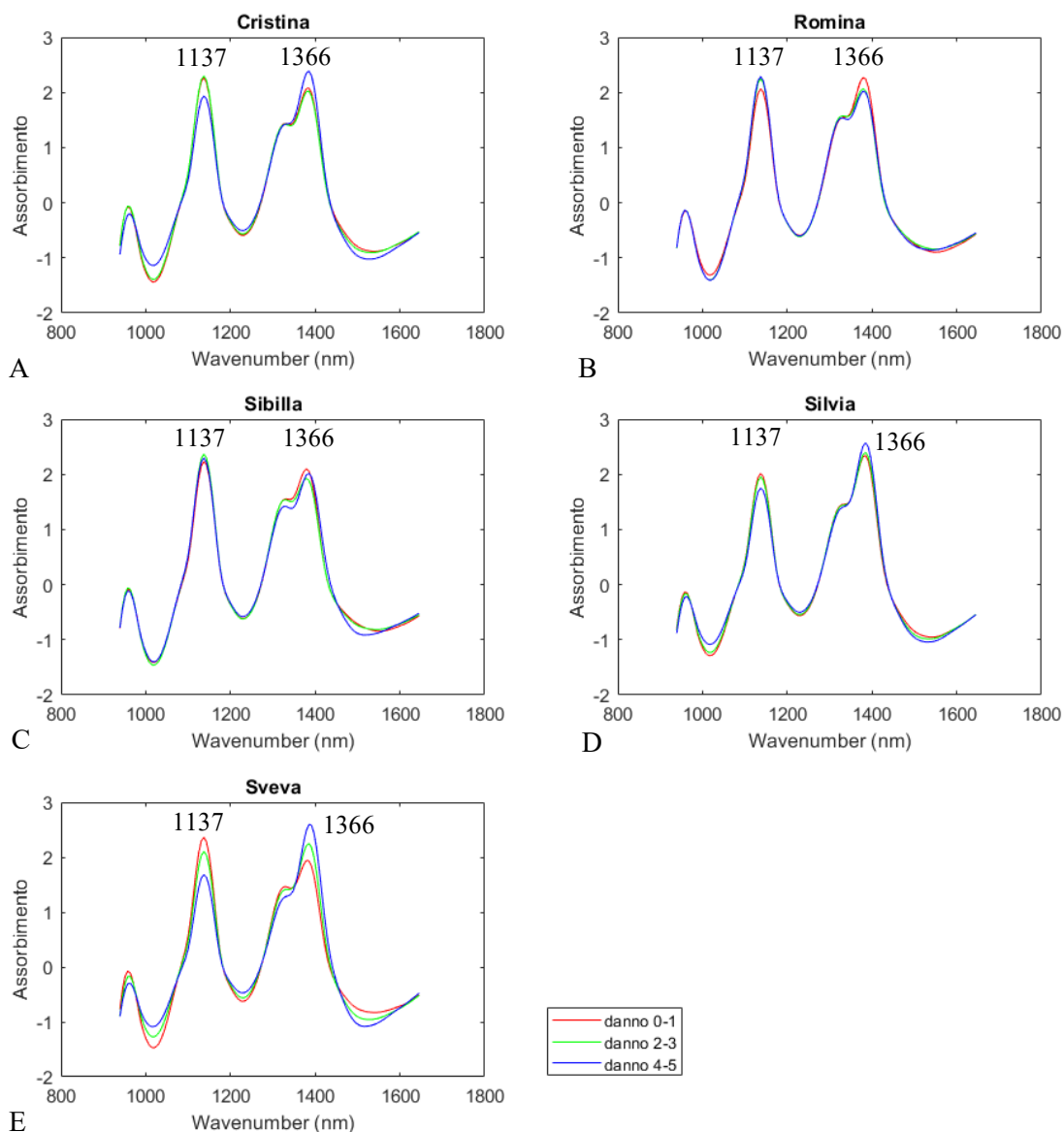


Grafico 15 Spettri medi delle tre classi di danno per ogni varietà considerata per la stagione vegetativa 2021 ed analizzate con lo strumento portatile Micro-NIR. I dati sono stati pretrattati con derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) e SNV

4.4.3 Interpretazione dati spettrali

Per quel che riguarda i dati ricavati dallo strumento da banco FT-NIR si nota in entrambe le stagioni vegetative che al picco 5014 cm^{-1} tutte le varietà presentano un maggior assorbimento associato alle classi di danno via via crescente, viceversa al picco 7208 cm^{-1} i valori più alti vengono registrati dalle classi di danno inferiore. I fattori che causano questi cambiamenti di assorbimento risiedono nella variazione del contenuto di acqua e della

degradazione dei carboidrati e delle pectine (Silaghi, 2011) associabili al diverso grado d'infezione di *Botrytis cinerea* (Jan A.L. van Kan, 2005).

Anche in questo caso, come nel paragrafo 4.3.3, i dati del Micro-NIR risultano meno chiari e di più difficile interpretazione: le varietà Sibilla e Romina più simili tra loro a livello spettrale anche dai dati raccolti con FT-NIR, manifestano assorbimenti opposti per le classi di danno rispetto alle varietà Cristina, Silvia e Sveva.

Le bande di assorbimento sono comunque legate ai gruppi funzionali O-H e C-H e alla presenza di antociani, tutti elementi correlati all'andamento dell'infezione in quanto il fungo *Botrytis cinerea* causa la perdita d'acqua e l'aumento del contenuto di antociani presenti nei frutti (Siedliskaa et. al, 2018).

4.5 Partial Least Squares Regression (PLS)

Oltre che per l'analisi esplorativa PCA, la matrice dei dati spettrali è stata utilizzata per l'analisi quantitativa della PLS, grazie alla quale è possibile costruire dei modelli di predizione dei parametri qualitativi di interesse. Nello specifico, i parametri oggetto di studio sono stati contenuto in solidi solubili e acidità. Prima della costruzione del modello PLS sono stati provati diversi pretrattamenti dei dati spettrali al fine di minimizzare l'effetto del rumore e dello spostamento della linea di base.

4.5.1 Stagione vegetativa 2021: predizione del contenuto in solidi solubili

I modelli ottenuti per la predizione del contenuto in solidi solubili (zuccheri) (*Grafico 16*) sono risultati molto soddisfacenti in quanto sia l' R^2 che l'errore raggiungono dei buoni valori dimostrando rispettivamente la buona performance, la qualità e validità del modello. Valori leggermente più bassi ma comunque accettabili vengono raggiunti da RPD che fornisce indicazioni sulla "robustezza del modello". Il miglior pretrattamento è risultato quello con derivata prima (filtro Savitzky-Golay, 21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) ed SNV che ha raggiunto valori in cross-validazione di R^2 pari a 0.70, RER 10.33, RPD 1.83, e RMSECV 0.91 ° Brix.

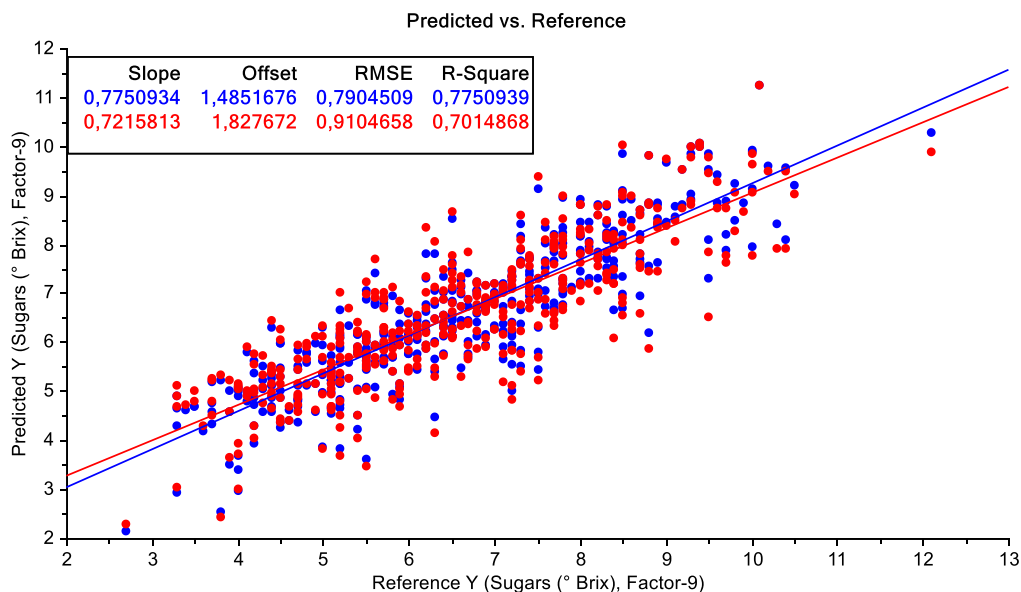


Grafico 16 Retta di validazione (rosso) e retta di calibrazione (blu) del modello ottenuto con pretrattamento derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale), SNV e media delle repliche

4.5.2 Stagione vegetativa 2021: predizione del contenuto in solidi solubili con dati ottenuti da FT-NIR e Micro-NIR

Nell'annata 2021 sono stati costruiti due modelli per confrontare le performance di predizione tra i dati ricavati dallo strumento da banco FT-NIR e quelli ricavati con lo strumento portatile Micro-NIR e per verificare che il modello costruito nel 2020 con lo strumento da banco FT-NIR sia paragonabile a quello del 2021.

Il modello PLS costruito con i dati ottenuti utilizzando lo strumento da banco FT-NIR della stagione vegetativa 2021 (*Grafico 17*) risulta più performante di quello costruito nell'anno precedente. Anche in questo caso il pretrattamento migliore è stato quello della derivata prima (filtro Savitzky-Golay, 21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale) più SNV. I valori in cross-validazione suggeriscono la possibilità di utilizzare il modello in applicazioni di screening e in particolare i valori di R^2 pari a 0.73, RER 11.67, RPD 1.91, e RMSECV 0.78 ° Brix.

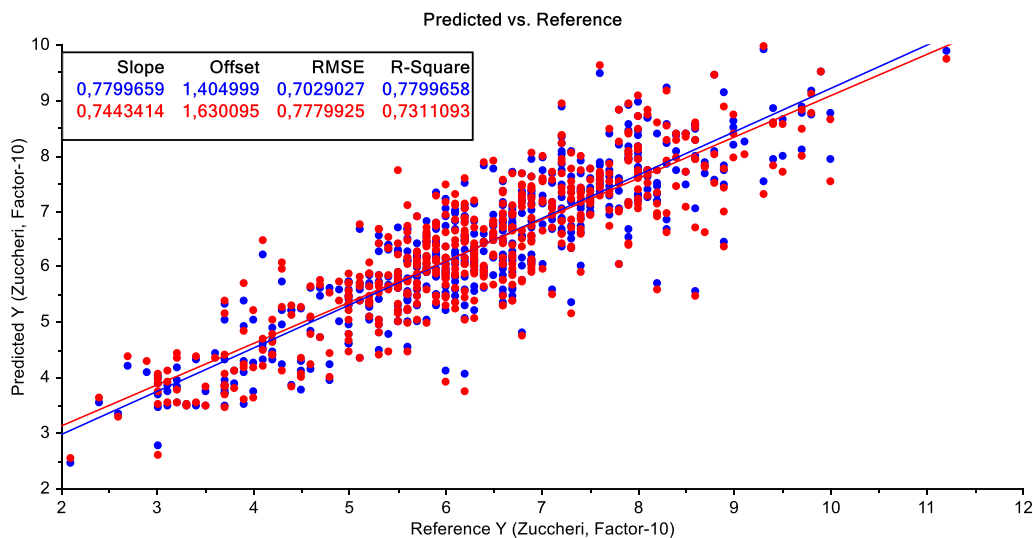


Grafico 17 Retta di validazione (rosso) e retta di calibrazione (blu) del modello ottenuto dai dati di FT-NIR con pretrattamento derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale), SNV e media delle repliche

Con i dati ricavati dall'acquisizione dei campioni con lo strumento portatile Micro-NIR è stato costruito un primo modello di predizione (*Grafico 18*) che però non ha raggiunto gli standard previsti, dunque si è deciso di elaborare un nuovo modello (*Grafico 19*) indagando nella regione spettrale compresa tra 908 e 1310 nm selezionando le lunghezze d'onda più influenti e semplificando il modello dal punto di vista computazionale ed interpretativo. Così facendo abbiamo raggiunto valori di R^2 pari a 0.59, RER 9.58, RPD 1.75, e RMSECV 0.95 ° Brix. Il modello non rimane utilizzabile per screening qualitativi ma soltanto per una divisione tra fragole più o meno zuccherine, quindi per classi di dolcezza.

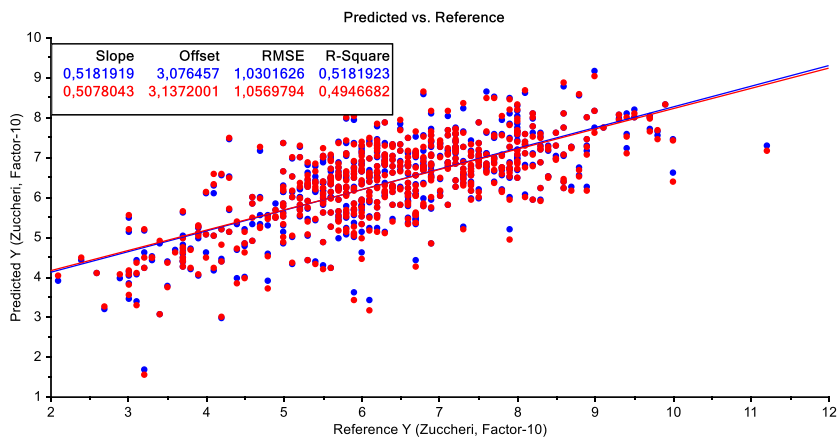


Grafico 18 Retta di validazione (rosso) e retta di calibrazione (blu) del modello ottenuto dai dati di Micro-NIR (spettro completo) con pretrattamento derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale), SNV e media delle repliche

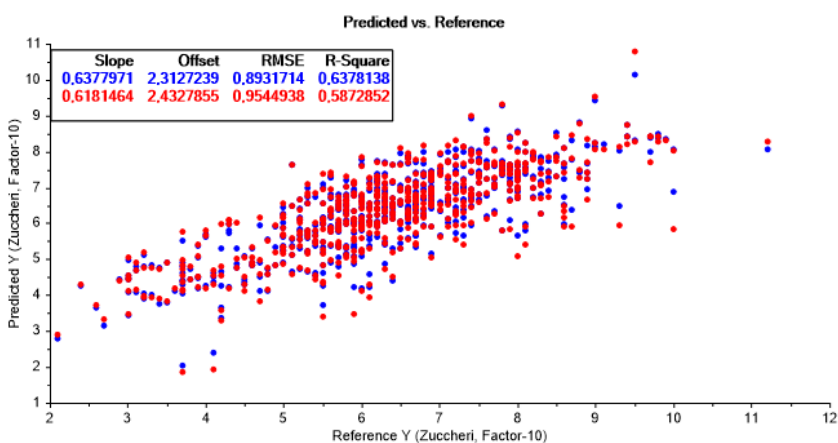


Grafico 19 Retta di validazione (rosso) e retta di calibrazione (blu) del modello ottenuto dai dati di Micro-NIR (spettro ridotto) con pretrattamento derivata prima (21 punti di smoothing, secondo ordine polinomiale), SNV e media delle repliche

4.5.3 Risultati su acidità titolabile

I modelli di regressione PLS sviluppati per la predizione dell'acidità titolabile non hanno raggiunto le stesse performance di predizione dei modelli creati per i solidi solubili. Per lo studio dei dati inerenti all'acidità sono stati testati diversi pretrattamenti, ma nessuno di questi è risultato idoneo a costruire un modello di predizione affidabile

Capitolo 5

CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi ha avuto tre obiettivi principali: sviluppare un metodo per la diagnosi precoce di *Botrytis cinerea* in frutti di fragola, migliorare lo sviluppo di modelli per la predizione di parametri qualitativi come contenuto in solidi solubili e acidità in frutti di fragola e verificare la possibilità di muovere l'analisi qualitativa del frutto direttamente in campo confrontando i risultati ottenuti con lo spettrofotometro portatile con quelli dello spettrofotometro da banco.

Le prove condotte hanno permesso di giungere alle seguenti conclusioni:

- l'utilizzo del NIR rivela una buona applicabilità per i rilevamenti di *Botrytis cinerea* su fragola partendo già da un basso grado d'infezione, quando la contaminazione è visibile attraverso un'ispezione visiva accurata, mostrando una marcata separazione tra le classi di danno 0-1 rispetto alle classi di danno 4-5;
- è possibile sviluppare dei modelli quantitativi robusti ed affidabili per quanto riguarda la predizione del contenuto in solidi solubili;
- la PCA e l'interpretazione degli spettri sono degli strumenti validi per indagare tra le differenze genetiche e varietali;
- l'utilizzo del Micro-NIR risulta affidabile per indagare tra marcate differenze varietali e per effettuare una distinzione tra le classi di dolcezza all'interno di frutti di fragole.

Più nello specifico i risultati della tesi evidenziano che l'analisi delle componenti principali (PCA) è una metodologia che può essere utilizzata per determinare la somiglianza spettrale, su base chimica e genetica, delle diverse varietà in maniera tale da velocizzare ad esempio i processi di selezione e miglioramento genetico. Inoltre, questa tecnica è utile per discriminare i frutti con diverso grado di contaminazione da patologie fungine come *Botrytis cinerea*, pertanto, l'approccio proposto è vantaggioso per evitare la contaminazione incrociata di fragole nel post raccolta. Tuttavia, è necessario approfondire questo lavoro per migliorare questa tecnica magari con l'ausilio di sistemi iper-spetttrali o testando ulteriori agenti patogeni.

L'imaging iper-spetttrale è una tecnica di misura che permette di acquisire, per ogni punto di una immagine, l'informazione dell'intero spettro, aumentando notevolmente l'affidabilità di analisi. Le immagini iper-spetttrali acquisite nel vicino infrarosso (NIR) combinano i vantaggi della spettroscopia e dell'imaging, consentendo di ottenere una sorta di "fotografia chimica" del campione in cui si evidenziano aspetti del campione difficilmente visibili o non visibili ad occhio nudo.

Per quanto riguarda invece l'applicazione della Partial Least Square Regression (PLS) agli spettri infrarossi dei campioni esaminati si è dedotto che è possibile sviluppare dei modelli quantitativi, grazie ai quali è possibile effettuare delle analisi sui frutti senza dover necessariamente utilizzare delle metodologie di laboratorio di tipo distruttivo, questi modelli risultano validi ed affidabili solo per la predizione del contenuto in solidi solubili, infatti, pur indagando in diverse regioni spettrali, selezionando delle lunghezze d'onda che potevano contenere un maggior numero d'informazioni, non si è riuscito a costituire un modello robusto per la predizione dell'acidità.

Il Micro-NIR, infine, risulta uno strumento utile, da utilizzare in campo per poter effettuare una selezione precoce e/o per monitorare l'evoluzione di determinati parametri durante tutto il ciclo vegetativo del frutto. Inoltre, è possibile effettuare un primo screening direttamente sul frutto attaccato alla pianta madre sia per quanto riguarda il contenuto in solidi solubili sia per il grado d'infezione.

Dunque, l'impiego della spettrofotometria nel vicino infrarosso coniugata all'utilizzo della chemiometria ha reso possibile il raggiungimento di risultati apprezzabili evidenziando che l'analisi NIR è in grado di contenere molteplici informazioni tali da caratterizzare i frutti secondo diversi parametri e vista la sua capacità di analisi non distruttiva appare come una tecnica adeguata alla selezione merceologica di questa tipologia di prodotti. Inoltre, gli strumenti portatili, rappresentano una nuova frontiera di analisi e con il progredire della tecnologia possono diventare sempre più precisi ed affidabili.

Si può concludere che i risultati e i modelli ottenuti sono una buona base di partenza per lo sviluppo e un approfondimento di ricerca in questo settore, ampliando il dataset con fragole di differenti stagioni vegetative e diverse provenienze.

BIBLIOGRAFIA

- Battino M., Scalzo J., Capocasa F., Palandrani A., Mezzetti B., 2004. Fragole e antiossidanti: un primato nutrizionale. *Frutticoltura LXVI* (4): 54-56.
- Blanco, M., Villarroya, I., 2002. NIR spectroscopy, A rapid response analytical tool. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 21, 240–250.
- Capocasa F., Scalzo J., Mezzetti B., Battino M., 2008. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: the role of genotype. *Food Chemistry* 111 (4): 872-878.
- Cayuela J. A., Vidueira J. M., Albi M. A., Gutierrez F., 1997. Influence of the Ecological Cultivation of Strawberries (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) on the quality of the fruit and on Their Capacity for Conservation. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1736-1740.
- Everard, D., P. McDonnell P., Fagan C., 2012 “Prediction of biomass gross calorific values using visible and near infrared spectroscopy”, *Biomass and Bioenergy*
- Faedi W., Baruzzi G., Capriolo G., 2009. Evoluzione della fragola in Italia. *Atti del VII Convegno “La fragola presente e futuro”*, pp.: 32-42
- Feliziani, E., Landi, L., & Romanazzi, G. (2015). Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. *Carbohydrate Polymers*, 132, 111–117.
- Kader A.A., 1988. Influence of preharvest and postharvest environment on nutritional composition of fruits and vegetables. p. 18-32. In: B. Quebedeaux and F.A.Bliss (eds). *Horticulture and human health: contribution of fruits and vegetables*. proc. Of 1st International Symposium on Horticulture and Human health. Prentice – Hall Englewood Cliffs, N.J. Katan J. and J.E. DeVay, 1991. *Soil Solarization*. CRC Press Inc.. Boca Raton, FL, USA, pp.: 267
- Kidmose U., Andersen H., Vang-Petersen O., 1996. Yield and quality attributes of strawberry cultivars grown in Denmark 1990-1991. *Fruit Varieties Journal* 50 (3):160-167.

- Lovati F., Nuzzi M., Avitabile Leva A., De Colellis G., Testoni A., Magnani S., Lucchi P., 2000. Valutazione della qualità delle fragole in post-raccolta. *Frutticoltura*, 12, 36-41.
- Magwaza, L. S., Opara, U. L., Nieuwoudt, H., Cronje, P. J. R., Saeys, W., & Nicolai, B. (2012). NIR Spectroscopy Applications for Internal and External Quality Analysis of Citrus Fruit-A Review. *Food and Bioprocess Technology*, (2), 425–444.
- Mezzetti B., Scalzo J., Capocasa F., Palandrani A., Battino M., 2005. Il miglioramento genetico per aumentare qualità e capacità antiossidante delle fragole. *Frutticoltura*, 4: 26-29
- Morris J.R., Sistrunk W. A., 1991. The Strawberry. p.181-206. In: N.A.M. Eskin (ed.). *Quality and preservation of fruits*. CRC Press
- Nuzzi et al., 2002
- Sansavini S., 2003. I traguardi, le priorità e le prospettive della ricerca italiana in frutticoltura. *Italus Hortus*, 5, 8-28.
- Schwanninger M., Rodrigues J. C., and Fackler K., 2011. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components
- Siedliska, A., Baranowski, P., Zubik, M., Mazurek, W., & Sosnowska, B. (2018). Detection of fungal infections in strawberry fruit by VNIR/SWIR hyperspectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 115–126.
- Silaghi Florina A. (2011) Applicazioni industriali e di ricerca della spettroscopia nir per la valutazione di indici qualitativi di prodotti alimentari (tesi di dottorato)
- Taberelli I., “Spettroscopia nel medio infrarosso quale strumento per il miglioramento genetico del profilo acidico del latte” (tesi di laurea), 2014, Università degli studi di Padova.
- Testoni A., Lovati F., 2004. La qualità delle fragole in rapporto alle aspettative dei consumatori e alle innovazioni di prodotto. *Frutticoltura*, n. 4, pp: 47-53.
- van Kan, J. A. L. Infection Strategies of *Botrytis cinerea*
- Wang S.Y., Camp M.J., 2000. Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. *Scientia Horticulturae* 85: 183-199