

AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino

Spettroscopia e monitoraggio della maturazione dell'uva

This is a pre print version of the following article:

Original Citation:

Availability:

This version is available <http://hdl.handle.net/2318/1636084> since 2017-05-18T15:25:30Z

Terms of use:

Open Access

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available under a Creative Commons license can be used according to the terms and conditions of said license. Use of all other works requires consent of the right holder (author or publisher) if not exempted from copyright protection by the applicable law.

(Article begins on next page)

APPLICAZIONI DI SPETTROSCOPIA IN VITICOLTURA (MONITORARE IN VIGNETO I METABOLITI SECONDARI DELL'UVA ATTRAVERSO METODI SPETTROSCOPICI NON DISTRUTTIVI).

ALESSANDRA FERRANDINO

DISAFA, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI TORINO, LARGO
BRACCINI, 2 - 10095 GRUGLIASCO (TO)

English abstract.

Berry ripening evaluation through primary and secondary metabolite assessment can be performed through spectroscopy. At present spectroscopic applications able to measure reflectance, chlorophyll fluorescence or those based on the chlorophyll fluorescence screening method have been tested and are more or less diffused in viticulture. We briefly describe the main spectroscopic methods used to evaluate vine physiology and berry quality, focusing in particular on some results related to our experience with the Multiplex3® (Force-A, Paris, France) use in estimating anthocyanin concentration in varieties with different anthocyanin profile and flavonols in white berry varieties.

PREFAZIONE

Lo studio dell'andamento della maturazione attraverso l'analisi dei metaboliti primari e secondari delle uve oggi può avvalersi del ricorso a spettroscopi portatili mono- o multi-parametrici capaci di stimare la concentrazione delle principali classi di composti. Si riporterà di esperienze sperimentali effettuate su diversi vitigni e miranti a valutare l'accumulo dei principali metaboliti delle uve attraverso l'uso del Multiplex® (ForceA, Parigi, Francia), sensore ottico portatile, il cui funzionamento si basa sull'effetto schermante esercitato da taluni metaboliti sull'emissione di fluorescenza della clorofilla.

TESTO

L'individuazione di metodi veloci e non distruttivi per la valutazione della maturazione delle uve è uno degli obiettivi del settore della ricerca applicata alla viticoltura. Ciò al fine di rispondere ad una esigenza specifica del

comparto produttivo relativa al monitoraggio “in continuo” dell’andamento della maturazione che è funzionale alla definizione della qualità dell’uva. Oggi è noto che la qualità dell’uva è il frutto di una serie di interazioni tra vitigno, suolo, condizioni climatiche, scelte antropiche (parametri che tutti assieme costituiscono il ‘Terroir’). Al centro di questa interazione si colloca il funzionamento della pianta intera. Per questo, conoscere le risposte metaboliche della vite agli stimoli esterni (ed in ciò si possono includere sia le condizioni abiotiche che quelle biotiche) è di fondamentale importanza per indirizzare il processo produttivo sia in termini di quantità di produzione che di qualità. Inoltre, soprattutto quando si passa dalla scala sperimentale a quella applicativa, diventa d’obbligo realizzare misure affidabili che, si sa, lo sono tanto più quanto maggiore è il loro numero. Non a caso dunque negli ultimi anni sono stati realizzati studi finalizzati all’individuazione di metodi veloci, ripetibili ed affidabili miranti sia alla valutazione di parametri fisiologici della pianta, punto uno per la definizione della qualità del prodotto finale, sia alla misura specifica di talune classi di metaboliti primari e secondari, che, come è noto, sono direttamente responsabili della qualità dell’uva.

Inoltre, grazie alla diffusione delle tecniche di georeferenziazione in agricoltura, molte di queste misure si possono collocare in dimensioni spaziali ben precise consentendo così di creare mappe puntuali del parametro misurato. Quest’ultima opportunità rientra tra i numerosi aspetti della ‘viticoltura di precisione’ su cui oggi ricade vasto interesse per svariate ragioni tra cui l’opportunità che offre di intervenire in vigna in modo mirato, riducendo i costi di gestione e l’impatto ambientale, quando, attraverso la valutazione dello stato sanitario delle piante, si punta alla riduzione dell’utilizzo di antiparassitari.

Tutte queste considerazioni insieme portano a definire un quadro complesso ed in continua evoluzione in viticoltura, uno dei settori di maggior traino dell’agricoltura nel mondo. Molto sinteticamente, la raccolta dei dati può avvenire sia tramite sistemi di acquisizione da remoto (satellite, aereo) sia da sensori. Esistono oggi numerosi esempi di entrambe le modalità di acquisizione che sfruttano diversi fenomeni fisici tra cui la luce e gli ultrasuoni (Vitali *et al.*, 2013). Della luce si è studiato diffusamente il fenomeno di emissione da parte della vegetazione e in passato alcuni lavori tecnico–scientifici proposero correlazioni tra l’emissione di luce nel vicino infrarosso e la presenza o l’assenza di vegetazione (Kriegler *et al.*, 1969).

Successivamente, ci si è specializzati fino ad arrivare a correlare lo spettro della luce emessa a parametri via via più puntuali quali ad esempio, l'ampiezza della vegetazione da correlare con l'area fogliare e/o con il vigore della pianta (Filippetti *et al.*, 2013), lo stato fisiologico della vegetazione per la stima dello stato idrico della vigna (Baluja *et al.*, 2012), la qualità della produzione (Lamb *et al.*, 2004; Gonzalez-Flor *et al.*, 2014). Ciò è stato realizzato attraverso lo studio di una serie di indice spettroscopici tra i quali il più noto ed il più diffuso è certamente l'NDVI (Normalized Difference Vegetation Index).

Un'altra importante applicazione dell'uso della luce in agricoltura ai fini della valutazione di taluni parametri fisiologici della pianta è rappresentata dall'emissione di fluorescenza da parte della clorofilla. Sono da tempo noti ed utilizzati strumenti che misurano questo parametro in singole cellule, in tessuti e/o in pianta intera, restituendo informazioni sul loro stato di vitalità. A titolo di esempio ricordiamo strumenti molto diffusi e noti nel settore della ricerca scientifica come quelli della ditta Walz (<http://www.walz.com/>) o della ADC (<http://www.adc.co.uk>). L'emissione di fluorescenza da parte della molecola della clorofilla è stata anche messa in relazione con l'accumulo di talune classi di composti fenolici come gli antociani; in questo caso ciò che si va a misurare non è la emissione di fluorescenza della clorofilla tout court, bensì l'effetto 'screening' esercitato dall'accumulo di certe classi di composti sulla luce preposta alla eccitazione della clorofilla (Agati *et al.*, 2007). Questo metodo è chiamato metodo di 'screening' dell'emissione di fluorescenza della clorofilla (chlorophyll fluorescence 'screening' method) per distinguerlo dalla semplice emissione di fluorescenza che invece, come detto, trova applicazione nel settore della misura dello stato fisiologico delle piante. Lo strumento proposto e disponibile da alcuni anni è uno spettroscopio portatile, il Multiplex® (Force-A, Parigi, <http://www.force-a.eu>). La stima del contenuto in antociani si basa sull'effetto di interferenza indotto dal loro accumulo sull'emissione di fluorescenza della clorofilla a circa 520 nm, lunghezza d'onda corrispondente al picco di massima assorbanza degli antociani. La conditio sine qua questa metodologia funziona è la presenza di clorofilla nell'acino nel corso di tutta la maturazione. Questa condizione è stata dimostrata in Pinot nero, vitigno su cui venne realizzata la prima validazione dell'uso del Multiplex® in viticoltura (Agati *et al.*, 2007). L'indice spettroscopico utilizzato per la stima del contenuto in antociani è

ANTH_RG, il logaritmo in base 10 del rapporto tra la fluorescenza della clorofilla nel rosso lontano a seguito di eccitazione nel rosso (R) e nel verde (G) - $ANTH_RG = \log(FRF_R/FRF_G)$. Contestualmente alla diffusione dello strumento si sono proposte validazioni specifiche per diversi genotipi come Shyraz (Bramley *et al.*, 2011), Aleatico (Tuccio *et al.*, 2011), Tempranillo (Baluja *et al.*, 2011), Barbera (Ferrandino *et al.*, 2012). Nella generalità dei casi esaminati, la stima del contenuto in antociani delle uve si correla in modo significativo (R^2 non inferiore a 0,78) con l'andamento dell'accumulo degli antociani entro concentrazioni non superiori ai 1300 mg per chilogrammo di uva. Le curve proposte dai vari autori al momento sono state realizzate su vitigni dal profilo antocianico più comune, ossia vitigni in cui esiste una prevalenza di antociani tri-idrossilati rispetto ai di-idrossilati. Nei vitigni con profilo particolare, come è il caso del ben noto Nebbiolo, in cui esiste, ad eccezione di qualche clone di recente omologazione, una netta prevalenza di antociani di-idrossilati rispetto ai tri-idrossilati, la risposta spettroscopica è risultata diversa da quella dei vitigni a prevalenza di antociani tri-idrossilati. Nel Nebbiolo, infatti, si verifica una traslazione della curva di calibrazione verso valori superiori, ossia alle stesse concentrazioni di antociani corrispondono valori spettroscopici più elevati (Figura 1). Esistendo, dunque, un importante effetto varietale, come per altre applicazioni (si pensi agli strumenti che sfruttano la riflettanza nel vicino infrarosso, ad esempio), risulta necessario tarare lo strumento caso per caso o, in alternativa, riferirsi alle curve di taratura proposte assicurandosi preventivamente che esse siano state calcolate per vitigni con profilo antocianico simile a quello delle uve di cui si vuole conoscere la stima del colore.

Un indice spettroscopico più semplice, il FERARI ($\log 5000/FRF_R$) che tiene esclusivamente conto della fluorescenza della clorofilla dell'acino nel rosso lontano a seguito di eccitazione nel rosso, non risente, giocoforza, dell'effetto varietale. Questo indice è stato efficacemente messo in relazione con il contenuto in antociani in numerose varietà, tra cui Barbera e Nebbiolo (Figura 2) per le quali esso è risultato ben correlato con la misura analitica ($R^2 = 0,91$). L'uso dell'indice FERARI può dunque essere ritenuto una valida alternativa ad ANTH_RG, quando si voglia stimare velocemente il contenuto in antociani, indipendentemente dal profilo antocianico del vitigno.

Poiché la qualità dell'uva dipende anche dall'accumulo di altre classi di

composti tra cui i flavonoli che sono attivamente coinvolti nei fenomeni di co-pigmentazione e che, di conseguenza, stabilizzano il colore dei mosti e dei vini, si è condotta una sperimentazione sulla stima di questa classe di composti, in vivo, in modo veloce e non distruttivo. Dai dati riportati in letteratura e da quelli frutto delle nostre sperimentazioni, il dato analitico e la misura spettroscopica si possono mettere in relazione attraverso l'indice FLAV (logaritmo in base 10 del rapporto tra la fluorescenza della clorofilla a seguito di eccitazione nel rosso e nell'ultravioletto - $FLAV = \log(FRF_R/FRF_UV)$; Agati *et al.*, 2011). Il Multiplex3® si è rivelato efficace nella stima del contenuto in flavonoli, soprattutto nelle uve a bacca bianca dove l'effetto di schermatura della luce di eccitazione nell'ultravioletto (i flavonoli, è bene ricordarlo, presentano il picco di massimo assorbimento a 360 nm), non risente mai della coda di assorbimento dovuta agli antociani. La relazione tra il dato analitico e quello spettroscopico, il FLAV, risulta efficacemente rappresentata da una equazione lineare con R^2 maggiore di 0,8 (Figura 3).

Esistono numerose altre opportunità per la spettroscopia applicata alla viticoltura. Sempre rimanendo nel settore della valutazione della qualità dell'uva uno degli obiettivi oggi ricercati consiste nell'evolvere verso la multiparametricità cioè avere a disposizione tecnologie che consentano di misurare contemporaneamente più parametri. Nel caso della spettroscopia legata all'emissione di fluorescenza della clorofilla, ad esempio, uno dei parametri che potrebbe facilmente essere acquisito in sede di misura in campo è la stima del contenuto in solidi solubili, correlabile con il Simple Fluorescence Ratio (SFR), il rapporto tra la fluorescenza nel rosso lontano e quella nel rosso, a seguito di eccitazione nel rosso ($SFR = FRF_R/RF_R$; (Ben Ghazlen *et al.*, 2010). Nelle uve a bacca bianca, per esempio, la relazione tra l'accumulo dei solidi solubili e l'indice SFR è risultata molto significativa con valori del coefficiente di correlazione superiori a 0,9 (dati in corso di pubblicazione).

Recentissimi sviluppi dell'uso della spettroscopia in viticoltura puntano allo studio della fluorescenza della clorofilla per la valutazione anticipata dell'insorgenza di malattie, soprattutto di natura fungina. Un recente lavoro ha infatti dimostrato che l'accumulo di fitoalessine del gruppo degli stilbenoidi può essere stimato per via spettroscopica con qualche giorno di anticipo rispetto alla manifestazione dei sintomi da *Plasmopara*, con

evidenti vantaggi sia nella scelta dei prodotti antiparassitari (ad esempio può risultare conveniente intervenire scegliendo ad hoc prodotti più efficaci nelle prime fasi di sviluppo della malattia) o nella definizione del momento di inizio della malattia che è generalmente una informazione chiave per l'utilizzo dei tradizionali modelli previsionali (Latouche *et al.*, 2015).

Bibliografia

- Agati, G., Meyers, S., Mattini, P., Cerovic, Z.G. (2007). Assesment of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.) berries using a non-invasive chlorophyll fluorescence method. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1053-1061.
- Agati G., Cerovic Z., Pinelli P., Tattini M. (2011). Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques. *Envir. Exper. Botany* **73**, 3-9.
- Baluja J., Diago M.P., Balda P., Zorer R., Meggio F., Morales F., Tardaguila J., (2012). Assessment of vineyard water status variability by thermal and multispectral imagery using unmanned aerial vehicle (UAV). *Irrigation Science*, **30**: 511-522.
- Ben Ghozlen N., Cerovic Z.G., Germain C., Toutain S., Latouche, G. (2010). Non-destructive optical monitoring of grape maturation by proximal sensing. *Sensors* **10**, 10040-10068.
- Ferrandino A., Pagliarani C., Torchio F., Carlomagno A., Agati A., Schubert A., (2012). Metodi ottici non distruttivi per il monitoraggio della maturazione in uve a bacca colorata. Atti del IV Convegno nazionale di Viticoltura, CONAVI. TO, Asti, 10-12 luglio 2012. *Quaderni Vitic. Enol., Univ. Torino*, **32**: 391-396 (ISSN 1970-6545).
- Filippetti I., Allegro G., Valentini G., Pastore C. Colucci E., Intrieri C., (2013). Influence of vigour on vine performance and berry composition of cv Sangiovese (*Vitis vinifera* L.). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **47**: 21-33.
- Gonzalez-Flor C., Serrano L., Gorchs G., Pons J.M., (2014). Assessment of grape yield and composition using reflectance-based indices in rainfed vineyards. *Agronomy Journal*, **106**: 1309-1316.
- Lamb D.W., Weedon M.M., Bramley R.G.V. (2004). Using remote sensing to predict grape phenolics and colour at harvest in a Cabernet Sauvignon vineyard: timing observations against vine phenology and optimizing image resolution. *Aust J. Grape and Wine Research*, **10**: 46-54.
- Latouche G., Debord C., Raynal M., Milhade C., Cerovic Z.G., (2015). First detection of the presence of naturally occurring grapevine downy mildew in the field by a fluorescence-based method. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **14**: 1807-1813.
- Kriegler F.J., Malila W.A., Nalepka R.F., Richardson W., (1969). Preprocessing transformations and their effects on multispectral recognition. *Proceedings of the Sixth International Symposium on Remote Sensing of Environment*, p. 97-131.
- Vitali M., La Iacona T., Lovisolo C., Tamagnone M., (2013). Validation of vine canopy density measurements by using as ultrasonic-based method. *Acta Horticulturae*, **978**: 135-138.

Didascalie delle figure

Figura 1 – Relazione tra l'indice spettroscopico ANTH_RG – $\log(\text{FRF_R}/\text{FRF_G})$ e la concentrazione in antociani totali analiticamente misurata in uve di Barbera e Nebbiolo. In funzione del profilo antocianico del vitigno la relazione tra i due set di dati risulta diversa.

Figura 2 – Relazione tra l'indice spettroscopico FERARI - $\log 5000/\text{FRF_R}$, e la concentrazione in antociani totali analiticamente misurata in uve di Barbera e Nebbiolo. L'effetto vitigno non influisce sulla relazione.

Figura 3 – Relazione tra l'indice spettroscopico FLAV – $\log(\text{FRF_R}/\text{FRF_UV})$ e la concentrazione in flavonoli totali analiticamente misurati in uve di Chardonnay e Nascetta.

Ringraziamenti

Si desidera ringraziare i colleghi Antonio Carlomagno, Claudio Lovisolo, Chiara Pagliarani, Andrea Schubert, Marco Vitali per la collaborazione. Gli ex-tesisti Nicola Centonze, Giulio Spanu e Luca Padovani che hanno lavorato alla raccolta dei dati in stagioni diverse. Giovanni Agati per la disponibilità nella prolungata discussione critica dei dati.