



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ NUTRIZIONALE DI
CULTIVAR E SELEZIONI DI FRAGOLA:
APPLICAZIONE E CONFRONTO DI DIVERSE METODOLOGIE

EVALUATION OF THE NUTRITIONAL QUALITY OF STRAWBERRY
CULTIVARS AND SELECTIONS:
APPLICATION AND COMPARISON OF DIFFERENT METHODOLOGIES

TESI SPERIMENTALE

Studente:
ASIA SPADONI

Relatore:
PROF. FRANCO CAPOCASA

Correlatore:
DOTT. LUCA MAZZONI
DOTT. DAVIDE RAFFAELLI

SESSIONE DI LAUREA AUTUNNALE: DICEMBRE 2024
ANNO ACCADEMICO 2023-2024

INDICE

INDICE.....	1
1. Introduzione.....	3
1.1. Scenario attuale nella fragolicoltura	3
1.2. Origine della Fragola	4
1.3. Caratteristiche botaniche	5
1.3.1 Pianta.....	5
1.3.2 Fiore	6
1.3.3 Frutto.....	7
1.4. Classificazione delle cultivar in relazione al fotoperiodo	9
1.4.1. Cultivar brevidiurne unifere	10
1.4.2. Cultivar rifioventi neutrodiurne	10
1.4.3. Cultivar rifioventi longidiurne	10
1.4.4 Esigenze pedoclimatiche.....	10
1.5. Tecniche vivaistiche e materiale di propagazione.....	11
1.5.1. Piante frigo-conservate	12
1.5.2. Piante fresche	13
1.5.3. Piante per produzioni programmate.....	14
1.5.4. Micropropagazione	14
1.6. Coltivazione Fragola e avversità	15
1.6.1. Impianti in suolo.....	15
1.6.2. Impianti fuori suolo	16
1.6.3. Avversità della fragola.....	17
1.7. Raccolta e qualità della fragola	18
1.7.1. Raccolta e Post-raccolta.....	18
1.7.2. Caratteristiche qualitative della fragola	19
1.8. Miglioramento genetico.....	20

1.8.1. Obiettivi del miglioramento genetico su fragola	20
1.8.2 Breeding tradizionale e Breeding innovativo	23
1.8.3. Attività di Breeding su fragola in Italia	26
1.8.4. Costituzione e certificazione varietale	27
2. Obiettivo della tesi	29
3. Materiali e metodi	30
3.1. Campo sperimentale	30
3.2. Cultivar e selezioni	31
3.3. Campionamento dei frutti	33
3.4. Confronto varietale.....	34
3.4.1 Estratto metanolico (Metodo UNIVPM).....	34
3.4.2 Capacità Totale Antiossidante (TAC).....	35
3.4.3 Contenuto Totale di Fenoli (TPH).....	37
3.4.4 Contenuto Totale di Antociani (ACY).....	38
3.5. Estratto metanolico (Metodo UNIBAS)	40
3.6. Analisi statistica	40
4. Risultati e discussione	41
4.1. Risultati del confronto fra genotipi	41
4.1.1 Capacità Antiossidante Trolox Equivalente (TEAC).....	41
4.1.2 Contenuto Totale di Fenoli (TPH)	44
4.1.3 Contenuto Totale di Antociani (ACY)	46
4.2. Confronto tra metodi di estrazione	48
4.2.1 Capacità Antiossidante Trolox Equivalente (TEAC) a confronto tra metodi di estrazione UNIVPM e UNIBAS	48
5. Conclusioni.....	50
6. Bibliografia.....	52
7. Ringraziamenti.....	55

1. Introduzione

1.1. Scenario attuale nella fragolicoltura

Attualmente la fragola è uno tra i frutti più apprezzati dai consumatori dati i numerosi fattori positivi che la distinguono. Le note organolettiche come dolcezza e acidità, in aggiunta alle molecole nutrizionali benefiche rendono il consumo di questo frutto sempre più diffuso. Nel 2021 la produzione mondiale della fragola ha superato i 9 milioni di tonnellate (FAO 2021), di cui oltre un terzo proviene dalla Cina (3.3 tonnellate annue). Gli Stati Uniti d'America sono secondi in termini produttivi 1.2 tonnellate di produzione annua detenendo quindi il 28% della produzione mondiale. L'Italia ha prodotto oltre 117 mila tonnellate raggiungendo la 14° posizione come produttore. L'84% degli impianti complessivi è realizzato in coltura protetta, mentre il restante 16% viene coltivato in campo aperto. Le regioni maggiormente produttive sono Basilicata e Campania che, con oltre 1.000 ettari ciascuna, ricoprono il 50% delle superficie coltivata totale, per un ammontare di oltre 4.100 ettari. Il Sud Italia copre 2.600 ettari, mentre il Nord Italia, con un incremento del 9%, arriva a quasi 1.000 ettari, principalmente concentrati in Piemonte ed Emilia-Romagna. La criticità maggiore nel settore della fragolicoltura italiana riguarda la bassa disponibilità di manodopera e la concorrenza rispetto ad altri paesi extra UE, che hanno costi di produzione più bassi rispetto allo stato italiano. Questo fattore causa una ridotta produzione di fragole in Italia, per cui il mercato interno rappresenta l'unico modo per tutelare il settore della fragolicoltura, non potendo competere con i prezzi di altri paesi. L'aumento della domanda di fragola ha generato una forte richiesta di nuove varietà con lo scopo di soddisfare i consumatori, promuovendo la pianificazione di nuovi programmi di breeding (miglioramento genetico vegetale). I nuovi programmi di breeding, soggetti alle mutevoli richieste del mercato, che richiede varietà apprezzate al palato sempre più esigente dei consumatori, devono anche soddisfare le necessità degli agricoltori, fornendo cultivar con

specifiche caratteristiche: un'adeguata produttività, resistenza all'insorgenza di patogeni, bassa richiesta di acqua e fertilizzanti impiegati (ecc.). Negli ultimi cinque anni, all'Ufficio Comunitario delle Varietà Vegetali (CPVO) sono state depositate più di duecento nuove varietà di fragola (Fruit Journal 2023).

1.2. Origine della Fragola

Nel '500 la fragola non veniva ancora coltivata come specie frutticola. In Europa erano presenti tre specie spontanee di *Fragaria*. La specie *Fragaria vesca* L. (fragolina di bosco), era la più comune e presentava ottime caratteristiche organolettiche ma scarsa produttività. Veniva propagata tramite stoloni e trapiantata dai boschi ai giardini nelle aiuole data la sua fioritura. Gli eventi che hanno influenzato lo sviluppo e l'evoluzione della fragola coltivata ad oggi hanno avuto luogo grazie alla fragola ottoploide cilena *Fragaria chiloensis* L.. Il carattere distintivo di questa specie rispetto alle autoctone europee fu la maggior dimensione dei frutti, infatti questo carattere venne notato da un militare francese che raccolse e conservò alcune di queste piante che divennero i capostipiti della fragolicoltura moderna. Il frutto era meno gustoso di quello della fragola dei boschi. Fino alla metà del '700 la specie fu considerata una curiosità botanica. Il primo ad investire in studio e ricerca su questa specie fu un giovane francese, Antoine Nicolas Duchesne. I suoi studi evidenziarono una singolare scoperta: le piante di fragola potevano avere fiori ermafroditi, ma anche unisessuali.

La seconda scoperta fondamentale che ha portato all'ottenimento della fragola attuale deriva dall'ibridazione casuale, di una specie selvatica ottoploide, *Fragaria virginiana* (proveniente dagli Stati Uniti) e *Fragaria chiloensis* (proveniente dal Cile). L'incrocio è stato reso possibile dalla capacità di *F. chiloensis* di produrre sia fiori ermafroditi che unisessuali. La specie ibrida venne denominata *Fragaria* × *ananassa*, presentava frutti di elevate dimensioni e dai semi vennero originate delle piante su cui venne svolta una selezione dei semenzali più interessanti, permettendo l'individuazione di varietà con migliori caratteristiche qualitative e produttive. Tutte le varietà di fragola coltivate appartengono a questa specie, molto adattabile a diversi ambienti e che presenta numerose caratteristiche positive come pezzatura elevata, colore brillante, aromaticità ed elevato contenuto di molecole antiossidanti in riferimento al frutto, mentre la pianta presenta tolleranza a patogeni, elevata fioritura e resistenza al freddo (Angelini, 2010).

1.3. Caratteristiche botaniche

1.3.1 Pianta

La fragola fa parte della famiglia delle Rosaceae, sottofamiglia Rosoideae, genere *Fragaria*. Al genere appartengono numerose specie, tra cui:

– *Fragaria vesca* (diploide): fragola di bosco, erbacea e perenne. L'altezza è compresa tra i 10-20 cm, con radici rizomatose e stoloni striscianti. Si sviluppa soprattutto nel sottobosco, presenta fiori bianchi, ermafroditi, può essere unifera ma anche rifiorante (*F. vesca semperflorens*). I frutti sono piccoli e rotondeggianti, di colore rosso intenso, molto aromatici.

– *Fragaria moschata* (esaploide): diffusa nel nord e centro Europa. Le piante sono vigorose con fusto tra i 20-40 cm. Le infiorescenze portano fiori grandi che sono unisessuali nelle varietà spontanee ed ermafroditi in quelle coltivate. I frutti presentano un tipico aroma moscato.

– *Fragaria chiloensis* (ottoploide): è originaria del Cile e presenta un carattere distintivo, l'elevata pezzatura. Le piante presentano elevata vigoria e taglia piccola. I fiori sono grandi unisessuali o occasionalmente ermafroditi. Il frutto è grande dal colore rosso scuro con polpa bianca, poco aromatico, rotondeggiante e cuoriforme.

– *Fragaria virginiana* (ottoploide): diffusa nel nord America. Le piante sono alte e stolonifere, raramente rifioranti e neutrodiurna. I fiori sono unisessuali e originano frutti dal colore rosso brillante con elevate qualità organolettiche.

La pianta di fragola è una dicotiledone perenne, erroneamente considerata di tipo erbaceo, presenta un fusto accorciato che corrisponde ad un rizoma più o meno lungo (da pochi cm a 10 cm), contenente tessuti vascolari e con funzione di riserva di sostanze. L'apparato radicale si accresce nei primi 25-30 cm di suolo (nei suoli sabbiosi può arrivare anche a 50 cm), le radici sono fascicolate e svolgono le funzioni di assorbimento e accumulo di sostanze di riserva. Si distinguono in primarie, quando si originano dalla corona, e secondarie che sono ramificazioni delle radici primarie.

Lunghi piccioli portano le foglie che sono composte da tre foglioline di forma ovale, dentate e riunite a rosetta. Sono ricche di stomi che consentono alla pianta di svolgere un'intensa traspirazione. Le gemme si formano all'ascella delle foglie e in base alle ore di luce giornaliere e alle temperature, potranno diventare produttive, originando infiorescenze

oppure stoloni (fusti striscianti sul terreno) dai quali ad ogni nodo si origina una piantina da cui può ripartire un altro stolone. L'insieme delle nuove piantine collegate prende il nome di catena stolonifera. Infatti la fragola viene propagata principalmente per via vegetativa. Lo stolone è costituito da due nodi e internodi, il primo nodo porta una gemma dormiente e il secondo è dotato di una gemma con cellule meristematiche che differenziandosi generano una nuova pianta-clone, in condizioni ambientali favorevoli, altrimenti viene prodotto un nuovo stolone. L'emissione di stoloni avviene in estate dopo la fruttificazione durante la fase vegetativa. Questo metodo di propagazione permette quindi di ottenere piante-cloni dalla pianta madre.

L'habitus vegetativo della pianta può essere assurgente o espanso a seconda del portamento, eretto o prostrato del fogliame, che potrà essere definito rado o folto, in relazione alla densità delle foglie (Hummer and Hancock, 2009).

1.3.2 Fiore

Il fiore della fragola, è perfetto, ed ermafrodita, con alcune eccezioni perché in natura esistono piante con fiori unisessuali. I fiori vengono definiti perfetti (Figura 2) perché costituiti da un calice composto, con cinque o più sepali, da una corolla composta da cinque o più petali di vario colore, ma solitamente bianchi, inoltre sono presenti molti stami (organi maschili) formati da un filamento di lunghezza variabile dove all'apice si trovano le antere che contengono il polline. Il centro del fiore, che viene delimitato dagli stami, è formato dal ricettacolo che presenta i pistilli disposti a spirale (organi femminili), ogni pistillo è composto da un ovario che contiene l'ovulo, da cui, a seguito della fecondazione si originerà l'achenio, chiamato in maniera errata seme. Tutti gli ovari devono essere fecondati per ottenere un buon frutto, senza deformità, per questo motivo nel tempo, sono state selezionate varietà autofertili.

Figura 2: Fiore



La pianta presenta i fiori riuniti in infiorescenze a corimbo che si sviluppano dalla gemma da diversi punti di inserzione a formare i racemi (anche detti grappoli fiorali), con un numero variabile di fiori, da tre a otto, situati su assi con lunghezze differenti. In base al periodo di formazione i fiori si classificano come primari, secondari, terziari e quaternari. Il genotipo e il fotoperiodo determinano il numero e lo sviluppo degli assi. Ogni asse così organizzato presenterà un numero variabile di fiori. Sull'asse primario si forma il fiore primario che darà origine al frutto primario caratterizzato da maggior pezzatura. Dall'asse primario si possono formare due assi secondari che a loro volta andranno a generare fiori secondari, ed in seguito frutti secondari (di pezzatura minore rispetto a quelli primari), su cui si possono formare due assi terziari e così via. Differenti infiorescenze comportano la presenza di frutti a maturazione scalare.

L'impollinazione può essere di tipo entomofilo o anemofilo.

1.3.3 Frutto

Il frutto della fragola è un'infruttescenza (Figura 3). La parte edibile del frutto è data dal falso frutto che deriva dallo sviluppo del ricettacolo che è stato fecondato in precedenza. I veri frutti della fragola sono gli acheni (Figura 4), che sono indeiscenti, in numero variabile da 100 a 300. Per avere un frutto che risponda alle esigenze del mercato, tutti i pistilli devono essere fecondati, in caso contrario si originano frutti deformi.

Figura 3: Infruttescenza



Figura 4: Acheni

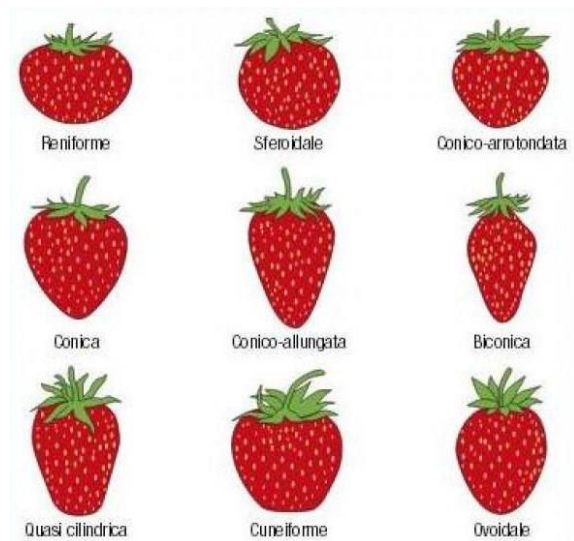


La forma dei frutti (Figura 5) è molto variabile: può essere rotondeggiante (seppur meno ricercata), globosa, conico-globosa, ovoidale, cuneiforme corta e allungata, biconica e infine conico allungata (maggiormente richiesta dal mercato nazionale). Le dimensioni dei frutti dipendono dalla cultivar e dalla classificazione del fiore (tende a decrescere dai fiori primari ai secondari e così via). Inoltre, la pezzatura del frutto è determinata dal numero di ovuli fecondati e dal grado di ingrossamento del ricettacolo. Le esigenze del mercato hanno comportato un aumento della pezzatura dei frutti presenti nella GDO (da 15g a 25g).

Colore e durezza sono due indici di fondamentale importanza per il mercato attuale. Nello specifico, la saturazione del colore fornisce delle indicazioni sul grado di maturazione del frutto; mentre la valutazione della consistenza descrive il grado di suscettibilità del frutto a danni meccanici.

Gli acheni si possono posizionare in modi diversi: acheni immersi nella superficie: tale conformazione rende il frutto più suscettibile al rischio di essere danneggiato; acheni che fuoriescono dalla superficie: causa danni ai frutti vicini e non viene gradito esteticamente; acheni in linea con la superficie: è la conformazione ottimale perché conferisce maggiore resistenza alle manipolazioni.

Figura 5: Forme del frutto: parametro fondamentale, generalmente nel mercato la forma conica allungata risulta maggiormente richiesta, sia dal punto di vista pratico che dal punto di vista estetico.



1.4. Classificazione delle cultivar in relazione al fotoperiodo

La fragola è una pianta perenne a ciclo annuale dove il fotoperiodo e la temperatura ricoprono un ruolo fondamentale nella differenziazione delle gemme e fioritura. Il fotoperiodo consiste nella durata dell'illuminazione diurna e intensità delle radiazioni. Le cultivar di fragola, in base alla loro risposta al fotoperiodo, vengono in genere classificate in:

- Cultivar brevidiurne (short day) o unifere
- Cultivar neutrodiurne (day neutral) o rifiorenti
- Cultivar longidiurne (long day) o rifiorenti

1.4.1. Cultivar brevidiurne unifere

Le cultivar brevidiurne unifere necessitano di un fotoperiodo con meno di 12 ore di luce in una giornata e temperature inferiori a 15-16°C per la fase di induzione-differenziazione a fiore delle gemme. La differenziazione a fiore delle gemme avviene dalla fine di settembre fino a quando le temperature lo consentono. Nel periodo invernale, la pianta entra in fase di quiescenza, dove le attività vegetative sono ridotte al minimo. In primavera, all'aumentare delle temperature, si ha il risveglio vegetativo della pianta, seguita dalla fioritura, con una durata che va da alcune settimane nei climi settentrionali fino a qualche mese nelle zone meridionali. I frutti hanno una maturazione scalare, che va da maggio a giugno.

1.4.2. Cultivar rifioventi neutrodiurne

Le cultivar rifioventi neutrodiurne vengono condizionate solo dalla temperatura e non dal fotoperiodo. Per questo la differenziazione delle gemme durante tutto l'anno, sempre a temperature che permettono l'attività vegetativa della pianta. Sono cultivar rifioventi, perciò la fragola è produttiva in diverse stagioni.

1.4.3. Cultivar rifioventi longidiurne

Per le cultivar longidiurne la differenziazione delle gemme avviene in primavera-estate quando le ore di luce superano le 12 ore, e fruttificano più volte all'anno, dalla primavera all'autunno. La diffusione di queste cultivar è limitata poiché la fioritura che si verifica nel periodo estivo, con temperature elevate, non permette al polline di germinare, questo comporta una mancata allegagione dei frutti. Sono rappresentate da un insieme di cultivar antiche non più coltivate.

1.4.4 Esigenze pedoclimatiche

Per quanto riguarda le esigenze pedoclimatiche la fragola predilige terreni sciolti, ricchi di sostanza organica, soffici, neutri o leggermente acidi (pH tra 5,5 e 7,5 e profondi (>50 cm). La fragola necessita di terreni con una buona disponibilità idrica, rapida capacità di smaltire le acque in eccesso e una adeguata aerazione che eviti asfissia radicale e sviluppo di patogeni. Perciò suoli pesanti, caratterizzati da ristagni e alto contenuto calcareo o sali alcalini sono inadatti alla crescita di questa pianta. La pianta di fragola non ha esigenze climatiche

così limitanti, eccezion fatta per i climi aridi e le temperature elevate. Temperature medie, nello specifico tra i 18-22°C di giorno e 10-13°C di notte. La temperatura minima biologica è di 6°C, mentre valori di temperatura superiori a 30°C causano riduzioni delle produzioni e formazione di frutti deformi. Temperature al di sotto di -12°C (minima letale) possono portare alla morte della pianta, se si verificano durante la fioritura, questa viene danneggiata in maniera irreversibile con temperature al di sotto dello zero, infatti i fiori sono molto sensibili alle basse temperature e alle gelate tardive primaverili, che possono danneggiarli parzialmente o interamente. In Italia la coltivazione di fragola viene eseguita sull'intera penisola, da nord a sud, partendo dal livello del mare fino a diversi livelli di altitudine, anche superiori ai 1.500 metri. La temperatura ha un ruolo importante nella differenziazione a fiore delle gemme¹. Infatti, per passare dalla fase vegetativa alla fase riproduttiva, la fragola necessita di soddisfare il fabbisogno in freddo, e questo varia a seconda della cultivar. Il fabbisogno in freddo corrisponde ad un'esposizione delle gemme, nel periodo invernale, a temperature al di sotto di 7°C. Negli ambienti centro-settentrionali si scelgono cultivar con un fabbisogno in ore di freddo da 800 a 1.000 ore, mentre negli ambienti meridionali si prediligono cultivar con scarso o nullo fabbisogno in freddo.

1.5. Tecniche vivaistiche e materiale di propagazione

Le varietà di fragola coltivate si propagano quasi esclusivamente per via agamica (vegetativa) nei vivai. L'efficienza della propagazione agamica nelle fragole², è legata alla capacità della pianta di produrre stoloni durante la fase vegetativa estiva (maggiormente nelle cultivar unifere). Nei vivai una tecnica utilizzata è quella dell'asportazione dei fiori. La rimozione della parte riproduttiva evita la fruttificazione e questo aumenta notevolmente lo sviluppo di stoloni. La produzione nei vivai del materiale da propagazione inizia nel periodo primaverile. Le piante in suolo, definite *piante madri*, in condizioni di giorno lungo, non differenziano a fiore ma sviluppano stoloni, creando la cosiddetta catena stolonifera. Ogni nodo dello stolone, a contatto con il terreno, darà origine ad una nuova pianta radicata. Una

¹ La differenziazione a fiore permette la formazione degli apparati fiorali, con sviluppo degli organi riproduttivi.

² La riproduzione agamica: è utilizzata esclusivamente in vivaio tradizionale in cui vengono coltivate piante madri per la produzione di stoloni. La riproduzione gamica viene utilizzata per il miglioramento genetico.

pianta madre può produrre 60/70 fino addirittura a 100 piante figlie. Il processo di stolonizzazione può essere accentuato, aumentando l'attività vegetativa della pianta madre, tramite: rimozione di fiori ed esposizione della pianta a ore di luce e temperature inadatte alla differenziazione. Queste tecniche sono efficienti solo con le cultivar di fragole unifere brevidiurne, riscontrando variabilità per le cultivar longidiurne. Una volta ottenuti i campi di piante madri con le rispettive catene stolonifere di una data cultivar di fragola, si procede alla raccolta. Il materiale ottenuto si suddivide in due tipologie: piante frigo-conservate e piante fresche.

1.5.1. Piante frigo-conservate

Tali piante si ottengono dalla coltivazione delle fragole che in seguito vengono conservate a basse temperature con opportuni monitoraggi, tra -1° e -2°C . Le piante frigo-conservate presentano il vantaggio di poter utilizzare il materiale vegetale in qualsiasi momento dell'anno. Una volta ottenuta la pianta, essa viene selezionata da un operatore in relazione al diametro del germoglio. Grazie a questo parametro è possibile determinare quali piante hanno maggiori sostanze di riserva e che quindi sviluppano in minor tempo. Nonostante gli elevati pregi delle piante frigo, permane la problematica degli elevati costi di produzione (Vomturmhaus, 2023.). Le piante vengono classificate in varie categorie:

- Piante frigo tipo A++ (o extra): comprendono varietà di fragola con diametri del colletto superiori ai 15 mm. Prodotte solo da alcuni vivai.
- Piante frigo tipo A+: sono piante con i diametri minori rispetto alle A++, compresi tra 12-14.9 mm. L'ottenimento di tali piante necessita di particolare accortezza nel campo di piante madri, che devono avere una densità minore. Per diradare le piantine si procede con una rimozione delle piante madri nel periodo estivo per permettere una crescita migliore con minor competizione delle piante figlie. Sono conservate con una rosetta di foglie, in confezioni da 250-300 piante per cassa.
- Piante frigo tipo A: rappresentano il tipo di pianta più diffusa e utilizzata. Il diametro del colletto è compreso tra 8 e 11,9 mm. Il confezionamento avviene in cassette contenenti da 500-800 piantine, raggruppati in mazze.
- Piante frigo tipo A-: piante generalmente non commercializzate che presentano diametri compresi tra 6-8 mm. Il confezionamento avviene in cassette con 900-1.000 piante.

I vantaggi dell'utilizzo delle piante frigo-conservate comprendono:

- La possibilità di poter coltivare in ogni periodo dell'anno;
- Dimensione del materiale vegetale relativamente compatto e con eccellenti capacità adattive, che permette una coltivazione in quasi tutte le condizioni;
- Riduzione o assenza di cambiamenti nei bioritmi nella fase di conservazione delle piantine;
- Maggiore tolleranza alla siccità.

1.5.2. Piante fresche

Le piante fresche vengono ottenute in vivaio con lo scopo di permettere a regioni calde come Spagna o Sud Italia di avere una produzione precoce e costante. Lo svantaggio delle piante fresche è legato alla coltivazione, data l'elevata percentuale di fallanze riscontrate già dopo le prime fasi del trapianto stesso. Difatti, i brevi tempi che intercorrono tra l'estirpazione della pianta e la messa a dimora non permettono un adeguato attecchimento di quest'ultime.

Questa categoria comprende:

- Piante fresche cima radicata: ottenute in vivai, e fatte sviluppare in contenitori forati. Queste piante necessitano di circa 21 giorni per sviluppare una pianta con un apparato radicale ben sviluppato.
- Piante fresche a radice nuda: ottenute anch'esse in vivai. Le piante subiscono una differenziazione relativa al calibro del colletto e possono essere commercializzate fogliate o defogliate.

I vantaggi della pianta fresca, paragonata alla frigo-conservata, sono:

- Maggiore precocità di maturazione;
- Maggiore qualità dei frutti;
- Possibilità di piantagioni anche in areali temperato-caldi.

1.5.3. Piante per produzioni programmate

Tray plants

Sono piantine fatte crescere in vaso su un substrato di torba, utilizzando piante fresche con cime radicate. Lo sviluppo viene favorito da opportune irrigazioni e fertirrigazioni. In inverno le tray plant, nel pieno del riposo vegetativo, vengono messe in frigoconservazione insieme al substrato (pane di terra) con presenza di foglie centrali per una durata di 12 mesi. Questo tipo di pianta ha un costo relativamente elevato e viene quasi esclusivamente utilizzata in colture fuori suolo, garantendo una buona produzione con frutti di elevata qualità.

Waiting bed plant

Le waiting bed plants sono piante ingrossate, prodotte in appositi letti d'attesa a partire da piante frigo-conservate, generalmente del tipo A-, ma anche piante con cima radicata. La costituzione dei letti d'attesa si effettua nel periodo estivo, i contenitori vengono definiti, d'attesa poiché il principale scopo è quello di ottenere un ingrossamento della pianta di partenza con un ulteriore ciclo vegetativo. Questo doppio ciclo vegetativo permette lo sviluppo di maggiori sostanze di riserva che si traduce in un miglior attecchimento e produzione. La selezione delle piantine si effettua in base al numero di germogli presenti al momento dell'estirpazione. In seguito, si procede alla frigo-conservazione (presentano 2-3 germogli già differenziati). Queste ultime rispetto alle piante solo frigo-conservate determinano una maggiore produzione, ma di minor qualità. L'utilizzo di quest'ultime è principalmente adatto per colture programmate.

1.5.4. Micropropagazione

La micropropagazione è una tecnica di propagazione in vitro, eseguita in laboratorio. Il procedimento consiste in un prelievo delle gemme dalla pianta madre, che si ottengono dalle catene stolonifere. Una volta prelevate, le gemme vengono trasferite da un ambiente esterno sfavorevole ad uno più confortevole, su un terreno di proliferazione, preparato in laboratorio, che contiene i micro e i macronutrienti necessari alla sopravvivenza e moltiplicazione della pianta. Questa tecnica permette di partire da una o poche gemme e ottenere un numero abbastanza elevato di germogli. Nei paesi dell'UE, ci sono normative per quanto riguarda la propagazione vivaistica delle fragole che regolamenta l'utilizzo della micropropagazione esclusivamente per riprodurre e recuperare materiale infetto da virus. Questo limite è stato imposto per problemi legati alla stabilità genotipica e fenotipica osservata in piante micro-

propagate di alcune cultivar di fragole. Inoltre, un altro limite è dato dal costo elevato di tale tecnica. Negli ultimi anni, con il miglioramento delle tecniche e l'utilizzo di varietà più stabili dal punto di vista genetico è stato possibile migliorare la micropropagazione nel vivaismo della fragola. In particolare, è stato realizzato uno studio che ha permesso di far luce sull'utilizzo delle piante micro-propagate. Tali piante utilizzate come madri, hanno permesso una produzione vivaistica di piante frigo-conservate a partire da piante madri micro-propagate. Questo sistema offre un'alternativa per l'ottenimento di piante di qualità in vivaio (FreshPlaza, 2023).

1.6. Coltivazione Fragola e avversità

La coltivazione delle fragole è possibile in: impianti in suolo e impianti fuori suolo. La scelta dell'uno o dell'altro è legata esclusivamente al produttore, in relazione anche ad altri fattori come la disponibilità delle acque e dei nutrienti, la superficie disponibile, le tipologie di mercati e infine la possibilità di investimento stesso.

1.6.1. Impianti in suolo

Negli impianti in suolo la preparazione del terreno è la prima operazione da effettuare per la costituzione dell'impianto. La preparazione ha il principale scopo di affinare il terreno stesso, permettendo lo sviluppo dell'esile apparato radicale ed evitare la formazione di ristagni che in genere portano allo sviluppo di malattie fungine e problemi di asfissia. Viene effettuata a fine luglio per piante frigo-conservate, invece le piante a cime radicate vengono piantate nella prima decade di agosto, poiché lo sviluppo risulta essere più rapido³. La scelta di questa forma di impianto necessita la realizzazione di baulature (terreno rialzato) e pacciamatura. La pacciamatura si realizza con film plastico generalmente nero ma sono reperibili teli di colore diverso in base alle esigenze dell'operatore e dai costi. Lo scopo della pacciamatura è quello di evitare o almeno ridurre lo sviluppo di infestanti e non permettere il contatto dei frutti con il terreno, perché in caso contrario, i frutti andrebbero incontro a marcescenza. Generalmente si realizzano file binate con sesto 30-35 cm x 35-40 cm, densità

³ Le piante frigo-conservate necessitano un corretto sviluppo di un determinato numero di germogli. La fine di luglio risulta un periodo ottimale per un adeguato sviluppo di quest'ultimi. Anticipi nell'impianto portano ad un numero elevato di germogli, un ritardo genera un numero ridotto.

d'impianto 50-55.000 piante per ha. L'interfila (spazio tra le baule) deve essere anch'essa pacciamata per evitare, a seguito di eventi piovosi, di imbrattare i frutti e generare marcescenza di questi ultimi. È necessario un impianto di irrigazione a manichette forate. Gli impianti in suolo rappresentano il 70% delle coltivazioni di Marche e Emilia-Romagna, ove le cultivar più utilizzate sono le varietà unifere. La raccolta avviene nella prima decade di maggio fino alla prima decade di giugno. Un limite della coltivazione in suolo è la necessità di ricorrere a rotazione ampia. Si deve evitare quindi la mono-succezione di fragola, che altrimenti genera il fenomeno di stanchezza, comportando minor sviluppo e produzione di piante, oltre che maggiore suscettibilità delle piante alle diverse avversità. Per risolvere questo problema in passato si effettuava la sterilizzazione del terreno attraverso la pratica della Bromurazione⁴, ad oggi vietata e sostituita con altri prodotti o come avviene in colture biologiche con la solarizzazione.

1.6.2. Impianti fuori suolo

Il fuori suolo è una tecnica che è stata sviluppata circa 40 anni fa, basata sulla coltivazione della fragola in substrati fuori dal terreno. Questa tecnica ha in parte permesso la risoluzione dei problemi legati alla necessità di effettuare rotazioni ampie (4-5 anni), nella fragolicoltura. Vengono utilizzati appositi impianti di sistemi rialzati dal terreno dove vengono coltivate le piante attraverso dei contenitori o sacchi di substrato di crescita (torba, perlite ecc.), muniti di sistema di fertirrigazione, e protetti in tunnel o serre.

I vantaggi dell'adozione di un sistema in fuori-suolo sono:

- Elevate densità di impianto (>90.000 piante per ha);
- La facilitazione della gestione e raccolta dei frutti;
- La riduzione dell'utilizzo di fitofarmaci.

Gli svantaggi sono legati a due principali fattori:

- costi onerosi per la costituzione dell'impianto, che si aggirano intorno ai 100.000 € all'ettaro;

⁴ Il processo di bromurazione consiste nell'utilizzo del Bromuro di metile come fumigante dei terreni. Processo vietato dall'Unione Europea dal 2005, a causa di problemi di irritazione e accumulo dello ione bromuro negli ortaggi (Cadirlab).

- Sviluppo di frutti deformati⁵.

La coltura protetta è adottata sia in colture in suolo che in fuori suolo. Negli ultimi decenni in Italia le strutture di protezione relative alla fragolicoltura sono aumentate notevolmente. Esse sono generalmente serre o tunnel (singoli o doppi). Lo scopo principale di queste strutture è la protezione delle colture per evitare danni da grandine e ulteriori danni legati a ritorni di freddo e scottature. Inoltre, la coltura protetta permette di avere un anticipo nella raccolta (si può anticipare la raccolta anche di 15-20 giorni). In relazione all'area in cui ci troviamo si decide quale sistema di protezione utilizzare.

1.6.3. Avversità della fragola

Le avversità della fragola, come per le altre colture, causano danni di entità variabile a seconda del grado di attacco di un determinato patogeno. In relazione a questo si riscontrano diverse avversità che colpiscono la fragola: malattie fungine, batteriosi e danni legati all'attività di diversi insetti.

- **Le malattie fungine:** causano marciumi dei frutti e sono maggiormente frequenti in colture in suolo dovuti ad elevate precipitazioni durante il periodo della fioritura e della raccolta. Il principale fenomeno che si riscontra su fragole è lo sviluppo di Botrite o muffa grigia (*Botrytis cinerea*), fungo che colpisce la maggior parte degli organi della pianta, penetrando attraverso ferite. I principali danni si hanno sulla fruttificazione, dove si nota uno sviluppo di marciume molle che nel lungo periodo porta all'avvizzimento del frutto. La diffusione può essere limitata, rimuovendo le parti infette della pianta. L'Oidio (*Oidium fragariae*), è un fungo che arreca danni alla pianta, limitando lo sviluppo vegetativo, colpendo principalmente foglie e fiori, ma anche frutti. Quest'ultimo si sviluppa maggiormente in colture protette, come tunnel, dove le temperature più elevate. Per evitare lo sviluppo di tale patogeno, risulta fondamentale l'aerazione nelle strutture protettive.

-**Batteriosi:** ad opera di alcune specie batteriche. Il seccume fogliare della fragola (*Xanthomonas aroricola*), è una batteriosi che determina nelle foglie lo sviluppo di

⁵Il problema principale delle colture protette per le fragole, è lo sviluppo di frutti deformati, dovuto ad una non ottimale impollinazione e successiva fecondazione dei pistilli. Ciò è dovuto a sbalzi termici, scarso arieggiamento, scarsa presenza di insetti pronubi, scarsa umidità nell'ambiente (non permette la germinazione del polline).

macchie di colore rosso-bruno, che in seguito vanno incontro a necrosi. I sintomi si manifestano in tarda estate, con alte temperature ed elevata umidità.

-Insetti: le avversità legate all'attività degli insetti risultano essere molteplici, ed è strettamente collegata al numero di individui presenti all'interno di una popolazione. In base a questo, varierà l'intensità degli attacchi. I principali insetti, che vanno ad attaccare tale coltura sono gli afidi, il raghetto rosso (*Tetranychus urticae*) e tripide (*Frankliniella occidentalis*). Gli afidi colpiscono maggiormente le colture protette. Al contrario hanno una minore intensità nelle colture in campo. Colpiscono principalmente le foglie, succhiandone la linfa e determinando un arricciamento delle foglie. Un sistema di controllo è legato al lancio di insetti antagonisti. Il raghetto rosso, è un acaro che colpisce le foglie determinando la formazione di macchie chiare sulla pagina superiore delle foglie, che in seguito disseccano. Il sistema di controllo è dato sempre dall'utilizzo di insetti antagonisti. I tripidi generano danni inferiori alle foglie, ma colpiscono principalmente fiori (nutrendosi di polline e portando ad avere aborti fiorali) e frutti, deformandoli.

1.7. Raccolta e qualità della fragola

1.7.1. Raccolta e Post-raccolta

Nella fragolicoltura, la raccolta dei frutti è una fase particolarmente delicata, impegnativa ed influenzata dal tipo di mercato che l'azienda vuole coprire. La raccolta si divide in manuale e meccanica.

-Raccolta manuale: effettuata in più passaggi, generalmente si procede prima alla rimozione di frutti non idonei (deformati, marci, eccessivamente piccoli) e alla pulizia della pianta. Per la raccolta delle fragole in campo si sfruttano agevolatori per la raccolta (simili a biciclette), presentano vari contenitori per la suddivisione dei frutti idonei da quelli non idonei. In campo, oltre alla raccolta in se, si effettua una selezione, con la preparazione diretta dei packaging. La produttività del lavoro per la raccolta manuale delle fragole ad ora è pari a 15-20 kg per operaio. In colture fuori suolo il lavoro è agevolato dalle strutture che mantengono l'impianto rialzato, riducendo i tempi.

-Raccolta meccanica: è un'alternativa alla raccolta manuale ma è limitata dal costo. Le macchine sono utilizzabili in pieno campo. Queste ultime presentano un sistema di telecamere ad alta risoluzione che tramite un software analizza i frutti in campo al giusto grado di maturazione, per poi garantire la raccolta attraverso bracci robotici. I due principali

svantaggi di tale sistema sono rappresentati dal costo e dalla mancata capacità della macchina di raccogliere tutti i frutti maturi.

Il controllo e la selezione del prodotto vengono fatti direttamente in campo e si vanno poi a costituire cestini pronti alla vendita che possono essere ritirati dalle cooperative. I packaging utilizzati hanno pesi variabili (125, 250, 500 grammi), sono rappresentati da cestini chiusi e coperti da film plastico forato (evita la formazione di condensa).

Il grado di maturazione della fragola, come per altri frutti, è un aspetto legato al tipo di mercato che l'azienda intende garantire. Nel consumo fresco, che può avvenire con una vendita diretta in azienda, i frutti vengono raccolti a maturazione commerciale⁶, garantendo un prodotto fresco e di qualità maggiore che permette di ottenere prezzi migliori. In genere, la raccolta delle fragole per la vendita a cooperative deve essere anticipata di qualche giorno per permettere la conservazione, la lavorazione e il packaging. Questo permette di mantenere la shelf life del prodotto, dalla raccolta alla vendita negli scaffali dei negozi. Per determinare il grado di maturazione è fondamentale seguire diversi indici, fisici e chimici (riportati in *Tabella 1*).

1.7.2. Caratteristiche qualitative della fragola

La qualità di un frutto è data dall'insieme delle proprietà e caratteristiche di un determinato prodotto, capaci di soddisfare esigenze del cliente o delle parti interessate. Nel complesso, la qualità della fragola non è limitata esclusivamente al consumatore ma può essere anche legata al produttore stesso. Difatti la qualità per il produttore è rappresentata dall'insieme di caratteristiche, quali resa della cultivar e suscettibilità a patogeni, resistenza del frutto alla manipolazione. Dal punto di vista del consumatore, un frutto di qualità, oltre ad avere un bell'aspetto in termini di colore e pezzatura, è caratterizzato anche da una shelf-life più lunga, un sapore migliore ed un'elevata qualità nutrizionale. Questo permette di definire nel complesso varie tipologie di qualità:

-Qualità commerciale: pezzatura, colorazione, resistenza a manipolazioni e conservazione;

-Qualità sanitaria: prodotto senza residui chimici;

-Qualità nutrizionale: composizione chimica del prodotto;

⁶ Maturazione commerciale: rappresenta un lasso temporale, che varia nelle diverse cultivar di fragola, entro il quale è possibile effettuare la raccolta in relazione alla destinazione del prodotto.

-Qualità sensoriale: grado di soddisfazione del consumatore (soggettiva).

Le caratteristiche qualitative e nutrizionali delle fragole sono dovute al genotipo, e di conseguenza al continuo lavoro di breeding per ottenere materiale sempre migliore. Altri fattori che incidono sulla qualità finale del prodotto, sono rappresentate dal sistema di coltivazione, dalle caratteristiche pedo-climatiche, necessariamente specifiche per la cultivar allevata, all'esperienza del produttore.

1.8. Miglioramento genetico

Grazie al miglioramento genetico sono state ottenute varietà di fragole coltivate ad oggi in Italia e nel mondo. Questo processo ha avuto inizio nei primi anni del '700, con l'ibridazione tra *Fragaria chilonensis* e *Fragaria virginiana*, da cui è stato ottenuto l'ibrido *Fragaria x ananassa*, la fragola che noi tutti oggi conosciamo. Da questo ibrido, tramite l'attività di breeding sono state ottenute le nuove varietà presenti oggi sul mercato. Questo è un processo, che nonostante le innumerevoli varietà già presenti, è in continua evoluzione con la finalità di avere nuove cultivar con caratteristiche migliori, che vadano a rispondere alle necessità dei produttori e consumatori (Plantgest, 2023.). Il miglioramento genetico consiste nel processo di selezione dei caratteri migliori da diversi individui, in modo da programmare incroci specifici, tali da ottenere generazioni con tali caratteristiche.

1.8.1. Obiettivi del miglioramento genetico su fragola

Produzione

Il miglioramento genetico su fragola è volto a raggiungere diversi obiettivi legati a caratteri produttivi, quali produzione, pezzatura, forma del frutto, ma anche vegetativi, come il vigore delle piante, il fiore perfetto, rusticità e resistenza ad avversità.

La produzione, intesa come maggiore resa è uno degli obiettivi dell'attività di miglioramento genetico su fragola. In passato, fino alla metà degli anni 80, la produzione maggiore aveva importanza fondamentale, e l'attività di breeding era fortemente orientata alla selezione di varietà con elevate produzioni. Il concetto di qualità era solamente legato all'aspetto esteriore del frutto e alla pezzatura. Tra le varie caratteristiche esteriori del frutto troviamo la regolarità morfologica della fragola, che viene erroneamente utilizzata dal consumatore come parametro qualitativo del frutto. L'idea di base è che un frutto con caratteristiche morfologiche diverse dalla regolarità, viene interpretato come una merce non idonea e qualitativamente inferiore.

I processi di selezione hanno portato ad un netto aumento di dimensioni con un corrispettivo aumento di peso passando da 15 grammi fino a 25-30 grammi per frutto. Questo ha determinato un migliore aspetto del frutto, ma è un carattere importante anche in relazione alla raccolta, ha comportato una raccolta più semplice e veloce.

- **La rusticità** è uno degli obiettivi principali nel miglioramento genetico delle fragole, ed è un carattere strettamente legato alla forte limitazione della sterilizzazione del suolo, a causa di revoche di determinati prodotti chimici e condizioni climatiche sempre più ostili. Risulta quindi un carattere molto ricercato. A ciò si aggiunge l'obiettivo di ottenere genotipi più adattabili a bassi apporti idrici.

Un limite sicuramente presente nella fragolicoltura riguarda la gestione della manodopera. La riduzione di personale per la raccolta genera una crisi durante le fasi di fruttificazione. La raccolta, che deve essere fatta in maniera attenta, inoltre, risulta molto scalare, determinando così un altro obiettivo nel miglioramento genetico, quello di avere cultivar con una minore scalarità di produzione, concentrando la resa della raccolta in un numero minore di interventi. Inoltre, si cerca di migliorare la tenuta dei frutti sulla pianta.

Qualità

- **Colore** del frutto. Nell'aspetto esteriore del frutto risultano importanti anche il colore e la brillantezza. Il colore maggiormente apprezzato varia in base al paese di commercializzazione della fragola, in genere in Italia si gradiscono maggiormente frutti con colore rosso vivo e che presentano elevata brillantezza.

- **La consistenza della polpa** è un carattere relativamente importante, che ha ottenuto risultati significativi. La consistenza della polpa della fragola, è strettamente correlata alla possibilità di prolungare la shelf-life, garantendo l'integrità del prodotto, a partire dalla raccolta fino alla vendita in negozio e alla tavola del consumatore. Il miglioramento del carattere della consistenza, però, ha portato ad una diminuzione di aroma e sapore. Tali caratteristiche in alcuni paesi risultano essere secondari, dando maggiore importanza alla produzione stessa e all'aspetto esteriore. Questa tendenza nel miglioramento genetico, maggiormente volta alla produzione, negli ultimi anni ha dovuto far fronte alle necessità legate ai gusti dei consumatori, motivo per cui, la bontà dei frutti intesa come dolcezza,

aromaticità e anche caratteristiche nutrizionali sono fra i caratteri maggiormente ricercati in attività di miglioramento genetico. Attualmente i mercati cercano frutti con aromi intensi e sapore dolce. L'attività di breeding nel migliorare le qualità organolettiche delle fragole, genera un ostacolo alla produttività. In genere, cultivar con produzioni elevate, presentano frutti con concentrazione di zuccheri minore. Questo è un ostacolo importante che si cerca di superare o ridurre con l'attività di breeding. Dal punto di vista nutrizionale, il mercato si sta orientando su selezione di frutti con una maggiore concentrazione di antiossidanti e alcune vitamine, tra le principali è presente la vitamina C, visti i benefici che determinano sulla salute dei consumatori.

- **Qualità organolettica e nutrizionale.** Nel frutto la concentrazione di zuccheri è rappresentata per lo più da fruttosio, (oltre il 50% degli zuccheri totali). In misura minore invece sono presenti acidi grassi essenziali, principalmente presenti nei semi che sono ricchi di acidi grassi insaturi (oltre il 95% è rappresentato dai monoinsaturi o MUFA) (U.S. Department of Agriculture, 2010). Inoltre la fragola è caratterizzata da elevato contenuto di vitamina C che ha un importante ruolo per la qualità nutrizionale. Oltre alla presenza di vitamina C, anche l'alta concentrazione di folati definisce la qualità nutrizionale. Sono presenti, in minore misura altre vitamine, come la tiamina (B1), la riboflavina (B2), la niacina (B3), la vitamina B6, la vitamina K, la vitamina A e la vitamina E. Fanno parte della composizione del frutto anche dei composti fitochimici detti "non-nutrizionali", rappresentati in particolar modo dalla classe dei polifenoli. Quelli maggiormente presenti nella fragola sono i flavonoidi (principalmente antocianine, in minor quantità flavonoli e flavanoli), seguiti dai tannini idrolizzabili (ellagitannini e gallotannini) e da costituenti minori come gli acidi fenolici (acido idrossibenzoico e idrossicinnamico) e i tannini condensati (proantocianidine).

La capacità antiossidante dei frutti è un parametro fondamentale per la descrizione della loro qualità nutrizionale, ed indicatore della presenza di sostanze bioattive, come la vitamina C e i composti fenolici. In particolare, le fragole hanno una capacità antiossidante molto maggiore rispetto a molti frutti. I risultati ottenuti da analisi TAC (Total Antioxidant Capacity) di un frutto

dipendono dal contributo che ogni singolo composto fitochimico è in grado di apportare.

Grazie ad uno studio effettuato da Tulipani et al. (2008a), è stato dimostrato che la vitamina C è uno dei principali antiossidanti presenti nella fragola ed è responsabile da sola per più del 30% della TAC degli estratti analizzati, seguita dalle antocianine (che contribuiscono per il 25-40% alla TAC) e infine da altri composti come i derivati dell'acido ellagico e i flavonoli.

1.8.2 Breeding tradizionale e Breeding innovativo

La totalità di cultivar di fragole disponibili sul mercato, sono state prodotte utilizzando programmi di breeding tradizionali, rappresentati da incrocio e selezione. Tuttavia, nell'ultimo decennio sono stati proposti diversi progetti riguardanti l'applicazione delle biotecnologie genomiche di precisione per il miglioramento genetico su fragola.

Nel breeding tradizionale, i metodi maggiormente utilizzati sono incroci intra-specifici e inter-specifici. La scelta dell'uno o dell'altro è legata agli obiettivi finali che si vogliono ottenere.

- **Incrocio intra-specifico**: è un incrocio tra piante di varietà diverse o selezioni che appartengono alla medesima specie, questo permette di combinare caratteri presenti nelle due cultivar o selezioni, per l'ottenimento di un unico genotipo, grazie ad un accurato selezionamento si scelgono le cultivar adatte. Il programma di incrocio segue uno schema di ricombinazione, in cui si riconoscono determinati genotipi che siano interessanti per determinati caratteri.

Il genotipo ottenuto dall'incrocio viene poi selezionato nei semenzali, sulla base di parametri, vegetativi, produttivi e qualitativi. Gli ibridi che superano le valutazioni primarie vengono classificati come selezioni e seguiranno processi di moltiplicazione e nuove valutazioni. Le selezioni verranno comparate con varietà di riferimento. Una volta determinati i caratteri di pregio, le selezioni saranno diffuse come nuove cultivar. Rappresenta la metodologia migliore per ottenere un numero elevato di cultivar.

- **Incrocio Inter-specifico**: incrocio di piante appartenenti a specie diverse, utilizzata per l'ottenimento di caratteri non presenti nella specie *Fragaria x ananassa*, ma presenti in altri genotipi di specie diverse. Processo più lungo e difficoltoso per l'ottenimento di nuove cultivar. Il trasferimento di caratteri può portare ad ibridi

relativamente molto diversi tra loro, con caratteristiche produttive e qualitative differenti.

Nel Breeding innovativo, le conoscenze sviluppate dagli studi genomici, risultano fondamentali per l'applicazione di nuove biotecnologie di breeding che permettono di ottenere nuove cultivar di fragole (Rivistafrutticoltura.edagricole, 2019):

- **Breeding assistito**: è un metodo di breeding, che determina l'utilizzo di marcatori (MAB), legati a diversi caratteri, utile per determinare l'identità dei cloni. Questo metodo però, risulta limitato nella fragola, in quanto non sono presenti marcatori facilmente valutabili. Sono presenti, comunque, marcatori associati alla resistenza ad alcuni patogeni della fragola come Phytophthora. Un altro problema è il costo nettamente superiore a processi di breeding tradizionale che ne limita di molto l'utilizzo. Nonostante questo, la possibilità di identificare nuovi marcatori legati a caratteri specifici e di interesse e una riduzione dei costi potrebbe rendere tale metodo di breeding vantaggioso.

- **New Breeding Technologies (NBTs)**: L'ingegneria genetica è stata applicata in fragola dimostrando come tale approccio può migliorare caratteri importanti della pianta stessa ma anche del frutto. L'unico fattore che limita questa tecnologia resta l'accettazione pubblica. Gli strumenti biotecnologici innovativi sono: cisgenesi/intragenesi, genome editing e silenziamento genico.

- **Cisgenesi/intragenesi**: si utilizzano geni (o loro sequenze) della stessa specie o specie sessualmente affini, che possono essere utilizzati per il miglioramento di colture agrarie. I geni cisgenici (sequenze di geni isolati dalla stessa specie) o intragenici (sequenze di geni isolati da una specie compatibile), sono particolari geni che vanno a sostituire geni di resistenza ad antibiotici o erbicidi. Questo determina generazioni di piante migliorate solo nei tratti desiderati con sequenze geniche della stessa specie. Queste tecnologie sono fortemente condizionate dalla conoscenza delle funzioni che determinano i geni e loro sequenze regolative. Sulla fragola sono stati evidenziati diversi caratteri, poi migliorati con questa tecnica

- **Genome editing**: è una metodologia che rende possibile la manipolazione di ogni gene della pianta. Ciò permette integrazioni, rimozione e mutazione del gene di interesse. Questo processo si basa su una tecnica che permette il taglio della doppia elica di DNA in un punto preciso che genera nel gene bersaglio, delle mutazioni specifiche. Questa tecnica viene chiamata CRISPR/Cas9. Questo metodo nelle piante di fragola è stato testato per il gene omeotico che controlla il differenziamento a fiore. Le linee di

fragola prese in esame e sottoposte al CRISP, presentano difetti nello sviluppo di stami e frutti. Con il genome editing si sono ottenute mutazioni favorevoli per questi difetti, che sono risultate stabili anche in piante clone ottenute per propagazione vegetativa con stolone. Il limite di tale metodologia è la ridotta disponibilità di protocolli efficienti di rigenerazione, selezione e trasformazione da applicare alle varietà di fragole prese in esame.

- **RNAi e silenziamento genico:** nel campo della fragolicoltura tale tecnica permette la creazione di nuove varietà resistenti a diverse malattie. Alla base di questa tecnica è presente un cross-kingdom, ovvero uno scambio di piccole molecole di RNAi dalla pianta al patogeno, permettendo una maggiore difesa dai parassiti. Una nuova pianta modificata con HIGS (host-induced gene silencing), determina il silenziamento di geni del patogeno o parassita che si traduce con una resistenza stabile da parte della pianta al patogeno o parassita preso in esame. Questa pianta ottenuta risulta essere un OGM (direttiva 2001/18 Ce) diverso dai tradizionali⁷. Difatti, presentando solo molecole di RNAi non esprimendo proteine ed enzimi. Per quanto riguarda le fragole, è stata dimostrata l'efficacia di tale tecnologia per indurre resistenza a insetti come *Drosophila suzuki*. Inoltre, l'efficacia delle sequenze di RNAi ha consentito anche il controllo di infezioni di *Botrytis* e *Verticillium*.

7 Direttiva 2001/18 Ce: definisce un OGM “un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale”.

⁷ Direttiva 2001/18 Ce: definisce un OGM “un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale”.

1.8.3. Attività di Breeding su fragola in Italia

Le prime attività di miglioramento genetico in Italia ebbero inizio in Emilia-Romagna a partire dalla seconda metà degli anni 60. L'obiettivo principale era quello di sostituire varietà estere non idonee dal punto di vista produttivo, con nuove varietà. Attualmente sono presenti molti programmi che hanno come obiettivo il miglioramento delle varietà standard nelle regioni interessate alla fragolicoltura.

In queste attività si ricercano varietà unifere a basso fabbisogno di freddo che risultano adatte alle zone meridionali, mentre, per gli ambienti settentrionali si ricercano delle varietà unifere ma con elevato fabbisogno di freddo invernale (sono indicate delle varietà rifioventi che possono garantire il raccolto in più periodi dell'anno e maggiori caratteristiche qualitative e produttive).

I principali enti specializzati in miglioramento genetico e selezione di cultivar in Italia sono: D3A-UNIVPM, CIV, Berry Lab, Nova Siri Genetics.

- **D3A-UNIVPM:** il dipartimento di Scienze Agrarie dell'Università Politecnica delle Marche, ha avviato il programma di miglioramento genetico su fragola nel 1993 dal Prof. Pasquale Rosati. Questo programma ha portato sul mercato diverse cultivar importanti come Lauretta, Cristina, Romina, Sveva e Silvia, che non si sono limitate ad una diffusione solo nazionale ma anche europea e extra europea. Alla base del programma di miglioramento genetico si prevede l'utilizzo di incroci intra-specifici, tra varietà coltivate e germoplasma, ma anche incroci interspecifici con specie selvatiche, che prevede lunghi programmi di rincrocio. L'obiettivo è quello di ottenere nuove varietà con elevata qualità nutrizionale e sensoriali, con resilienza e che si adattano bene agli ambienti temperato-freddi. Recentemente si è avviato un programma di miglioramento genetico per la selezione di cultivar adatte ad ambienti temperati-caldi e subtropicale. La selezione viene fatta partendo da piante frigo-conservate e cime radicate, coltivate in campo, non fumigato con una rotazione di 3 anni. Sono particolari condizioni che permettono la selezione di piante con elevata rusticità. In seguito, si procede con verifiche sperimentali in diverse stazioni europee, per il rilascio di nuove varietà (Mezzetti, B., e Capocasa, F., 2021).

- **CIV:** Consorzio Italiano Vivaisti, da diversi anni si occupa di breeding su Fragola. Il programma di miglioramento genetico è basato su incrocio e valutazione dei semenzali in condizioni di pieno campo e artificiali. L'obiettivo per la fragola è la costituzione di varietà ad alto fabbisogno di freddo, sia unifere che rifioventi, con elevata resistenza a diverse

patologie ed elevata qualità. Tali caratteristiche hanno permesso la diffusione di diverse cultivar in oltre 60 Paesi. (Edagricol, 2019.).

- **Berry Lab**: ha iniziato il progetto “Med-Berry” su fragola, nel maggio del 2019, è una cooperazione tra diversi Paesi tra cui, Italia, Francia, Spagna, Marocco e Turchia, con l'obiettivo di sviluppare nuove strategie per la gestione delle malattie della fragola.

- **Nova Siri Genetics**: nata nel 2005 nel Sud Italia, da diversi anni si occupa di attività di ricerca e sperimentazione di nuove varietà di fragole, con l'obiettivo di introdurre cultivar innovative. La destagionalizzazione è il principale target in cui Nova Siri Genetics punta per l'ottenimento di nuove varietà senza ridurre le caratteristiche qualitative e nutrizionali del frutto stesso (NovaSiriGenetics, 2023).

- **CREA- Forlì**: dal 1993, la sezione di Forlì coordina tredici istituzioni pubbliche italiane che operano nell'ambito del miglioramento genetico della fragola per l'Italia Meridionale, la Pianura Padana, il Veronese (coltura autunnale) e le regioni montuose dell'Italia Settentrionale. Il progetto rientra nell'ambito del Progetto Nazionale "Frutticoltura", che ha prodotto numerose varietà di fragola largamente diffuse.
- **Geoplant**: realtà vivaistica romagnola che ha recentemente prodotto varietà come Tea, Olympia e FragolAurea, caratterizzate da frutti di elevato sapore, rusticità di pianta e produttività. Il programma è stato avviato nel 2010, dove si lavora alla selezione di nuove varietà adattate a climi continentali, grazie anche alla collaborazione con il centro di miglioramento genetico romagnolo New Fruits, tramite cui acquisisce competenze necessarie per rispondere alle richieste diversificate del mercato e alle esigenze specifiche degli agricoltori.

1.8.4. Costituzione e certificazione varietale

La costituzione varietale comprende una serie di fasi, legate sia per il pubblico che per il privato, che porta alla formazione di genotipi migliorati. La ricerca genetica, individua grazie a numerosi studi, diversi genotipi adatti al programma di breeding. Tali fonti vengono poi utilizzate nei vari programmi di miglioramento genetico sia pubblico che privato. In seguito all'attività di Breeding svolta, si detengono le così dette proprietà intellettuali, ovvero, brevetti, di proprietà dell'ente che ha sviluppato il nuovo materiale. Tale materiale, in seguito, può essere distribuito e acquistato nei vari vivai, dove seguirà processi di sperimentazione, fino alla produzione e commercializzazione dei privati.

La certificazione varietale comprende anche certificazioni sanitarie regolate dal sistema nazionale. Questo sistema permette di definire l'originalità genetica e sanitaria definendo varietà certificate. I sistemi di certificazione in vigore a livello nazionale per materiale vivaistico sono due:

- **Sistema di certificazione obbligatorio genetico-sanitario:** requisito minimo per la vendita in vivaio. Ciò permette l'ottenimento di materiale con categoria C.A.C. (conformità agricola comunitaria). Garantisce requisiti minimi di qualità imposti dalla Comunità Europea, per la propagazione di tale materiale.

- **Sistema di certificazione volontaria nazionale genetico-sanitaria:** è una certificazione volontaria che permette una selezione di materiale in campi di moltiplicazione, costituendo campi di piante madri, da dove si potranno ottenere due categorie di materiali: Virus controllato (VC) e Virus Esente (VE).

2. Obiettivo della tesi

Lo scopo della tesi è quello di confrontare selezioni di fragole ad uno stadio avanzato di selezione attraverso la valutazione dei parametri nutrizionali dei frutti, confrontandole con cultivar già presenti sul mercato. Questo processo viene svolto nel programma di miglioramento genetico, in cui vengono valutati anche altri aspetti (come ad esempio l'adattabilità della pianta, la resa produttiva, la pezzatura e la qualità dei frutti, ecc.) per la costituzione di nuove varietà, che il Dipartimento di Scienze Agrarie dell'UNIVPM svolge nel programma di breeding.

Ponendo a paragone tali selezioni con cultivar già presenti sul mercato tra cui: "Francesca", "Tea", "Lauretta", "Dina", "Silvia"; si osservano le risposte delle selezioni in riferimento a determinati parametri di comparazione. I parametri considerati in questa tesi riguardano la qualità nutrizionale⁸ dei frutti, in particolare sono Capacità Antiossidante Trolox Equivalente (TEAC), Contenuto Totale di Fenoli (TPH), Contenuto Totale di Antociani (ACY), tramite cui si stima il contenuto di molecole antiossidanti nelle varie cultivar.

Si ottengono risposte positive con valori superiori a quelli delle cultivar già presenti sul mercato, le risposte negative si verificano con valori inferiori a quelli delle cultivar sul mercato. Se le risposte positive sono costanti negli anni, le selezioni sono candidate alla costituzione di nuove cultivar da immettere nel mercato.

Inoltre nella tesi vengono confrontati due metodi di estrazione del frutto, con analisi della Capacità Antiossidante Trolox Equivalente (TEAC), con lo scopo di osservare similarità e differenze tra i due metodi.

⁸ La qualità nutrizionale corrisponde alla capacità nutritiva degli alimenti, quindi alla loro composizione in proteine, lipidi, carboidrati, fibre, vitamine e minerali.

3. Materiali e metodi

3.1. Campo sperimentale

Il campo sperimentale dove si svolge il programma di miglioramento genetico dell'Università Politecnica delle Marche si trova presso Agugliano (AN) a circa 20 km dal mare e ad una altitudine di 80 m s.l.m. (4331'60"N, 1322'60"E). Il campo presenta caratteristiche pedologiche tipiche dell'areale della media collina marchigiana: tessitura franco-argillosa, pH subalcalino, alta dotazione di calcare attivo, basso contenuto di sostanza organica, scarsa dotazione di N totale e P assimilabile, ma alto contenuto in basi di scambio (Mg e K) ed alta capacità di scambio cationico.

Il clima è temperato umido con estati molto calde (Cfa, secondo la classificazione di Köppen e Geiger). La temperatura media durante l'anno è di 14.0°C; con il picco massimo di calore nel mese di luglio (temperatura media di 23°C), ed il picco minimo durante il mese di gennaio (temperatura media di 4.9 °C). Le seguenti valutazioni si sono svolte nel campo di secondo livello, che prende il nome di collezione. La sperimentazione ha coinvolto 12 genotipi, tra selezioni e cultivar, suddivisi in 48 parcelle, ognuna delle quali comprendente 8 piante. Le parcelle sono state randomizzate secondo uno schema a blocchi randomizzati da 8 piante per parcella ripetuto 4 volte. Le piante frigo-conservate a radice nuda sono state messe a dimora a fine luglio 2022 in prodi pacciamate con film plastico nero forato, a fila doppia (30 x 35 cm con una densità di impianto di 55.000 piante per ettaro) ed irrigate con doppia manichetta forata posta sotto la pacciamatura.

3.2. Cultivar e selezioni

Il materiale vegetale comprende le cultivar di riferimento (Tabella 2) e le selezioni avanzate dal programma breeding UNIVPM (Tabella 3).

Tabella 1: Cultivar di riferimento, descrizione varietale e relativo costituente

CULTIVAR	DESCRIZIONE	COSTITUTORE E ANNO DI RILASCIO
LAURETTA	Varietà unifera a maturazione medio-precoce con buon fabbisogno in freddo	Università Politecnica delle Marche – 2019
FRANCESCA	Varietà unifera a maturazione molto precoce con buon fabbisogno in freddo	Università Politecnica delle Marche - 2019
DINA	Varietà unifera, interessante per gli ambienti di coltivazione temperato caldi e subtropicale.	Università Politecnica delle Marche - 2019
TEA	Varietà consigliata per il nord Italia, Pianta di media vigoria con produzioni medio-alte	Geoplant vivai - 2016
SILVIA	Varietà di fragola unifera a maturazione tardiva con elevato fabbisogno in freddo	Università Politecnica delle Marche - 2019

Tabella 2: Selezioni valutate e relativi parentali

SELEZIONI	MADRE	X	PADRE
AN12,23,53	F. FORTUNA	X	AN06,164,52
AN12,29,60	F. FORTUNA	X	AN07,07,60
AN13,13,62	PIRCINQUE	X	AN06,164,52
AN14,01,52	CRISTINA	X	AN03,339,51
AN11,32,55	TECLA	X	AN02,199,55
AN16,15,53	FRANCESCA	X	AN10,28,51
AN14,16,62	AN07,08,52	X	F. FORTUNA
AN17,04,51	FC 09,181,05	X	AN06,75,51
AN17,31,51	LAURETTA	X	SIBILLA
AN17,31,54	LAURETTA	X	SIBILLA

3.3. Campionamento dei frutti

Lo studio è stato condotto nell'anno di raccolta 2022. I parametri valutati riguardavano i parametri produttivi, qualitativi e nutrizionali. Tuttavia, nel seguente lavoro esporremo solo la valutazione nutrizionale dei frutti campionati. I frutti scelti per le analisi nutrizionali sono stati selezionati in base a valutazioni visive, dal terzo stacco in poi fino a raggiungere un quantitativo finale di 30 frutti per parcella.

Nella prima parte del lavoro (confronto varietale), sono stati estratti i campioni tramite procedura comunemente adottata dal laboratorio, e descritta in accordo a quanto riportato da Diamanti et al., 2012. Sono state analizzate, secondo le rispettive procedure, la capacità antiossidante totale (TAC), contenuto totale di polifenoli (TPH), contenuto totale di antociani (ACY), in modo tale da valutare la performance delle selezioni, poste a confronto con le cultivar di riferimento. Nella seconda parte del lavoro (confronto tra metodi di estrazione), è stata adottata un'altra procedura di estrazione, in accordo con quanto condotto nei laboratori dell'Università degli studi della Basilicata (Unibas), e poi posto a confronto con la procedura di estrazione classica (Diamanti et al., 2013). I campioni valutati, in questa seconda parte, sono in totale cinque, tre appartenenti alla collezione e due selezioni appartenenti al materiale vegetale conservato all'interno del campo di miglioramento genetico UNIVPM. L'analisi degli estratti è stata svolta tramite TAC.

3.4. Confronto varietale

3.4.1 Estratto metanolico (Metodo UNIVPM)

Dai trenta frutti, precedentemente raccolti da ogni parcella e congelati a -20°C , sono selezionati dieci frutti omogenei per forma, colore e dimensione (Diamanti, et al., 2012). Tali frutti erano esenti da abrasioni, segni di manipolazione o tagli superficiali. Dopo la selezione, i frutti vengono tagliati in due metà e scelte due fette speculari; in questo modo si considera sia la parte del frutto esposta alla luce solare sia la parte a contatto con la pacciamatura, e quindi in ombra. A questo punto, i campioni vengono ulteriormente sminuzzati per ottenere un pool rappresentativo di 10 grammi da utilizzare per l'estrazione metanolica.

L'estrazione viene eseguita utilizzando il metanolo perché consente di mantenere la stabilità dei composti antiossidanti, infatti si aggiunge al campione tagliato in piccoli pezzi. Viene svolta una doppia estrazione. Nella prima estrazione, si aggiungono 20 ml di metanolo al campione e si omogeneizza il tutto tramite omogeneizzatore Ultraturrax T 25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik), e dopo di che il campione ottenuto viene agitato per 30 minuti al buio tramite l'utilizzo del bagnetto ad ultrasuoni. Il passaggio successivo è la centrifugazione (Centrifuge Megafuge 16R, Thermo Scientific) del campione a 4000 giri/min per 10 minuti a 4°C . Dopo di che, viene prelevato 1 ml di surnatante che viene immesso in fiale color ambra (Vials), che viene conservato in congelatore a -20°C . Il surnatante in eccesso viene rimosso e il pellet residuo dalla centrifugazione viene nuovamente sospeso con altri 20 ml di metanolo e ripetute fasi di agitazione al buio e centrifugazione. Al millilitro precedentemente raccolto viene aggiunto un altro 1 ml di surnatante. Gli estratti vengono conservati in congelatore a -20°C fino al momento in cui verranno svolte le analisi.

Per ciascun campione sono previsti 6 replicati di estratto che verranno impiegati per le analisi spettrofotometriche. Le analisi spettrofotometriche si basano sulla legge di Lambert-Beer.

3.4.2 Capacità Totale Antiossidante (TAC)

La capacità antiossidante totale viene valutata mediante il saggio TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan e Milner, 1993). Il valore TEAC viene derivato correlando la concentrazione di un campione che produce la stessa percentuale di inibizione dell'assorbanza del catione radicale ABTS di 1 mM di Trolox (un analogo della vitamina E idrosolubile) e determinando la quantità di spostamento di colore a 734 nm come valore funzione dell'attività antiossidante (Zheng, Zhao, C., Zhao e Su, 2016). L'ABTS è una sostanza cromogena e incolore che si trasforma nella sua forma radicale monocationica colorata (blu/verde) quando si lega ad un agente antiossidante. Il radicale una volta che si lega agli antiossidanti, che sono donatori di ioni idrogeno, causa lo scolorimento della soluzione (Figura 6).

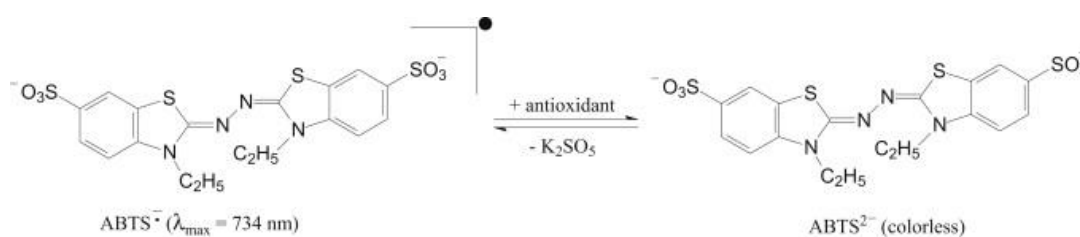


Figura 6: Reazione redox su cui si basa il saggio TEAC (Litescu, Eremia, Tache e Vasilescu, 2014)

La soluzione madre di ABTS^{•+} viene preparata il giorno prima dell'analisi, per dare il tempo all'ABTS di trasformarsi in un catione; a causa dell'elevata reattività dell'ABTS, la soluzione non può essere conservata a lungo. Per produrre la soluzione madre di ABTS^{•+}, viene aggiunto persolfato di potassio (K₂S₂O₈) per provocare l'ossidazione durante la notte. La soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) a pH 7,2-7,4 e una concentrazione di 5 mM è stata preparata con idrogeno fosfato dipotassico (K₂HPO₄) e potassio diidrogeno fosfato (KH₂PO₄). Prima di iniziare ad analizzare i campioni estratti, vengono preparate delle soluzioni standard a diverse concentrazioni diluendo la soluzione madre di Trolox (2,5 mM) con PBS e ABTS a concentrazioni crescenti per un volume totale di 10 ml. I campioni vengono diluiti in proporzione di 1:20 con tampone fosfato. Il campione diluito viene lasciato reagire in rapporto 1:20 con la soluzione radicalica al buio per 6 minuti. Trascorso questo tempo, la soluzione viene letta (734 nm) allo spettrofotometro UV-1800 (Shimadzu

Corp., Kyoto, JP). L'assorbanza degli estratti metanolici viene misurata come accade per le soluzioni standard. L'assorbanza dei campioni deve rientrare nei valori dell'intervallo standard per avere una risposta lineare dell'assorbanza alla concentrazione. Ogni genotipo è stato analizzato sei volte.

L'assorbanza viene trasformata nell'equivalente Trolox nel modo seguente.

ΔA = percentuale di inibizione di ABTS·+.

$$\Delta A = \frac{Abs\ incolore - Abs\ \frac{campione}{standard}}{Abs\ incolore} * 100$$

Mediante regressione lineare, è stata calcolata una curva di calibrazione standard per ciascuna concentrazione di Trolox (media dell'assorbanza per sei misurazioni) ($\Delta A = ac + b$).

Per calcolare la TEAC delle fragole è stata applicata la seguente formula:

$$TEAC\ \frac{mg\ Trolox\ equivalente}{kg\ frutto} = \frac{(\Delta A - b) * F}{a * E}$$

- a = pendenza (linea di calibrazione)
- b = intercetta (linea di calibrazione)
- c = concentrazione di Trolox [mmol/l]
- F = fattore di diluizione (20)
- E = peso del campione [g/l agente estraente]

I risultati sono espressi in mM di Trolox equivalente su kg di frutta fresca.

3.4.3 Contenuto Totale di Fenoli (TPH)

Il TPH è stato valutato mediante il metodo dei reagenti di Folin-Ciocalteu utilizzando l'acido gallico come standard per la curva di calibrazione (Slinkard, 1977). Questo metodo non determina solo il contenuto di composti fenolici, ma anche le altre sostanze riducenti (ad esempio l'acido ascorbico) perché si basa su una reazione redox. Il reagente di Folin è una miscela di fosfomolibdato di sodio $\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ e fosfotungstato di sodio $\text{Na}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$. In questi composti, molibdeno e tungsteno, il numero di ossidazione è +6. Nella reazione vengono ridotti ai numeri di ossidazione +4 e +5 (Chimichiamo, 2021). In condizioni alcaline avviene la reazione redox tra il reagente ed i composti riducenti e si produce una colorazione blu, che raggiunge il massimo a 760 nm. Il contenuto di fenoli viene valutato mediante regressione lineare calcolata in funzione della curva di calibrazione dell'acido gallico (standard esterno) a concentrazioni crescenti. I risultati sono stati calcolati ed espressi come mg di acido gallico per chilogrammo di frutta fresca.

Una provetta è stata riempita con 7,0 ml di acqua. Successivamente è stato aggiunto 1 ml del campione diluito (1:20), seguito dall'aggiunta di 500 μl di reagente Folin-Ciocalteu e agitato su vortex. Dopo 3 minuti, sono stati aggiunti 1,5 ml di carbonato di sodio (20% p/v) e la provetta è agitata nuovamente, e quindi conservata al buio per 60 minuti. L'assorbanza del campione è stata misurata dopo 60 minuti esatti a 760 nm con uno spettrofotometro.

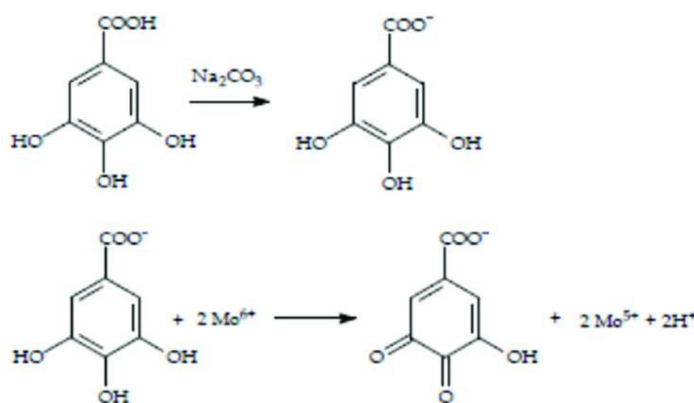


Figura 7: Reazione dell'acido gallico con molibdeno, un componente del reagente Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós, 1999)

Mediante la regressione lineare viene calcolata una curva di calibrazione standard.

$$\Delta A = ac + b.$$

Per il calcolo del TEAC delle fragole è stata applicata la seguente formula:

$$\text{TPH} \frac{\text{mg acido gallico equivalente}}{\text{kg frutto}} = \frac{(\Delta A - b) * F}{a * E}$$

- a= pendenza (linea di calibrazione)
- b= intercetta (linea di calibrazione)
- c= concentrazione di acido gallico [mg/l]
- F= fattore di diluizione (20)
- E= peso del campione [g/l agente estraente]

I risultati vengono espressi in mg di acido gallico equivalente per kg di frutta fresca.

3.4.4 Contenuto Totale di Antociani (ACY)

Il saggio dell'ACY è stato eseguito con il metodo dello spostamento differenziale del pH, utilizzando la caratteristica degli antociani per modificare l'intensità della tinta in base allo spostamento del pH (Giusti & Wrolstad, 2001). A pH 1,0 la molecola è colorata perché è in forma ossonio (H_3O^+), mentre a pH 4,5 è incolore (Figura 8). La differenza di assorbanza è proporzionale al contenuto di antociani. I campioni precedentemente estratti (100 μl) sono stati diluiti in rapporto 1:10 con cloruro di potassio (KCl) a pH 1,0 e con acetato di sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) a pH 4,5 e sono state misurate le corrispondenti assorbanze massime per entrambe le soluzioni (rispettivamente a $\lambda = 500 \text{ nm}$, e $\lambda = 700 \text{ nm}$).

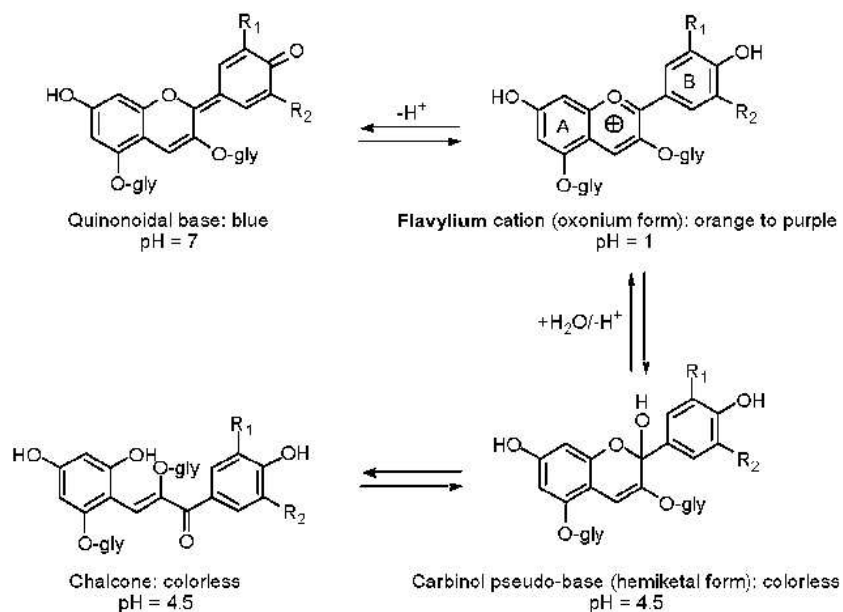


Figura 8: Forme di antociani a differenti pH (Lee, et al., 2005)

I risultati sono stati espressi come mg di pelargonidina-3-glucoside (il composto più rappresentativo degli antociani nelle fragole) per chilogrammo di peso fresco (mg di pel-3-glu/kg di peso fresco).

$$\frac{mg \text{ pel-3-glu}}{kg \text{ di peso fresco}} = \frac{[(A\lambda_{max} - A700)pH1 - (A\lambda_{max} - A700)pH4,5] * MW * F * 1000}{\epsilon * d * E}$$

- A = assorbanza
- MW = peso molecolare pelargonidina-3-glucoside [433,2 g/mol]
- F = fattore di diluizione (10)
- d = lunghezza del percorso cellulare [cm]
- ϵ = assorbanza molecolare pelargonidina-3-glucoside [15600 1 mol⁻¹ cm⁻¹]
- E = peso del campione [kg/l agente estraente]
- 1000 = fattore di conversione

3.5. . Estratto metanolico (Metodo UNIBAS)

Da ogni campione vengono selezionate cinque fragole, dalle quali viene eliminato il picciolo, vengono divise in quattro parti di cui se ne prendono due, in modo da rendere il campione uniforme e rappresentativo, scegliendo sia le parti rivolte al sole che quelle rivolte al terreno. Utilizzando una provetta Falcon si pesano 10g formando così il campione che verrà estratto. La soluzione estraente è composta da metanolo acidificato con acido formico (rapporto 3:1). Una volta preparati il campione e la soluzione estraente si prelevano 30ml di solvente da aggiungere al campione e si procede alla omogenizzazione del campione Ultraturrax T 25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) ottenendo l'estratto liquido che viene lasciato nel bagno ad ultrasuoni per 30 minuti in oscurità. Terminata la sonicazione, l'estratto viene filtrato su cotone in maniera tale da separare il pellet dalla fase liquida. La fase successiva prevede la centrifugazione del campione (Centrifuge Megafuge 16R, Thermo Scientific) in 2 cicli da 10 minuti ciascuno a 4500 rpm/min a 4°C. Infine, il solvente è stato eliminato tramite Rotavapor (Heindolph, WB 2000), munito di pompa a vuoto per permettere la fuoriuscita del solvente. Nello specifico, il Rotavapor crea dei passaggi di stato del solvente, che viene eliminato tramite evaporazione e successiva condensazione. L'estratto secco di ogni campione viene eliminato con una pipetta Pasteur, e immesso in sei vials ambrate ed infine stoccato a -20°C fino al momento delle analisi spettrofotometriche.

3.6. Analisi statistica

Tutti i dati raccolti dalle analisi di cui sopra sono stati esaminati statisticamente mediante media aritmetica, deviazione standard e quindi analisi della varianza a una via (ANOVA) e analisi PCA. L'ANOVA unidirezionale è stata eseguita utilizzando "Statistica 7" (Stasoft, Tibco Software, Palo Alto, California, USA).

4. Risultati e discussione

4.1. Risultati del confronto fra genotipi

4.1.1 *Capacità Antiossidante Trolox Equivalente (TEAC)*

Nella Fig. 9 sono riportati tutti i genotipi considerati nello studio. Tra queste, si nota che i frutti della selezione “AN12,13,58” (4,23 mM Trolox eq/100g frutto) sono quelli con il valore più alto rispetto agli altri genotipi, seguita dalla selezione “AN12,29,60” (3,88 mM Trolox eq/100g frutto) e da “AN15,07,53” (3,32 mM Trolox eq/100g frutto) che presenta valori vicini a quelli di “TEA” e “SILVIA”, cultivar ottenute dal programma di miglioramento genetico D3A di UNIVPM, che risultano essere le cultivar con valori più elevati assieme a “LAURETTA”. I genotipi precoci hanno presentato valori piuttosto uniformi, vicini alla media che è pari 3,05 mM Trolox eq/100g frutto, dal quale si discostano particolarmente la selezione “AN12,29,60” che presenta valori superiori, e la cultivar “FRANCESCA” con valori inferiori, tre dei genotipi hanno valori superiori alla media mentre i rimanenti tre presentano valori inferiori. Tra i genotipi a maturazione intermedia, la cui media dei valori è pari a 2,96 mM Trolox eq/100g frutto, la selezione “AN16,15,53” presenta valori superiori mentre gli altri genotipi non differiscono particolarmente dalla media, due genotipi presentano valori superiori alla media mentre gli altri due inferiori. Infine, il valore medio dei genotipi a maturazione tardiva è pari a 3,63 mM Trolox eq/100g frutto, che risulta essere anche il valore medio più elevato rispetto a quelli dei genotipi a maturazione precoce ed intermedia.

I valori medi in mM Trolox eq/100g frutto delle cultivar (2,82 mM Trolox eq/100g frutto) e delle selezioni (3,33 mM Trolox eq/100g frutto) non sono

particolarmente differenti, le selezioni contengono 0,51 mM di Trolox eq/100g frutto in più rispetto alle cultivar commerciali.

Tramite analisi statistica è stato possibile constatare che tra i genotipi “AN12,13,58” e “FRANCESCA” la differenza è significativamente importante, “AN12,13,58” è statisticamente più ricca in antiossidanti rispetto a “FRANCESCA”. Mentre tra “AN15,07,53” e “DINA” la differenza non è significativa quindi hanno contenuti simili di molecole antiossidanti.

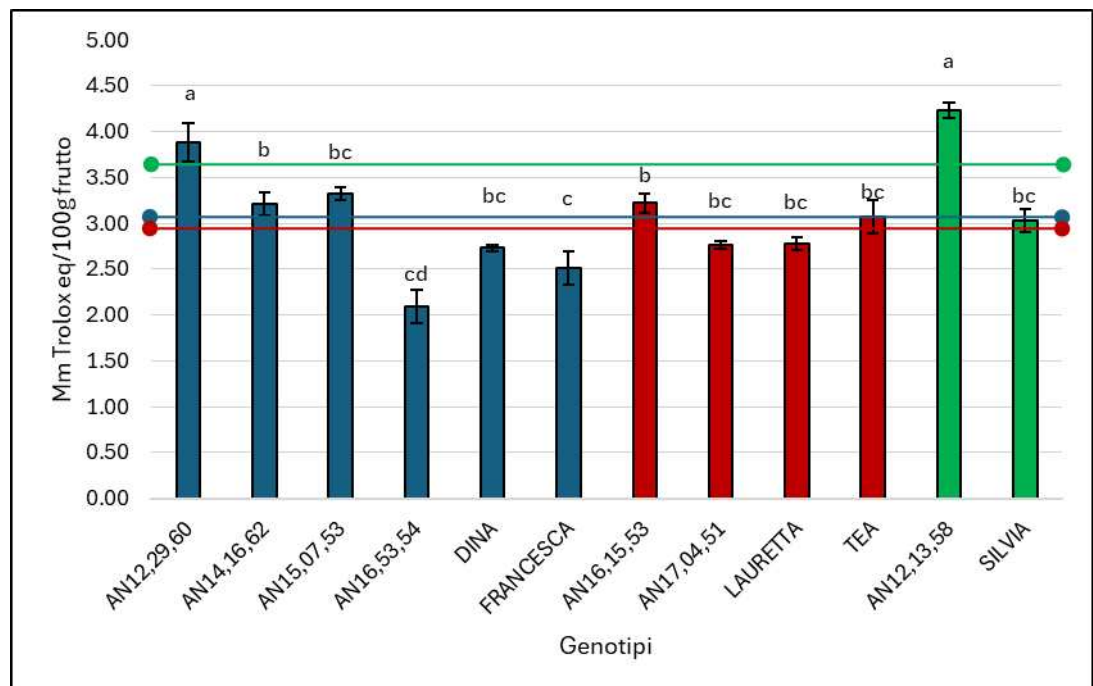


Figura 9: Rappresentazione grafica dei risultati del saggio TEAC, espresso come mM Trolox eq/100g di frutto fresco pesato, delle cultivar analizzate durante lo studio. I dati sono la media dei valori triplicati \pm deviazione standard. Valori indicati con le stesse lettere, non sono statisticamente differenti l’uno dall’altro, in accordo con Tukey test ($p < 0.05$). Con istogramma blu sono indicati genotipi a maturazione precoce, rosso intermedia e verde tardiva.

Tabella 3: Migliori tre selezioni in base al contenuto di antiossidanti (TEAC). Dati medi \pm deviazione standard.

Genotipo	Media mM Trolox eq/100g frutto	Deviazione Standard mM Trolox eq/100g frutta	Epoca di maturazione
AN12,13,58	4,23	0,34	Tardiva
AN12,29,60	3,88	0,84	Precoce
AN15,07,53	3,32	0,32	Precoce

4.1.2 Contenuto Totale di Fenoli (TPH)

Nella Fig.11 sono riportati i genotipi analizzati per il contenuto di fenoli, dall'analisi emerge che non ci sono evidenti differenze significative tra i diversi genotipi, infatti la media di mg GA/100g frutto delle selezioni (354, 69 mg GA/100g frutto) è superiore alla media delle cultivar (327,52 mg GA/100g frutto) solo di 21 mg GA/100g frutto. Il contenuto più elevato si riscontra nei frutti della selezione "AN12,13,58" con 474,57 mg GA/100g frutto mentre quello più basso nei frutti di "AN15,07,53" con 284,53 mg GA/100g frutto. Tra le cultivar commerciali "FRANCESCA" (349,69 mg GA/100g frutto) e "SILVIA" (348,72 mg GA/100g frutto) sono quelle con valori più elevati e con concentrazione simile, che si discostano dalle altre cultivar analizzate.

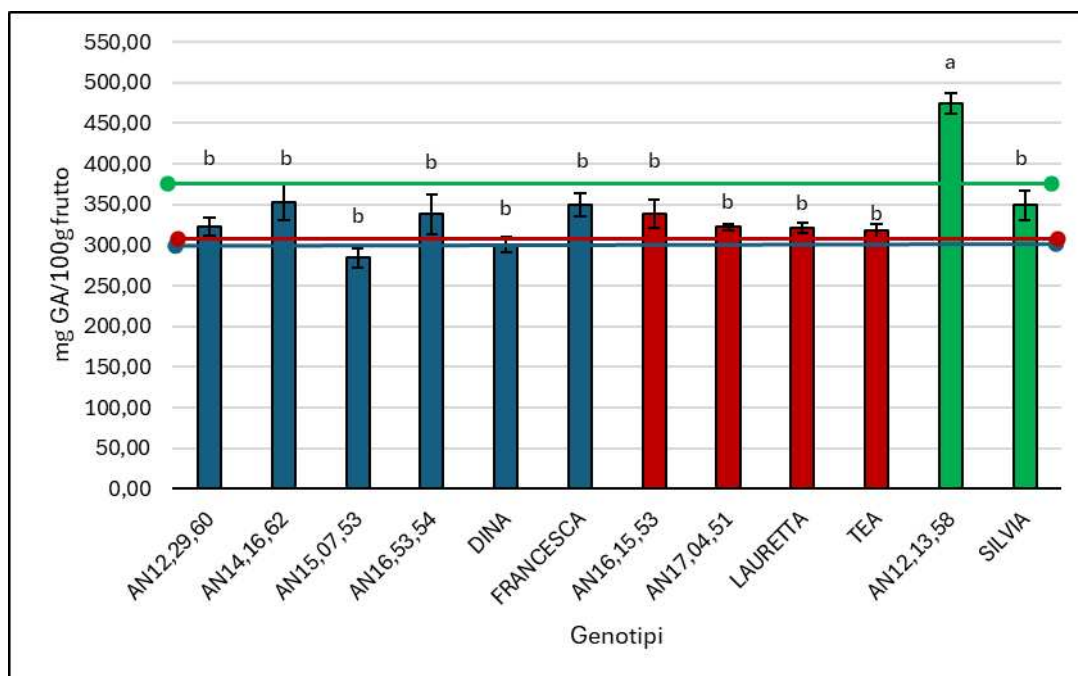


Figura 11: Rappresentazione grafica del contenuto di fenoli (TPH), espresso come mg acido gallico/100g frutto fresco pesato, dei genotipi presi in esame. I dati sono la media dei valori triplicati \pm deviazione standard. Valori con le stesse lettere, non sono statisticamente differenti l'uno dall'altro, in accordo con Tukey test ($p < 0.05$). Con istogramma blu sono indicati genotipi a maturazione precoce, rosso intermedia e verde tardiva.

Tabella 4: I genotipi con migliori valori di contenuto in fenoli (THP). Dati medi \pm deviazione standard.

Genotipo	Media mg GA/100g frutto	Deviazione strandard mg GA/100g frutto	Epoca di maturazione
AN12,13,58	474,57	51,14	Tardiva
AN14,16,62	352,97	89,55	Precoce
FRANCESCA	349,69	56,35	Precoce

4.1.3 *Contenuto Totale di Antociani (ACY)*

Il valore medio del contenuto di antociani nei genotipi a maturazione precoce è pari a 32,199 mg PEL-3-GLU/100g di frutto, un valore particolarmente elevato è quello riscontrato nei frutti della cultivar “DINA”, mentre il più basso si riscontra in “AN15,07,53”. La media in antocianine nei genotipi a maturazione intermedia è di 31,287 mg PEL-3GLU/100g frutto, mentre nei genotipi a maturazione tardiva la media è 41,311 mg PEL-3-GLU/100g frutto. I valori riguardanti il contenuto di antociani sono piuttosto variabili in base ai valori di deviazione standard.

Le selezioni con valori migliori di mg PEL-3-GLU/100g frutto risultano essere “AN14,16,62”, “AN16,53,54” e “AN16,15,53”.

Le cultivar con valori più elevati di mg PEL-3-GLU/100g frutto sono “SLIVIA” e “DINA” che si discostano dalle altre cultivar.

Confrontando la media delle selezioni (29,08 mg PEL-3-GLU/100g frutto) e delle cultivar (39,48 mg PEL-3-GLU/100g frutto), emerge che le cultivar hanno un contenuto più elevato di 10, 41 mg PEL-3-GLU/100g frutto, non particolarmente più elevato, ma comunque maggiore rispetto alle selezioni.

Dall’analisi statistica emerge che la differenza maggiore è tra le cultivar “SILVIA” e “AN17,04,51”, invece le cultivar con concentrazione più simile sono “AN12,29,60” e “AN15,07,53”.

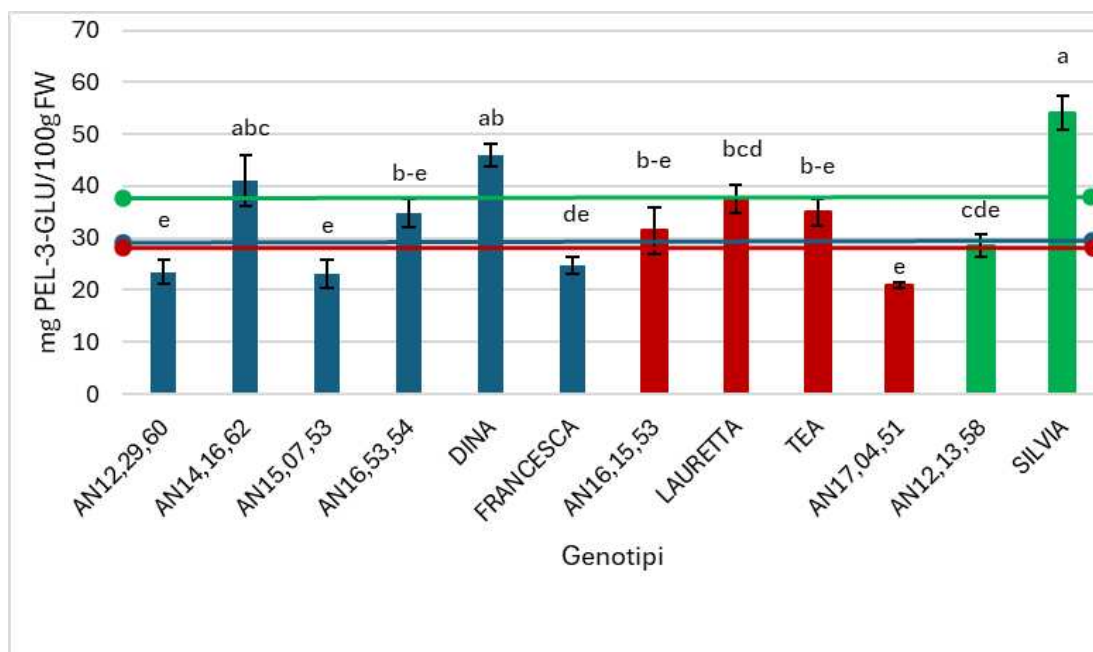


Figura 13: Rappresentazione grafica del contenuto in antociani, espresso in mg di pelargonidina-3-glucoside/100g frutto fresco. Dati medi \pm deviazione standard. Con istogramma blu sono indicati genotipi a maturazione precoce, rosso intermedia e verde tardiva.

Figura 5: Migliori genotipi per il contenuto di antocianine (ACY). Dati medi \pm deviazione standard.

Genotipo	Media mg PEL-3-GLU/100g frutto	Deviazione Standard mg PEL-3-GLU/100g frutto	Epoca di maturazione
SILVIA	54,08	13,13	Tardiva
DINA	45,93	9,08	Precoce
AN14,16,62	41,16	19,55	Precoce

4.2. Confronto tra metodi di estrazione

4.2.1 Capacità Antiossidante Trolox Equivalente (TEAC) a confronto tra metodi di estrazione UNIVPM e UNIBAS

Dal saggio TEAC svolto sui campioni ottenuti con i due metodi di estrazione è emerso che i genotipi in ordine decrescente di Capacità antiossidante totale (CAT), estratte con metodologia UNIVPM sono “AN15,07,53” (3,32 mM Trolox eq/100g frutto), “AN17,04,51” (2,77 mM Trolox eq/100g frutto), “AN17,45,39” (2,74 mM Trolox eq/100g frutto), seguita da “AN12,20,53” (2,58 mM Trolox eq/100g frutto) e “AN16,53,54” (2,09 mM Trolox eq/100g frutto); le cultivar in ordine decrescente, estratte con tecnica Unibas sono risultate essere “AN17,04,51” (2,29 mM Trolox eq/100g frutto), “AN15,07,53” (2,00 mM Trolox eq/100g frutto), “AN16,53,54” (1,96 mM Trlox eq/100g frutto), “AN17,45,39” (1,96 mM Trolox eq/100g frutto) ed “AN12,20,53” (1,86 mM Trolox eq/100g frutto) con il valore più basso.

Analizzando i dati statistici si può affermare che i frutti della selezione “AN15,07,53” mostrano una concentrazione più elevata di molecole antiossidanti rispetto alle altre selezioni estratte con metodo UNIVPM, mentre “AN17,04,51” è la selezione statisticamente differente dalle altre estratte con metodo UNIBAS.

Confrontando i dati ottenuti da analisi spettrofotometriche degli estratti con i due diversi metodi, si evidenziano delle differenze statisticamente significative, la selezione con maggiore differenza dei dati a confronto tra le due tecniche è “AN15,07,53”, in ogni caso in tutte le cultivar analizzate e confrontate si osserva un'importante differenza statistica dei risultati. I risultati ottenuti con il metodo di estrazione UNIBAS risultano essere inferiori a quelli ottenuti con l'estrazione con metodo UNIVPM per tutte le selezioni eccetto per la “AN16,53,54”, il che potrebbe essere dovuto ad una potenziale ossidazione dei campioni in fase di lavorazione, visto l'utilizzo dello strumento Rotavapor che lavora a temperature di 37°C e con sistema di evaporazione e condensazione per eliminare il solvente, e considerato anche il fatto che questa tecnica richiede più tempo per essere svolta e quindi determina anche maggior esposizione dei campioni ai fattori ambientali che determinano l'ossidazione, lontani dalle temperature di -20°C che invece consentono il mantenimento delle caratteristiche dei frutti, pressochè invariate; svolgendo due cicli di centrifugazione si ha maggiore probabilità di eliminare eventuale pellet residuo.

Nella tecnica adottata da UNIVPM, i tempi si riducono, non dovendo portare l'estratto a secco prima di immerterlo nelle vials.

Per poter confermare questa ipotesi vanno svolte ulteriori prove con dati a confronto degli estratti con i due metodi, ampliando il numero dei campioni analizzati.

Le differenze dei due metodi di estrazione riguardano il solvente utilizzato, che nella tecnica adottata da Unibas prevede l'utilizzo di metanolo (MeOH) acidificato con acido formico (CH₂O₂) in rapporto di 3:1; l'estrazione che viene eseguita in un singolo procedimento e non doppio, come nella tecnica adottata da UNIVPM, dove il pellet separato viene estratto nuovamente con metanolo e successivamente ne viene prelevato 1 ml che viene aggiunto al ml precedentemente estratto e inserito nella vials; il campione viene estratto con 30 ml di solvente e non con 20 ml; il campione miscelato al solvente viene filtrato su cotone per separare il pellet dal surnatante e la centrifugazione avviene in due cicli da 10 minuti a 4500 rpm/min a 4°C; inoltre nella prima tecnica viene eliminato il solvente con Rotavapor portando il surnatante allo stato di estratto secco che viene prelevato e inserito in vials.

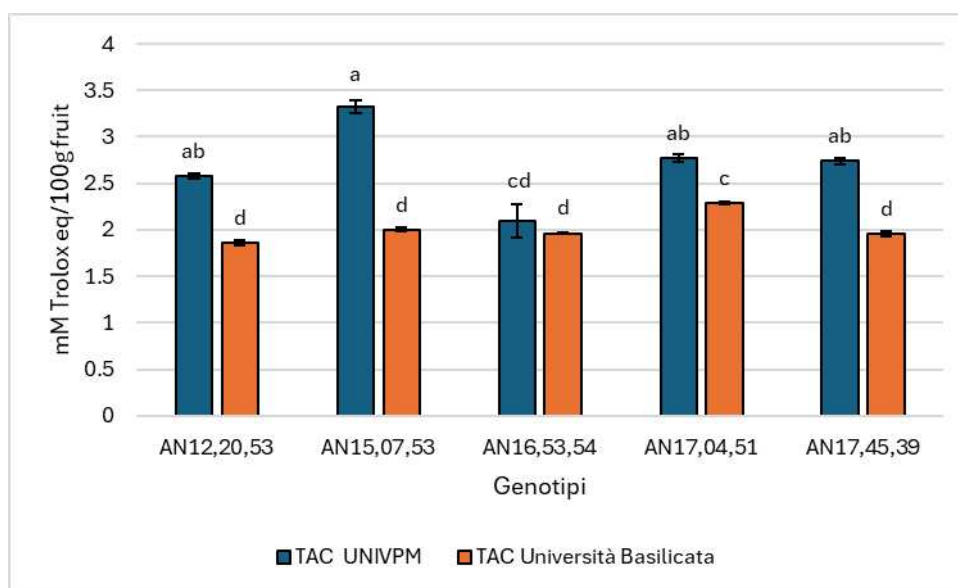


Figura 15: Rappresentazione grafica dei risultati del saggio TEAC, a confronto i risultati ottenuti con i due metodi di estrazione del campione, utilizzati da Univpm e Unibas, espresso come mM Trolox eq/100g di frutto fresco pesato, delle cultivar analizzate durante lo studio. I dati sono la media dei valori triplicati \pm deviazione standard.

5. Conclusioni

La fragola è una tra le più importanti coltivazioni nell'UE. Negli ultimi anni sono stati avviati numerosi programmi di miglioramento genetico con l'obiettivo di aumentare le componenti qualitative dei frutti. Queste componenti qualitative comprendono la qualità commerciale, sensoriale e in particolare la qualità nutrizionale, che è oggetto di studio in questa tesi.

Lo studio svolto è servito ad identificare selezioni interessanti di *Fragaria x ananassa*, in base a parametri qualitativi analizzati in laboratorio, e a confrontare cultivar di fragola già presenti in commercio e selezioni di genotipi derivanti dal programma di miglioramento genetico D3A dell'Università Politecnica delle Marche. Ciò ha permesso di mettere in evidenza le selezioni che presentano caratteristiche simili o migliori rispetto alle cultivar di riferimento, e inoltre ha permesso di scartare le selezioni che presentano valori minori in riferimento alle caratteristiche analizzate.

In base ai dati ottenuti tramite analisi, emerge che le selezioni più interessanti valutate sono “AN12,13,58” sia per la Capacità Antiossidante Trolox Equivalente (TEAC), pari a 4,23mM Trolox eq/100g frutto, sia per il Contenuto Totale di Fenoli (TPH), pari a 474, 57 mg GA/100g frutto, e “AN14,16,62” con valori di mg GA/100g frutto pari a 352, 97, inoltre ha presentato un elevato Contenuto Totale di Antociani pari a 54,07 mg PEL-3-GLU/100g frutto. Tra le cultivar prodotte dal dipartimento D3A sono emersi valori elevati in riferimento al contenuto di antociani per “SILVIA” con 54, 07 mg PEL-3-GLU/100g frutto, e “DINA” con 45, 92 mg PEL-3-GLU/100g frutto.

Dal confronto delle analisi svolte tra le selezioni e le cultivar prodotte dal programma di miglioramento genetico D3A dell'UNIVPM, è emerso che le selezioni hanno migliori valori di Capacità Antiossidante Trolox Equivalente (TEAC) e di Contenuto Totale di Fenoli (TPH) rispetto alle cultivar di riferimento per tutte le epoche di maturazione, mentre per il Contenuto Totale di Antociani (ACY) le cultivar presentano migliori valori rispetto alle selezioni.

Dal confronto tra i metodi di estrazione adottati da UNIVPM e UNIBAS è emerso il fatto che i valori ottenuti dall'analisi dell'estratto ricavato con il secondo metodo sono inferiori rispetto alla prima tecnica di estrazione (eccetto che per la selezione "AN16,53,54"), a causa di una potenziale ossidazione dei campioni in fase di lavorazione, quindi per poter confermare questa ipotesi vanno svolte ulteriori prove con dati a confronto degli estratti con i due metodi, ampliando il numero dei campioni analizzati.

6. Bibliografia

1. Angelini, R. (2010). La fragola. Art Servizi SpA Bologna.
2. Hummer, K. E., & Hancock, J. (2009). Strawberry genomics: botanical history, cultivation, traditional breeding, and new technologies. *Genetics and genomics of Rosaceae*, 413-435.
3. Rivista di Frutticoltura e di ortofloricoltura, Edagricole (2019).
4. Mezzetti, B., Giampieri, F., Zhang, Y. T., & Zhong, C. F. (2018). Status of strawberry breeding programs and cultivation systems in Europe and the rest of the world. *Journal of Berry Research*, 8(3), 205-221.
5. Di Vittori, L., Mazzoni, L., Battino, M., & Mezzetti, B. (2018). Pre-harvest factors influencing the quality of berries. *Scientia Horticulturae*, 233, 310-322.
6. Edger, P. P., Poorten, T. J., VanBuren, R., Hardigan, M. A., Colle, M., McKain, M. R., ... & Knapp, S. J. (2019). Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nature genetics*, 51(3), 541-547.
7. Mazzoni, L., Giampieri, F., Diamanti, J., Capocasa, F., Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., ... & Mezzetti, B. (2013). Il profilo nutrizionale della fragola ed il suo impatto sulla salute dell'uomo. *Energia (kcal)*, 32, 0.
8. Capocasa, F., Balducci, F., Martellini, C., & Albanesi, A. (2016, August). Yield and fruit quality of strawberry cultivars grown in organic farming in the mid-Adriatic area. In VIII International Strawberry Symposium 1156 (pp. 619-626).
9. Mezzetti, B., & Capocasa, F. (2021). Nuove varietà di fragola rilasciate dal programma di miglioramento genetico fragola attivo presso il Dipartimento di scienze agrarie, alimentari ed ambientali–Università Politecnica delle Marche–Ancona. *Nuove varietà di fragola rilasciate dal programma di miglioramento genetico fragola attivo presso il Dipartimento di scienze agrarie, alimentari ed ambientali–Università Politecnica delle Marche–Ancona*, 152-155.

10. Faedi, W., Magnani, S., Turci, P., Cubicciotti, G., Baruzzi, G., Lucchi, P., & Cesena, F. (2000). Recent advances in strawberry public breeding program in Italy [Fragaria x ananassa Duch.]. *Atti V Giornate Scientifiche SOI (Italy)*, 2.

Sitografia

1. FAOstat, 2021, <https://www.fao.org/faostat/en/#home>
2. Fruit Journal, <https://www.fruitjournal.com/2023/11/28/fragole-in-inverno-il-ruolo-della-genetica/#:~:text=Per%20quanto%20riguarda%20la%20fragola,a%20diversi%20climi%20e%20terreni>
3. AtlasBig, <https://www.atlasbig.com/it/paesi-per-produzione-di-fragole>
4. Creafuturo,2023..<https://creafuturo.crea.gov.it/9785/#:~:text=Le%20fragole,14%C2%B0%20gradino%20al%20mondo>
5. AgroNotizie,[https://agronotizie.imagelinenetwork.com/agronomia/2024/03/15/fragole-e-piccoli-frutti-leggero-calo-delle-superfici-in-particolare-nel-nord-italia/81511#:~:text=Disponibile%20l'aggiornamento%20di%20Cso,\(%2D2%25%20rispetto%20al%202022\)](https://agronotizie.imagelinenetwork.com/agronomia/2024/03/15/fragole-e-piccoli-frutti-leggero-calo-delle-superfici-in-particolare-nel-nord-italia/81511#:~:text=Disponibile%20l'aggiornamento%20di%20Cso,(%2D2%25%20rispetto%20al%202022))
6. Vomturmhaus, 2023. <https://it.vomturmhaus.com/descrizione-delle-fragole-crescita-utilizzando-la-tecnologia>
7. FreshPlaza, 2023. <https://www.freshplaza.it/article/9020268/rivalutare-il-ruolo-della-micropropagazione-nella-produzione-vivaistica-delle-fragola/>
8. Cadirlab, <https://www.cadirlab.it/bromuri-in-ortaggi-a-frutto-e-altre-derrate-orticole/#:~:text=L'impiego%20del%20bromuro%20di,dello%20ione%20bromuro%20negli%20ortaggi>.
9. Plantgest, 2023. <https://plantgest.imagelinenetwork.com/it/news/2023/07/26/fragola-e-miglioramento-genetico-uno-sguardo-al-futuro/79810>
10. Rivistafrutticoltura.edagricole, 2019. <https://rivistafrutticoltura.edagricole.it/miglioramento-genetico/biotecnologie-di-breeding-di-precisione-analisi-delle-esperienze-in-corso/>
11. Rivistafrutticoltura.edagricole, 2019. <https://rivistafrutticoltura.edagricole.it/miglioramento-genetico/innovazione->

[vivaistica-e-miglioramento-genetico-per-la-frutticoltura-del-futuro/#:~:text=Per%20la%20fragola%2C%20i%20target,diffusione%20in%20oltre%2060%20Paesi.](#)

12. Edagricola, 2019. <https://terraevita.edagricole.it/frutticoltura/miglioramento-genetico-della-fragola-una-mano-arriva-dalle-nbts/>

13. NovaSiriGenetics, 2023. <https://www.novasirigenetics.com/fragole-lobiettivo-e-destagionalizzare/>

14. Geoplant Vivai, 2022. <https://geoplantvivai.com/>

15. Plantgest, <https://plantgest.imaginenetwork.com/it/news/2021/04/14/geoplant-tra-i-big-delle-quotolimpiadi-della-fragolaquot/70087>

7. Ringraziamenti