

STUDIO DEL COMPORTAMENTO DELLA “PATINA BIANCA” SU MELE IN CONSERVAZIONE

D. ANGELI, V. GUALANDRI, L. TURRINI, F. ZENI, G. DALLAGO, T. ROMAN
Fondazione Edmund Mach - Centro Trasferimento Tecnologico - Via E. Mach 1
San Michele all'Adige 38010 (TN)
dario.angeli@fmach.it

RIASSUNTO

Lo studio ha avuto lo scopo di approfondire le conoscenze sul comportamento di *Tilletiopsis* spp., quale agente dell'alterazione dei frutti di melo nota come “patina bianca”, in condizioni di conservazione. La prova è stata svolta tra il 2018 e 2019 in celle frigorifere ad atmosfera controllata. *Plateau* di mele sane (controllo) e *plateau* con mele affette da un diverso grado di attacco di *Tilletiopsis* spp. sono stati impilati in maniera alternata in cella. Durante i mesi di conservazione si è seguita l'evoluzione del patogeno sull'epicarpo dei frutti. Dai risultati emersi non si è evidenziata, nelle condizioni saggiate, alcuna significativa intensificazione del sintomo in quanto le mele hanno mantenuto lo stesso grado di infezione osservato alla raccolta. È stata altresì verificata la capacità di diffusione del patogeno da mele infette a mele sane ed anche in questo caso non è stato riscontrato l'instaurarsi di nuovi sintomi sui frutti. Nel corso delle indagini, sui frutti colpiti da *Tilletiopsis* spp., è stata osservata una colonizzazione di aspetto fuliginoso della superficie del frutto da parte di complessi fungini associabili alle fumaggini. La loro identificazione ha evidenziato in via preliminare l'appartenenza perlopiù ai generi *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aureobasidium* ed altri miceti la cui identificazione è ancora in corso.

Parole chiave: *Tilletiopsis*, fumaggini

SUMMARY

STUDY OF BEHAVIOR OF “WHITE HAZE” ON APPLE FRUITS DURING STORAGE

The study aimed at increasing the knowledge of the behavior of *Tilletiopsis* spp., as an agent causing "white haze" disease during storage. Four-months trial was performed between 2018 and 2019 in controlled atmosphere (CA) cold rooms. Trays of healthy apples (control) and others affected by a different degree of white haze disease by *Tilletiopsis* spp. were stored under CA conditions and the dynamic of development of the pathogen on the fruit epicarp was monitored during storage. Results showed no significant intensification of the symptom, thus apples retained the same degree of infection observed at harvest. The ability of the pathogen to spread from infected to healthy apples was also verified and also in this case no evidence of new symptoms on the fruits was found. Furthermore, during the investigations, fruits affected by *Tilletiopsis* spp. showed sooty appearance associated with sooty blotch complex (SBFS). These were mostly saprophytic fungi belonging mainly to the genus *Alternaria*, *Cladosporium* and *Aureobasidium* and other fungi are still under characterization.

Keywords: *Tilletiopsis*, sooty blotch complex

INTRODUZIONE

La “patina bianca” è una alterazione dei frutti di melo che si manifesta in forma di pellicola superficiale biancastra tenacemente aderente alla cuticola, distribuita sull'epicarpo a chiazze e localizzata prevalentemente in corrispondenza della cavità peduncolare (Weber et al., 2011). Si tratta di una alterazione segnalata per la prima volta in Olanda e Germania nel 2005

imputabile principalmente a ifomiceti appartenenti al genere *Tilletiopsis* spp. (Lindner, 2006).

In Italia le prime manifestazioni di patina bianca risalgono al 1999 in Alto Adige, quando l'alterazione era del tutto sconosciuta e le informazioni sulla eziologia erano scarse e contraddittorie (Lindner et al., 2006). Dati recenti imputano a diverse specie di *Tilletiopsis*, tra le quali *Tilletiopsis pallescens* e *Tilletiopsis washingtonensis*, insieme ad un'altra specie a queste molto vicina appartenente alla famiglia delle Entylomataceae la responsabilità della malattia. La patina bianca è favorita da un clima caldo-umido nel periodo primaverile ed estivo e colpisce indistintamente tutte le varietà, prediligendo i frutti dislocati nelle parti più ombreggiate della pianta. Nel corso degli ultimi anni ai sintomi di patina bianca è stata spesso associata la presenza di rugginosità pertanto non è da escludere una possibile interazione con agenti biotici di rugginosità quali *Aureobasidium pullulans* e *Rhodotorula glutinis* (Lindner, 2009).

Frequentemente, sui frutti colpiti da patina bianca, si sviluppano manifestazioni d'aspetto fuliginoso, associabili al complesso noto con il nome di fumaggini. Al complesso delle fumaggini appartengono diversi generi di funghi che possono variare in base al luogo e all'anno rendendo così difficile l'imputazione dell'eziologia (Gleason et al., 2019). La colonizzazione della cuticola del frutto da parte di patina bianca è causa di grave deprezzamento qualitativo del prodotto con conseguente danno economico. Esperimenti di campo con diversi fungicidi tradizionalmente impiegati in frutticoltura hanno dimostrato un certo grado di efficacia di alcuni principi attivi quali ditianon, dodina e captano nel contenimento di "patina bianca" (Boekhout et al., 2006). Ciononostante, in annate con forte pressione del patogeno, i risultati si sono dimostrati spesso insoddisfacenti.

Considerando che questa alterazione può svilupparsi e protrarsi sulle mele anche durante la fase di conservazione, scopo di questa sperimentazione è stato approfondire le conoscenze sull'evoluzione della patina bianca in condizioni di frigoconservazione.

MATERIALI E METODI

Conservazione in cella frigorifera ad atmosfera controllata

Lo studio è stato condotto durante il periodo di conservazione delle mele tra ottobre 2018 e gennaio 2019 presso le celle frigorifere ad atmosfera controllata della Fondazione Edmund Mach (FEM) di S. Michele a/A (Trento).

Le mele utilizzate (cultivar Golden Delicious) provenivano da un frutteto gravemente colpito da patina bianca (PB) nel corso della stagione produttiva 2018. Il disegno sperimentale (tabella 1 e 2) prevedeva che le mele, una volta selezionate in base alla classe di sintomo osservato (lieve-medio-grave), venissero posizionate all'interno di *plateaux* monostrato (30 mele per *plateaux* e 6 *plateaux* per tesi) in blocchi randomizzati in una cella frigorifera alla temperatura di 1,5°C, U.R. >90%, in condizione di atmosfera controllata (AC), con O₂ 1.4-1,6% e CO₂ 0.9-1%. Parallelamente, una seconda prova veniva allestita combinando 6 *plateau* monostrato per tesi dove 15 mele sane venivano posizionate adiacenti a 15 mele con diverso grado di infezione di PB allo scopo di poter verificare la capacità di insorgenza di nuovi sintomi di PB dovuta al contatto tra frutti infetti e frutti sani.

Il rilievo dei sintomi di PB è stato eseguito a 0, 60 e 120 giorni, valutando il numero di frutti colpiti (incidenza) e la % di superficie infetta da PB (grado di attacco) di tutti i 30 frutti contenuti nei 6 *plateau* di ciascuna tesi, per un totale di 180 frutti.

I dati sono stati elaborati mediante analisi della varianza Anova e successivo test di Tukey per la separazione delle medie tra i gruppi (software utilizzato Statistica ver.13).

Tabella 1. Prova di diffusione di PB su mele cv. Golden Delicious

Livelli di inoculo di PB	Tesi a confronto	Incidenza (%)	Grado di attacco (%)
Mele sane (controllo)	Sano	0	0
Mele con sintomo lieve	PB lieve	100	8
Mele con sintomo medio	PB medio	100	33
Mele con sintomo grave	PB grave	100	76

Tabella 2. Prova di contatto di PB tra mele cv. Golden Delicious

Livelli di inoculo di PB	Tesi a confronto	Incidenza (%)	Grado di attacco (%)
Mele sane (controllo)	Sano	0	0
Mele sane + mele con sintomo lieve	Sano + PB lieve	50	4
Mele sane + mele con sintomo medio	Sano + PB medio	50	13
Mele sane + mele con sintomo grave	Sano + PB grave	50	39

Isolamento degli agenti di patina bianca

L'isolamento degli agenti responsabili di patina bianca è stato condotto seguendo lo "spore fall method" descritto da Wang-Ching et al. (1997) secondo il quale porzioni di epicarpo, in questo caso della misura di 1 cm², una volta prelevati in condizioni di sterilità sono stati posizionati grazie ad un velo di vaselina sulla superficie interna del coperchio della piastra Petri contenete PDA+RB+C (Potato Dextrose Agar, Rose bengala e Chloramphenicol). Dopo 7 giorni di crescita al buio a temperatura ambiente sono comparse colonie di aspetto untuoso e lievitifforme, con margine frastagliato e con una caratteristica crescita che si espande verso l'alto. Una volta ottenute le colonie monosporiche, al riconoscimento morfologico è stato associato quello molecolare con amplificazione della regione ITS (*primer* ITS4/ITS5) seguita da sequenziamento e confronto delle sequenze ottenute con quelle depositate in GenBank. Per l'isolamento dei patogeni responsabili delle fumaggini, 1 cm² di epicarpo è stato immerso in acqua sterile e lasciato in agitazione per 15 minuti al termine dei quali il surnatante è stato seminato tal quale e diluito 1:10 in piastra Petri contenente PDA+C (Potato Dextrose Agar e Chloramphenicol). Gli isolati ottenuti morfologicamente diversi tra loro sono stati sottoposti a caratterizzazione morfologica e molecolare mediante sequenziamento della stessa regione ITS come riportato in precedenza.

RISULTATI

Conservazione in cella frigorifera ad atmosfera controllata

Nel corso del 2018 in Trentino è stata riscontrata un'importante manifestazione di PB soprattutto in frutteti ubicati in zone umide, poco soleggiate e ventilate. Le mele di cv. Golden Delicious impiegate per le prove di conservazione in AC con valutazione della diffusione e insorgenza di nuovi sintomi per contatto provenivano dalla Valsugana (Levico), zona storicamente soggetta ad una elevata pressione di questo patogeno.

I sintomi osservati sui frutti al momento della raccolta e prima del posizionamento in cella frigorifera (figura 1) erano facilmente riconducibili al fungo epifita *Tilletiopsis* spp.. La conferma dell'agente eziologico è avvenuta con isolamento e caratterizzazione molecolare presso il laboratorio di fitopatologia e diagnostica della FEM. I risultati preliminari hanno confermato la presenza di tre diverse specie: *Tilletiopsis pallescens*, *Tilletiopsis washingtonensis* e di una specie appartenente al genere *Entyloma* sp.

I risultati del monitoraggio della diffusione del fungo hanno mostrato una scarsa o nulla capacità del patogeno di proliferare durante la conservazione delle mele (tabella 3). Dopo 120 giorni di conservazione in AC non sono state riscontrate differenze significative sul grado di attacco in nessuna delle tesi con diverso potenziale di inoculo. Anche in presenza di sintomi gravi alla raccolta (76%), PB non ha invaso la restante superficie sana del frutto. Dopo 120 giorni infatti la superficie colpita era solamente dell'82%, il 6% in più rispetto alla raccolta, tuttavia statisticamente non differente.

Tabella 3. Grado di attacco (%) e incidenza (%) media di PB su mele cv. Golden Delicious

Prova	Tesi a confronto	0 giorni		60 giorni		120 giorni	
		Incidenza (%)	Grado attacco (%)	Incidenza (%)	Grado attacco (%)	Incidenza (%)	Grado attacco (%)
Diffusione	Sano	0	0	0	0	0	0
	PB lieve	100	8	100	11	100	11
	PB medio	100	33	100	38	100	35
	PB grave	100	76	100	75	100	82
Contatto	Sano	0	0	0	0	0	0
	Sano + PB lieve	50	4	50	3	50	4
	Sano + PB medio	50	13	50	13	50	15
	Sano + PB grave	50	39	50	42	50	44

D'altra parte, le condizioni di conservazione stabilite non hanno comunque consentito nemmeno una riduzione dei valori riscontrati alla raccolta e la pressione del patogeno si è mantenuta costantemente sugli stessi valori. Da notare che le mele asintomatiche (sane) provenienti da frutteto colpito da PB si sono mantenute comunque prive di sintomi di PB dopo 120 giorni di conservazione.

Considerando invece la prova di contatto in cui lo scopo era quello di valutare il potenziale di contagio tra i frutti, non è stata rilevata l'insorgenza di nuovi sintomi di PB sui frutti sani e quindi alcuna variazione dell'incidenza e gravità della malattia in nessuno dei livelli di inoculo testati. I frutti sani, pur a contatto con quelli infetti, non hanno manifestato sintomi di PB durante tutti i 120 giorni di conservazione.

Infine, sui frutti con presenza di PB si è stato osservato lo sviluppo di colature fuliginose ascrivibili ad agenti di fumaggini a partire da 60 giorni di conservazione (figura 1). La gravità delle infezioni incrementava proporzionalmente alla presenza di PB e all'aumentare del periodo di conservazione arrivando a raggiungere anche un'incidenza del 100% su mele con PB grave dopo 120 giorni di conservazione. Questo quadro sintomatologico ha contribuito ad alterare e peggiorare ulteriormente la qualità della mela in conservazione.

Figura 1. PB su cv. Golden Delicious alla raccolta 2018 (sinistra) e fumaggini insorte dopo 60 giorni di conservazione in AC su frutti con lievi infezioni di PB (destra)



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La conservazione rappresenta una fase molto importante della filiera produttiva delle mele poiché il mercato del consumo fresco si sta orientando sempre più verso una lunga conservazione ed è perciò fondamentale preservare tutte le caratteristiche qualitative e sanitarie.

Lo studio in oggetto, condotto in Trentino, si poneva l'obiettivo di approfondire la conoscenza relativa al comportamento di *Tilletiopsis* spp., agente di inestetismo dei frutti denominato "patina bianca", durante le condizioni di conservazione in atmosfera controllata delle mele. *Tilletiopsis pallescens*, *Tilletiopsis washingtonensis* ed *Entyloma* sp. sono stati isolati dalle mele sintomatiche oggetto di studio confermando l'eziologia della malattia come riportato in Alto Adige, Friuli Venezia Giulia e Piemonte (Baric et al., 2010). Osservando l'evoluzione della sintomatologia sull'escarpo dei frutti in cella frigorifera non si è evidenziata alcuna significativa intensificazione del sintomo considerando che le mele in tutti e tre i gradi di attacco considerati (lieve-medio-grave) hanno mantenuto lo stesso livello di infezione per tutta la durata della prova. Anche per quanto riguarda l'insorgenza di nuove infezioni sui frutti a contatto non si è riscontrata nessuna evidenza.

Nel corso delle indagini, sui frutti colpiti da *Tilletiopsis* spp., è stata invece riscontrata una massiccia proliferazione di patogeni associati alle cosiddette "fumaggini del melo" appartenenti al genere *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Rodothorula* e *Sporobolomyces*. La loro manifestazione durante la conservazione ha danneggiato ulteriormente l'epidermide delle mele e determinato la perdita di valore e commerciabilità soprattutto di quelle che presentavano solo lievi infezioni di PB. Da notare che, anche mele asintomatiche raccolte da frutteti colpiti da PB, presentavano dopo 60 giorni di conservazione i primi sintomi di fumaggini.

Mele con sintomi di PB riscontrati alla raccolta nei frutteti e talvolta già evidenti a partire dalla tarda primavera o inizio estate, hanno mantenuto inalterato il loro aspetto estetico durante la conservazione probabilmente perché i patogeni responsabili non hanno trovato le condizioni per riprodursi e proliferare. Le condizioni di alta UR necessarie per una buona conservazione delle mele sembrano rappresentare invece una condizione fortemente favorevole alla proliferazione del complesso delle fumaggini del melo che possono deteriorare il prodotto già dopo 60 giorni di conservazione.

Ringraziamenti

Si ringraziano Ivan Caset, Marcello Zeni, Andrea Sandri, Paolo Zanoni e Andrea Waldner per il supporto tecnico e la preparazione dei materiali, i frutticoltori per la messa a disposizione delle proprie aziende agricole, l'Associazione dei Produttori Ortofrutticoli Trentini e la Provincia Autonoma di Trento per il finanziamento delle attività di sperimentazione.

LAVORI CITATI

- Baric S., Lindner K., Marshall K., Dalla Via J., 2010. Haplotype diversity of *Tilletiopsis* spp. causing white haze in apple orchards in Northern Italy. *Plant Pathol.* 59, 535-514.
- Boekhout T., Gildemacher P., Theelen B., Muller W.H., Heijne B., Lutz M., 2006. Extensive colonization of apples by smut anamorphs causes a new postharvest disorder. *FEMS Yeast Res.* 6, 63-76.
- Gleason M.L., Zhang R., Batzer J.C., Sun G., 2019. Stealth Pathogens: the sooty blotch and flyspeck fungal complex. *Annu Rev of Phytopatol.* 57, 135-164.
- Lindner L., 2006. La "patina bianca" (*Tilletiopsis* spp.) una nuova manifestazione patologica delle mele. *Frutta e vite* 3, 95-97.
- Lindner L., Baric S., 2006. La "patina bianca": una nuova alterazione che danneggia l'epidermide della mela. *Informatore fitopatologico* 12, 60-62.
- Lindner L., 2009. "Patina bianca", rugginosità, fumaggine: L'Alto Adige si interroga sui sistemi per prevenire i danni alle mele. *Frutticoltura* 71, 58-62.
- Wang-Ching H., Wen-Hsiung K., 1997. A single method for obtaining single-spore isolates of fungi. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 38, 41-44.
- Weber R.W.S, Zabel D., 2011. White haze and scarf skin, two little known cosmetic defects of apples in Northern Germany. *Europ. J. Hort. Sci* 76, 45-50.