

Determinazione ottica non-distruttiva in campo del contenuto di antociani in Sangiovese in funzione della gestione della chioma

Marco Valentini^{1,*}, Alessandro Magrini¹, Giovanni Agati²

¹Consorzio Tuscania – P.zza Strozzi 1, 50123 Firenze, Italia

²Istituto di Fisica Applicata ‘N. Carrara’ – CNR, v. Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze), Italia

*Autore corrispondente: Marco Valentini fax: 0558071971;

email: marco.valentini@consorziotuscania.it

RIASSUNTO

L’accumulo di antociani su grappoli di Sangiovese è stato valutato direttamente in situ mediante il sensore ottico Multiplex nell’ambito del progetto coordinato dal Consorzio Tuscania.

L’elaborazione statistica condotta sui vari indici non-distruttivi forniti dal Multiplex per il vitigno Sangiovese, ha permesso di costituire dei modelli per la stima del contenuto in antociani potenziali. La procedura utilizzata è la “*forward stepwise selection*”.

Il modello può discriminare la dinamica di maturazione degli antociani del medesimo clone impiantato in areali geografici diversi e confrontare le diverse dinamiche di maturazione fenolica riscontrabili in tesi sperimentali sfogliate rispetto alle tesi non sfogliate.

PAROLE CHIAVE

Maturazione fenolica, modello, Multiplex, regressione, sfogliatura.

TITLE

In field non-invasive optical assessment of anthocyanins in Sangiovese cultivar as function of canopy management

ABSTRACT

Anthocyanins were measured in situ on Sangiovese grape (*Vitis vinifera* L.) bunches with the Multiplex fluorescence portable sensor, during ripening.

Measures were recorded during the 2009 summer into four experimental vineyards managed by the Consorzio Tuscania research project.

A non invasive method was calibrated coupling several optical sensor indexes with the destructive analysis of anthocyanins from the same bunches, picked during ripening.

A statistical approach (*forward stepwise selection*) was performed on Sangiovese to develop an estimating model of potential anthocyanin content. Few among the Multiplex indexes were selected to improve the correlation with potential anthocyanins (A1 Glories method).

The developed model discriminates anthocyanin accumulation dynamic on the same Sangiovese clone, grown on different zones, underling differences in precocity and *terroir* vocation.

The actual model, moreover, is able to detect the difference in anthocyanin content due to early leaf removal as a canopy management factor in the research project.

KEY-WORDS

Defoliation, model, Multiplex, phenolic maturity, regression.

INTRODUZIONE

La quantità di antociani (Ant) delle uve è un parametro molto importante per la valutazione della qualità delle uve (Kennedy et al. 2006). In alcuni casi, come per il vitigno Sangiovese, la quantità degli Ant rappresenta un parametro utilizzato, a livello gestionale, per stabilire quale sarà la data ottimale per la vendemmia delle uve. Allo stesso modo, anche la dinamica di evoluzione degli Ant durante la maturazione delle uve può essere di aiuto per alcune scelte, come per esempio quelle relative agli interventi da effettuarsi sulla chioma in post-invaiatura.

La maturazione fenolica delle uve ed in particolare il contenuto in Ant, appare strettamente legato alla vigoria della pianta: le piante con forte vigore vegetativo forniscono uve scarsamente dotate in Ant, se paragonate alle piante in equilibrio vegeto-produttivo (Tramontana et al. 2010, Lamb et al. 2004).

L'effetto sulla qualità delle uve e sul contenuto in antociani ascrivibile alle tecniche di gestione della chioma (Pedò et al., 2010) è significativo, ma di minor entità rispetto alle differenze rilevate tra classi di vigore. Ciò deriva dai dati raccolti tra il 2007 e 2009 nell'ambito di un progetto di sperimentazione viticola integrata, attraverso diverse modalità di gestione della chioma, finanziato e coordinato dalla Società Consortile Toscana s.r.l., su 4 vigneti sperimentali in tre diverse aree a denominazione di origine della Toscana (Chianti Classico, Montegio di Massa Marittima e Bolgheri) presso alcune delle aziende vitivinicole socie del Consorzio (Barone Ricasoli - Castello di Brolio, Tenuta le Mortelle e Tenuta Donna Olimpia 1898).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di indagare, in aggiunta alle valutazioni previste dal piano sperimentale del progetto, l'influenza che i trattamenti sulla chioma

hanno sulle cinetiche di accumulo degli antociani durante il processo di maturazione delle uve.

Per fare ciò, si è utilizzato uno strumento, il Multiplex, capace di effettuare questo tipo di monitoraggio direttamente in campo (Agati et al. 2009) attraverso letture non distruttive di indici spettroscopici direttamente correlabili con il contenuto in antociani delle uve (Agati et al. 2007).

La discussione seguente si riferisce alle rilevazioni effettuate sui due vigneti sperimentali impiantati a Sangiovese (Monteregio di Massa Marittima e Barone Ricasoli - Castello di Brolio).

MATERIALI E METODI

La valutazione dell'accumulo di antociani direttamente in situ su grappoli di Sangiovese è stata eseguita mediante un sensore portatile a fluorescenza per ognuna delle parcelle del blocco ad alta vigoria (8 tesi) nei vigneti sperimentali gestiti dal Consorzio Toscana.

All'interno di ogni vigneto sperimentale sono stati disposti 4 blocchi sperimentali distribuiti ciascuno su zone di vigore vegetativo omogeneo, individuati per mezzo dell'analisi multispettrale (NDVI) di immagini aeree. All'interno di ciascun blocco sono state definite 8 tesi sperimentali in altrettante parcelle distribuite in modo randomizzato, derivanti dalla combinazione di tre differenti modalità di gestione della chioma:

- Carica gemme: a una gemma o a 3 gemme;
- Sfolgiatura precoce: non effettuata o effettuata;
- Diradamento dei grappoli: non effettuato o effettuato al 50%.

Per ognuna delle tesi sono state effettuate una serie di rilevazioni atte a descrivere i principali parametri microclimatici, biometrici ed analitici che influenzano lo stato vegeto-produttivo e la qualità finale delle uve.

Il piano sperimentale a blocchi randomizzati è stato strutturato sulla base di precise esigenze statistiche. Il progetto della durata complessiva di quattro anni è attualmente al suo ultimo anno di attività e dispone quindi dei dati per gli anni dal 2007 al 2009 compreso. Le uve sono state analizzate su un campione di grappoli interi in due date di vendemmia, tecnologica e di surmaturazione, a distanza di due settimane.

Il sensore ottico permette di calcolare alcuni indici correlati al contenuto di antociani su un'area del grappolo di circa 8 cm di diametro, da una distanza di 15 cm (Agati et al. 2009). Il Multiplex fornisce i valori, espressi in mV, dei segnali di fluorescenza emessi

dalla superficie dell'acino in seguito ad alcune eccitazioni luminose su specifiche lunghezze d'onda. I dati grezzi delle misure si compongono di 12 campi, ottenuti dalla combinazione dei canali di eccitazione nelle varie lunghezze d'onda (ultravioletto (UV), blu (B), verde (G) e rosso(R)) con quelli di rilevazione della fluorescenza (blu-verde (BG), rosso (R) e rosso lontano (FR)).

Le rilevazioni sono iniziate nei primi giorni d'agosto 2009 e sono terminate a metà settembre dello stesso anno, per un totale di 5 rilevamenti distribuiti lungo tutto il periodo di maturazione dei grappoli, dall'invasatura dei grappoli fino alla maturazione tecnologica. Le date di rilevazione sono state le seguenti:

- tempo 1: 04/08/09 e 06/08/09;
- tempo 2: 20/08/09 e 21/08/09;
- tempo 3: 26/08/09 e 27/08/09;
- tempo 4: 02/09/09 e 03/09/09;
- tempo 5: 17/09/09 e 18/09/09.

In ogni parcella si è proceduto analizzando 15 grappoli scelti arbitrariamente su entrambi i lati, più e meno esposti, dei filari in modo da avere un totale di 30 campioni.

La tecnica non distruttiva è stata calibrata su ognuno dei vigneti confrontando, per i medesimi grappoli, gli indici forniti dal sensore ottico con le analisi distruttive degli antociani totali di uve raccolte a diversi livelli di maturazione, al fine di ottenere delle curve di taratura su un range di antociani il più ampio possibile. Quindi, in ogni vigneto si è proceduto raccogliendo, in quattro distinte date, tre gruppi di grappoli a maturazione omogenea. Ogni gruppo di grappoli è stato analizzato in campo con il Multiplex e successivamente inviato come campione al laboratorio per le analisi distruttive, condotte secondo il metodo di determinazione degli antociani potenziali a pH 1 di Glories (1991).

Dalle misure con Multiplex si sono quindi calcolati alcuni indici che sono correlati al contenuto degli antociani (Agati et al. 2007, Cerovic et al. 2008). Gli indici sono stati calcolati e denominati come segue:

- $ANTH_R = \log(5000/FRF_R)$;
- $ANTH_B = \log(5000/FRF_B)$;
- $ANTH_UV = \log(5000/FRF_UV)$;
- $ANTH_G = \log(5000/FRF_G)$.

I canali di fluorescenza usati per il calcolo degli indici sono stati i 4 segnali nel rosso lontano (FRF) in seguito all'eccitazioni nel rosso, ultravioletto, blu e verde. La nomenclatura dei segnali si compone di una prima parte in cui viene riportato il canale di rilevazione della fluorescenza e di una seconda parte, dopo l'underscore, dove è presente il canale di eccitazione (es. ANTH_B utilizza il canale FRF, far red fluorescence e il canale di eccitazione del blu (B)).

La successiva elaborazione statistica, ha avuto la finalità di selezionare gli indici maggiormente correlati al contenuto in Ant delle uve e di costituire dei modelli di stima del contenuto in Ant. I dati sono stati analizzati con una procedura di selezione di modelli lineari, grazie ai quali si è riusciti a scegliere alcuni indici del sensore ottico come variabili esplicative di questo importante parametro di maturazione delle uve.

La correlazione con le analisi distruttive è stata valutata oltre che sulla base di quanto riportato da Cerovic et al. 2008 attraverso la costruzione di un indice composto, formato dagli indici selezionati sulla base dell'esito delle elaborazioni statistiche.

Dalle indagini effettuate si è scelto di utilizzare gli indici ANTH_B, ANTH_UV, ANTH_R e ANTH_G.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti i segnali indagati, con i relativi indici calcolati, mostrano delle variazioni durante la maturazione delle uve di Sangiovese.

Nella prima parte di questo lavoro si è tentato di quantificare una relazione tra il valore degli indici rilevati dal metodo non distruttivo e le reali concentrazioni degli antociani potenziali analizzati con metodi distruttivi, composti da 24 punti, compresi in un range di variazione degli antociani potenziali tra 100 e 1200 mg/kg.

Per far ciò si sono elaborati i dati raccolti per la taratura nei vigneti di Sangiovese (Brolio e Cortigliano) tramite una regressione multipla con procedura di selezione in avanti (*forward stepwise selection*).

Specificata la funzione esponenziale semplice come *trend function* per la variabile dipendente Y:

$$Y = \alpha * e^{\sum_i \beta_i X_i}$$

dove e è il numero di Nepero, α il parametro dell'intercetta e β_i ($i=1, \dots, J$) sono i coefficienti che descrivono il contributo delle J variabili dipendenti X_i inserite nel modello alla variazione di Y. La procedura calcola il miglior modello della variazione degli antociani potenziali sulla base dell'inserimento di un indice passo per passo.

Questa regressione è non lineare. Come metodo di stima dei parametri si è utilizzato l'algoritmo di minimi quadrati non lineari *Gauss-Newton* (Bates e Watts, 1988).

Il modello allo step corrente può essere valutato rispetto a quello allo step precedente in base ad alcuni criteri, di solito considerati congiuntamente:

- aumento della bontà di adattamento relativa (*Adjusted R-Squared*), che, a differenza della normale bontà di adattamento basata sul calcolo della devianza spiegata (*R-Squared*), può diminuire all'aumentare del numero dei parametri;
- significatività dei test T sui singoli β_i ,

- confronto tra il modello corrente ed il modello precedente sulla base della significatività del test ANOVA per modelli annidati.

Il criterio della valutazione della significatività presuppone di fissare una soglia di *p-value* (di solito da 0.05 a 0.1), che, qualora superata da tutti i test T sui singoli β_i o dal test ANOVA, suggerisce lo stop della procedura indicando la miglior situazione al passo precedente.

L'indice che la procedura seleziona per primo è ANTH_B, il maggiormente correlato agli antociani potenziali (*R-squared*: 0.820), ottenendo un *Adjusted R-Squared* di 0.812. Agli step successivi vengono rispettivamente inclusi ANTH_UV, ANTH_R e ANTH_G, facendo, ad ogni passo, aumentare sensibilmente l'*Adjusted R Squared* (da 0.835 a 0.861).

Il criterio della valutazione della significatività dei coefficienti suggerisce poi la selezione del modello con 4 indici, per cui la bontà di adattamento (*R-Squared*) vale 0.886, ovvero spiega l'88.6% della variazione degli antociani potenziali.

Il modello di stima selezionato è formalmente definito:

$$E(\text{AntPot} \mid \text{ANTH}_B, \text{ANTH}_{UV}, \text{ANTH}_G, \text{ANTH}_R) = \\ = 831.877 e^{(3.034 \text{ ANTH}_B - 1.702 \text{ ANTH}_{UV} - 1.136 \text{ ANTH}_G + 1.123 \text{ ANTH}_R)}$$

ed è caratterizzato da un errore standard residuo di 111 mg/kg.

In Fig. 1 è riportata come esempio la predizione degli antociani nei vigneti di Brolio (Chianti Classico) e Cortigliano (Monteregio di Massa Marittima) in base a tale modello. Sono riportate anche le barre dell'errore standard, che rappresentano il range di variazione plausibile delle stime in base alla precisione del modello.

Per ogni data di rilevazione, il valore riportato sul grafico è stato calcolato come la media dei 240 (30 x 8 tesi) grappoli misurati in ognuno dei vigneti.

Il dato fornito dal modello rispecchia pienamente quanto appreso dalle analisi distruttive nei tre anni di sperimentazione:

- alla prima data di rilievo si evidenzia come il Sangiovese impiantato sulla costa sia nettamente più precoce rispetto al Sangiovese dell'entroterra. Ciò è confermato, oltre che dalle analisi distruttive, anche dai rilievi delle fasi fenologiche, dato questo che denota una precocità del Montereccio di Massa Marittima di circa 10-15 giorni rispetto al Chianti Classico;
- i quattro successivi rilievi invece mettono in risalto la diversa vocazionalità territoriale dei due casi di studio. Il territorio del Chianti Classico infatti consente al Sangiovese di sintetizzare una quantità superiore di antociani, tendenza che, nonostante il ritardo fenologico, è possibile osservare già dalla terza data di rilievo.

Andando più nel dettaglio si osservano i risultati del monitoraggio delle singole tesi relative alla gestione della chioma.

L'elaborazione delle analisi distruttive dei tre anni di sperimentazione al Consorzio Toscana, indicano la sfogliatura precoce come il trattamento in grado di influenzare maggiormente la capacità di sintesi degli antociani (Pedò et al., 2010). Il modello è stato impiegato per la stima degli antociani potenziali dai dati delle tesi sperimentali aggregati in funzione della presenza o assenza del trattamento di sfogliatura. In questo caso, ogni punto del grafico si basa su 120 campioni per data di rilevazione.

Si riporta la dinamica di maturazione osservata tramite il modello predittivo per gli antociani potenziali nel vigneto di Brolio (Fig. 2). Come nel caso precedente, la descrizione dell'andamento nelle cinque date di campionamento non-distruttivo, riesce a fornire informazioni aggiuntive rispetto a quanto finora monitorato con le sole analisi distruttive, limitate a 2 campionamenti temporali. Infatti:

- i due andamenti discriminano le tesi sfogliate da quelle non sfogliate. In particolare il modello assegna valori più elevati alle tesi sfogliate, in completo accordo con quanto emerso dalle analisi distruttive relative ai tre anni di sperimentazione;
- l'andamento che descrive gli antociani potenziali stimati per le tesi sfogliate ha una pendenza maggiore rispetto all'andamento relativo alle tesi non sfogliate. L'ultimo punto delle tesi sfogliate è fuori dal range preso in esame con la taratura e quindi è da considerare con estrema cautela.

CONCLUSIONI

Il Multiplex si è dimostrato uno strumento capace di effettuare direttamente nel vigneto un numero di campionamenti molto elevato in tempi relativamente bassi.

Tutti i segnali indagati, con i relativi indici calcolati, mostrano delle variazioni durante la maturazione delle uve di Sangiovese.

Fra gli indici esaminati per descrivere la dinamica di accumulo degli antociani in Sangiovese, il migliore è risultato ANTH_B, in quanto maggiormente correlato alla variazione degli antociani potenziali nel tempo. Studi precedenti in cui l'indice ANTH_R era il miglior stimatore della maturità fenolica (Agati et al., 2009; Cerovic et al., 2008) non avevano preso in considerazione questo indice.

Tuttavia nell'elaborazione statistica, anche ANTH_R, assieme a ANTH_UV ed ANTH_G, è stato selezionato tra gli indicatori più significativi nella spiegazione della variabilità degli antociani potenziali da analisi distruttiva.

Infine, il modello proposto discrimina la diversa potenzialità enologica dei terroir del Montereio di Massa Marittima e del Chianti Classico oltre agli effetti di alcune tecniche agronomiche, come la sfogliatura.

BIBLIOGRAFIA

AGATI G., MEYER S., MATTEINI P., CEROVIC Z. G., 2007. *Assessment of anthocyanins in grape (Vitis vinifera L.) berries using a non-invasive chlorophyll fluorescence method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 1053-1061.

AGATI G., MATTII G., TUCCIO L., REMORINI D., TONUTTI P., SCALABRELLI G., 2009. *Non destructive in vineyard monitoring of winegrape phenolic maturity using a portable fluorescence sensor*. In: F. Cecchi, M. Greven, S. Minguéz, P. Foladori, D. Bolzonella ed., Proceedings of the 5th International specialized conference on

sustainable viticulture: winery waste and ecologic impacts management – Winery 2009, Università degli Studi di Trento (Trento): 455-458.

BATES D. M., WATTS D. G., 1988. *Nonlinear Regression Analysis and Its Applications*. Wiley

BATES D. M., CHAMBERS J. M., 1992. *Nonlinear models*. In: J. M. Chambers, T. J. Hastie ed., *Statistical Models in S*, Wadsworth & Brooks/Cole.

CEROVIC Z. G., MOISE N., AGATI G., LATOUCHE G., BEN GHOZLEN N., MEYER S., 2008. *New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence*. Journal of Food Composition and Analysis, 21: 650-654.

GLORIES Y., 1999. *La maturità fenolica delle uve: primo parametro da controllare per una corretta vinificazione in rosso*. Vignevini, 3: 46-50.

KENNEDY J., SAUCIER C., GLORIES Y., 2006. *Grape and wine phenolics: history and perspective*. American Journal of Enology and Viticulture, 57: 239-248.

LAMB D. W., WEEDON M. M., BRAMLEY R. G. V., AUST J., 2004. *Using remote sensing to predict grape phenolic and colour at harvest in a Cabernet Sauvignon Vineyard: timing observations against vine phenology and optimizing image resolution*. Grape Wine Res. 10: 46-54.

PEDO' S., PORRO D., ZORER R., MAGRINI A., 2010. *A ogni vite la sua chioma*. VQ, 3: 14-20.

TRAMONTANA G., PAPALE D., BELLI C., TIBERI D., COMANDINI M. C., PIETROMARCHI P., 2010. *Il telerilevamento aereo a supporto della viticoltura di precisione*. L'enologo, maggio 2010: 1-5.

Figura 1. Valore predetto degli antociani nella cv Sangiovese sulla base del modello per i vigneti di Brolio e Cortigliano. Per ogni data di rilevazione, il valore è la media (\pm SD) di 240 campioni.

Figure 1. Anthocyanin values in the cv Sangiovese predicted by the developed model for the Brolio and Cortigliano vineyards. Each point is the average (\pm SD) of 240 bunches.

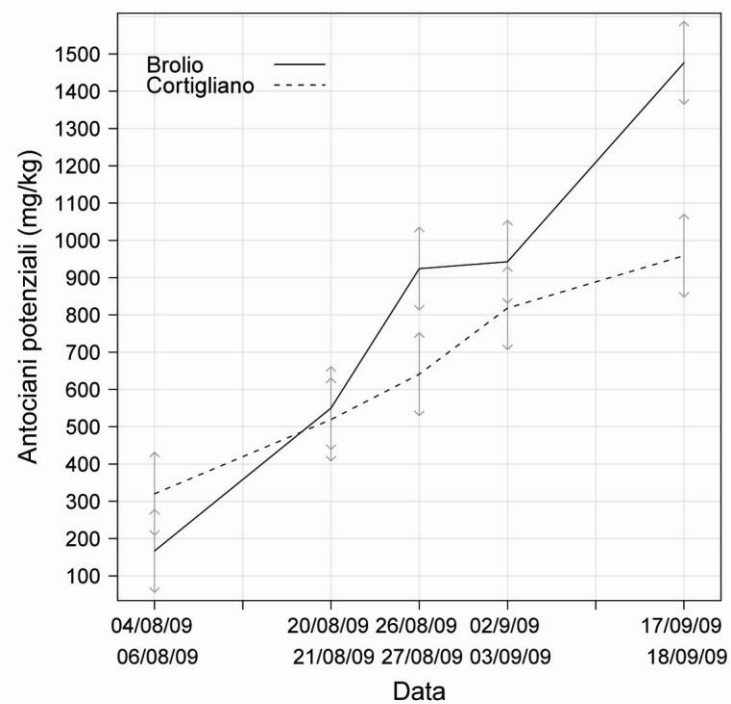


Figura 2. Valore predetto degli antociani nella cv Sangiovese sulla base del modello per il vigneto di Brolio: confronto fra tesi sfogliate (A1) e tesi non sfogliate (A0). Per ogni data di rilevazione, il valore è la media (\pm SD) di 120 campioni.

Figure 2. Anthocyanin values in the cv Sangiovese predicted by the developed model for the Brolio vineyard: comparison between defoliated (A1) and non defoliated (A0) treatments. Each point is the average (\pm SD) of 120 bunches.

