

PREVENZIONE DELLE INFEZIONI POSTRACCOLTA CAUSATE DA
PENICILLIUM EXPANSUM Lk. SU PERE (CV CONFERENCE) CON
VAPORI DI ACETALDEIDE.

D.CACCIONI, M.BLANCO, A.FOLCHI - CrioF - Università di
Bologna

RIASSUNTO

Sono state effettuate prove di lotta alle infezioni di *P.expansum* Lk. verificando l'azione di vapori di acetaldeide (AA). La sperimentazione è stata compiuta *in vitro* ed *in vivo* utilizzando per queste ultime frutti di pera (cv Conference) feriti con ago ed inoculati con concentrazioni pari a 10^6 conidi/mL di *P.expansum*.

Dalle prove *in vitro* è risultata una CMI (Concentrazione Minima Inibitoria) di 15000 ppm per una esposizione di 24 ore ai vapori di AA. Le prove *in vivo* hanno verificato l'azione di concentrazioni fra le 10000 e le 75000 ppm di AA con differenti durate (24 ore e 5 giorni) e temperature di effettuazione dei trattamenti (20-10-0°C).

Trattamenti con 35000 ppm hanno consentito ottimi risultati dopo periodi a 20° successivi al trattamento variabili fra i 3 ed i 7 giorni, a seconda della temperatura di vaporizzazione e della durata di esposizione adottate.

SUMMARY

PREVENTION OF POSTHARVEST ROTS BY *PENICILLIUM EXPANSUM*
Lk. ON PEAR (CV CONFERENCE) WITH ACETALDEHYDE VAPOUR.

In vitro and *in vivo* trials were conducted for the control of *Penicillium expansum* Lk. infection using acetaldehyde (AA) vapours. The *in vivo* trials were carried out on pears (cv Conference) which were injured and inoculated with a spore suspension of *P.expansum* at a concentration of 10^6 conidia/mL. Under *in vitro* conditions, the Minimum Inhibitory Concentration (M.I.C.) was found to be 15000 ppm for a 24 hr exposure to AA vapours. *In vivo* trials were aimed at to determining the action of AA concentrations between 10000 and 75000 ppm for different exposure times (24 hrs and 5 days) and temperatures (20,10,0°C). Treatment with an AA concentration of 35000 ppm gave a high percentage of healthy fruits after storage at 20°C for periods of 3 to 7 days after treatment, depending on the vapourisation temperature and on exposure times adopted.

INTRODUZIONE

L'acetaldeide (AA) è un composto normalmente presente nei tessuti dei frutti di pomacee durante i processi di maturazione (Nursten,1970; Fidler,1968).

L' AA deriva dalla decarbossilazione dell'acido piruvico (in presenza di NADH l' AA può essere ridotta ad etanolo); sia l'AA che l'etanolo possono essere successivamente trasformati in acetilCoA, molecola di partenza di numerosi processi metabolici (Cossins,1978).

L'AA fa parte della componente volatile caratterizzante l'aroma delle pomacee (Nursten,1970) ed inoltre la sua presenza è particolarmente rilevante in frutti conservati in Atmosfera Controllata (Fidler,1968; Folchi et al.,1993; Pesis et al., 1989). L'AA è anche utilizzata come aromatizzante dei cibi e il suo uso è regolamentato dalla legislazione di diversi paesi (Anonimo,1990).

Sebbene vi siano delle controversie riguardo il ruolo dell'AA nei processi di maturazione-senescenza (Fidler,1968; Janes e Frenkel,1978; Smagula e Bramlage,1977), applicazioni con AA sono state studiate per migliorare le caratteristiche qualitative dei frutti e per rallentare i processi di maturazione (Lurie e Pesis,1992; Paz et al. 1982; Pesis e Avissar,1988; Pesis et al.,1989; Pesis e Frenkel, 1989).

L'AA può influire sui processi infettivi postraccolta da parte di miceti: l'efficacia fungistatica di trattamenti con CO₂ è stata anzi attribuita proprio all'accumulo di AA nei tessuti (Shaw,1969).

Anche alcuni miceti antagonisti (es. *Trichoderma viride*) producono notevoli quantitativi di AA, ritenuta corresponsabile della loro attività antibiotica (Robinson e Park,1966; Robinson et al. 1968).

L'uso di AA come sostanza fungitossica è stato sperimentato già nei primi anni '70 (Aharoni e Stadelbacher,1973); gli studi sono stati poi ripresi recentemente con sperimentazioni *in vivo* su uva e drupacee (Avissar et al.,1991; Caccioni e Guizzardi, 1992).

Con il presente studio, effettuato nell'ambito di una più vasta sperimentazione riguardante le sostanze naturali ad azione fungitossica, si è inteso indagare l' efficacia di trattamenti con vapori di AA sulla insorgenza di infezioni di *Penicillium expansum* Lk. predisponendo prove *in vitro* ed *in vivo* su pere.

MATERIALI E METODI

E' stata studiata l' efficacia di trattamenti con AA a concentrazioni fra le 10000 alle 75000 ppm (v/v aria). Per ogni concentrazione sono state previste durate di esposizione ai vapori di 24 ore e 5 gg.

Inizialmente sono state effettuate prove *in vitro* riguardanti la germinazione di conidi di *P. expansum* e successivamente prove *in vivo* utilizzando pere (cv Conference) inoculate con il medesimo micete.

La vaporizzazione dell'AA è stata effettuata in cabine di apposito disegno con volume di 100 dm³. La miscela aria/AA veniva insufflata all'interno e ricircolata in continuo con flusso di 200 dm³/ora.

I testimoni venivano rinchiusi entro cabine in cui era ricircolata esclusivamente aria.

Prove in vitro

Su blocchetti di 50 mm² di agar glucosio (10 g glucosio, 17 g agar Oxoid n°3) posti all'interno di una piastra Petri multiventilata (Bibby-Sterilin Ltd.) veniva posta una goccia di 20 µL di sospensione contenente 10⁵ spore/mL ottenute *in vitro* da colture monoconidiche.

I blocchetti venivano successivamente esposti a differenti concentrazioni di vapori di AA per 24 ore.

Erano previsti controlli dopo 24,48,72 e 144 ore dal termine della esposizione. Ogni controllo era compiuto su 5 blocchetti (ripetizioni). Per ogni ripetizione erano osservati al microscopio 100 conidi scelti a caso dopo che la germinazione era stata bloccata con blu di lattofenolo. Venivano considerate germinate esclusivamente i conidi con una ifa premiceliare di lunghezza superiore al diametro della spora stessa.

L'analisi dei risultati ha previsto la determinazione della CMI (Concentrazione Minima Inibitoria).

Prove in vivo

Oltre all'effetto della concentrazione e della durata di esposizione è stato studiato l'effetto della temperatura durante il trattamento con AA. Per ogni concentrazione e per ogni tempo di esposizione le prove sono state ripetute a 20, 10 e 0°C. Le prove effettuate a 0°C sono state realizzate unicamente con durata di esposizione di 5 gg. .

Per ogni prova venivano predisposte 4 ripetizioni di 20 frutti ognuna.

I frutti erano feriti su due facce con ago sterile (ferita: prof.1,5 mm diam.1mm) e successivamente inoculati con sospensioni (conc.10⁶ conidi /mL) di *P.expansum*. Dopo asciugatura i frutti venivano posti all'interno delle cabine di trattamento.

Al termine della vaporizzazione le cabine venivano ventilate per 1 ora con un flusso di aria forzata (10 m³/ora). I frutti erano successivamente posti all'interno di contenitori plastici (UR 95%) a 20°C. Giornalmente veniva rilevato il numero di marciumi e il diametro delle lesioni (2 rilievi ortogonali).

I risultati sono stati elaborati attraverso test di analisi fattoriale della varianza seguiti dalla definizione, ove opportuno, della D.M.S. .

RISULTATI

Nelle prove *in vitro*, dopo 144 ore dal termine della esposizione, è stata definita una MIC di 15000 ppm.

Le prove *in vivo* riguardanti l'utilizzazione di vapori di AA alla temperatura di 20°C (tab.1,2) hanno evidenziato un'effetto fungistatico

totale o pressochè totale della durata di 3 giorni dal termine del trattamento, per concentrazioni pari o superiori alle 35000 ppm e per entrambe le durate di esposizione (24 ore-5 gg.). Con 20/25000 ppm una azione fungistatica totale della medesima persistenza si è evidenziata solo con durata di esposizione di 5 giorni.

L'analisi della varianza ha messo in luce una differenza significativa fra le variabili analizzate e le loro interazioni (tab.2).

Trattamenti con AA effettuati a 10°C (tab.3) hanno mostrato un effetto fungistatico rilevante da parte di tutte le concentrazioni provate dopo 4 gg. a 20°C. Dopo 6 gg. dal termine del trattamento una azione fungistatica interessante è ancora presente per le concentrazioni pari o superiori alle 35000 ppm.

L'analisi della varianza (tab.4) mostra un effetto non significativo delle differenti durate di trattamento.

Utilizzando la temperatura di vaporizzazione di 0°C (tab.5) si è evidenziata una buona azione fungistatica della dose di 35000 ppm mentre trattamenti con dosi superiori hanno determinato un calo di azione.

L'analisi della varianza relativa a due fonti di variazione (è stata sperimentata una sola durata di trattamento) mostra effetti sempre significativi (tab.6).

Nelle prove attuate sono stati rilevati episodi di fitotossicità dovuti ai trattamenti unicamente utilizzando la concentrazione di 75000 ppm: in diversi casi si è notata una suberificazione dei tessuti epidermici immediatamente circostanti la ferita di inoculo.

CONCLUSIONI

L'impiego di vapori di AA ha manifestato una significativa azione fungistatica.

Nel periodo in cui i frutti erano direttamente esposti ai vapori di AA non si è mai verificata alcuna crescita fungina. Tale azione è risultata evidente nei trattamenti della durata di 5 giorni dove, al termine del periodo di esposizione ai vapori, non si è mai riscontrato sviluppo del parassita a fronte di crescite miceliari anche notevoli sui testimoni.

L'effetto fungistatico continua nel periodo che segue il trattamento in misura variabile a seconda della dose utilizzata, della temperatura a cui si è effettuato il trattamento e della durata di esposizione ai vapori.

La mancata significatività dei risultati ottenuti con differenti durate di trattamento a 10°C può essere imputata alla interazione di una più lenta crescita miceliare a quella temperatura.

La regressione dell'attività fungistatica, riscontrata utilizzando concentrazioni di 50000 ppm nelle prove svolte a 0°C, potrebbe essere addotta ad un inizio di azione fitotossica, che alle altre temperature sembra esplicarsi a concentrazioni superiori.

L'impiego di concentrazioni pari a 35000-50000 ppm con trattamento di 5 gg. ha consentito di mantenere elevate percentuali di frutti sani per 8-12 giorni: considerando l'elevata carica di inoculo su ferita qui utilizzata il risultato si può considerare promettente.

L'uso di AA come agente fungitossico può quindi essere ritenuto potenzialmente interessante. Sarà tuttavia indispensabile procedere a più approfonditi studi circa l'aspetto residuale, la dinamica del gas durante i trattamenti nonché l'effetto dei vapori sulle caratteristiche qualitative dei frutti.

Tab.1- Efficacia di trattamenti con Acetaldeide (AA) effettuati a 20°C nei confronti di P.expansum.
Trattamenti della durata di 24 ore e 5 giorni.
Indici di Efficacia (I.E.) % dopo 2,3,6 giorni dal termine dei trattamenti.

AA- ppm	15000		20000		25000		35000		50000		75000			
	Durata	trattamento	24 ore	5 gg.										
Controlli dopo(1):														
2gg.			100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
3gg.			22,37	43,2	80,13	100	79,5	100	98,4	100	98,7	100	96,1	
6gg.			0	0	2,5	32,9	4,5	44,2	37,8	52,3	47,2	63,2	76,6	54,4

D.M.S.protetta (P 0,05)= 5,88

(1)La sosta dal termine del trattamento è stata effettuata a 20°C

Indice di Efficacia (I.E.) % : %frutti infetti test-%frutti infetti trattato/%frutti infetti test X 100.

Tab.2- Analisi fattoriale della varianza per dosi impiegate, durata del trattamento e controlli effettuati in pere inoculate con P.expansum e trattate con AA a 20°C.

Fonte	df	MS	F	P
Dosi(A)	5	6404,90	355,46	0.0000
Dur.tratt.(B)	1	2251,5	124,95	0.0000
Contr.eff.(C)	2	54120,92	3003,63	0.0000
A X B	5	650,51	36,1	0.0000
A X C	10	2052,39	113,9	0.0000
B x C	2	565,63	31,39	0.0000
A X B X C	10	325,64	18,07	0.0000
errore	108	18,1		

Tab.3- Efficacia di trattamenti con Acetaldeide (AA) effettuati a 10°C nei confronti di *P.expansum*.
Trattamenti della durata di 24 ore e 5 giorni.
Indici di Efficacia (I.E.) % dopo 2,4,6 giorni dal termine dei trattamenti.

AA- ppm	25000		35000		50000		75000	
	24 ore	5 gg.						
Controlli dopo(1):								
2gg.	100	100	100	100	100	100	100	100
4gg.	95,3	77,6	96,6	97,4	100	100	100	100
6gg.	4,4	38,2	70,6	88,2	98	84,8	71,8	68,2

(1)La sosta dal termine del trattamento è stata effettuata a 20°C
Indice di Efficacia (I.E.) % : %frutti infetti test-%frutti infetti trattato/%frutti infetti test X 100.

Tab.4- Analisi fattoriale della varianza per dosi impiegate, durata del trattamento e controlli effettuati in pere inoculate con *P.expansum* e trattate con AA a 10°C.

Fonte	df	MS	F	P
Dosi(A)	3	3278,48	328,84	0.00000
Dur.tratt.(B)	1	5,85	0,59	0.44613
Contr.eff.(C)	2	11997,28	1203,39	0.00000
A X B	3	240,22	24,09	0.00000
A X C	6	1888,44	189,42	0.00000
B x C	2	197,23	19,78	0.00000
A X B X C	6	542,91	54,46	0.00000
errore	72	9,97		0.00000

Tab.5- Efficacia di trattamenti con Acetaldeide (AA) effettuati a 0°C nei confronti di *P.expansum*.
Trattamenti della durata di 5 giorni. Indici di efficacia (I.E.) dopo 3,7,9,11 giorni dal termine dei trattamenti.

AA- ppm	25000	35000	50000
Controlli dopo(1):			
3gg.	100	100	100
7gg.	61,3	88,4	60
9gg.	46,5	78,7	39,4
11gg	33,8	63,7	28,4

D.M.S. protetta (P 0,05)=9,62

(1)La sosta dal termine del trattamento è stata effettuata a 20°C
Indice di Efficacia (I.E.) % : %frutti infetti test-%frutti infetti trattato/%frutti infetti test X 100.

Tab.6- Analisi fattoriale della varianza per dosi impiegate e controlli effettuati con pere inoculate con Penicillium expansum e trattate con AA a 0°C.

Fonte	df	MS	F	P
Dosi	2	3.208,64	66,57	0.00000
Controlli	3	7.458,26	156,61	0.00000
DosiXControlli	6	379,22	7,87	0.00002
Errore	36	48,20		

BIBLIOGRAFIA

AHARONI Y., STADELBACHER G.J. (1973). The toxicity of acetaldehyde vapors to postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Phytopatology*, 63:544-545.

ANONIMO . U.S Office of the Federal Register - Code of Federal Regulation - 21, Food and Drugs, Section 121:101.

AVISSAR I., MARINANSKI E., PESIS E. (1991) The control of postharvest decay in table grapes using acetaldehyde vapours. *Annals Applied Biology* 118: 229-237.

CACCIONI D., GUIZZARDI M. (1992) Azione antifungina di composti naturali : attività nei confronti di *Monilinia laxa* (Aderh. and Ruhl) Honey e *Rhizopus stolonifer* (Ehremberg) dell'acetaldeide- Prove "in vivo". Symposium on postharvest quality of fresh horticultural crops. Viterbo19-20.XI. Atti. Progetto RAISA- CNR (*in stampa*).

COSSINS E.A. (1978). Ethanol metabolism in plants. In D.D. Hook e R.M.M. Crawford (Ed.) - *Plant life in aerobic environments*. Science Pubbl., Ann Arbor Science,MI,pp.169-202.

FIDLER P.C. (1968). The metabolism of acetaldehyde by plant tissues. *Journal Experimental Botany* 19:41-51.

FOLCHI A., PRATELLA G.C.,BERTOLINI P.,CAZZOLA P.P. (1993). Effects of oxygen stress on stone fruits .COST94- Workshop on "Controlled Atmosphere storage of fruit and vegetables". CEE-Bruxelles. Atti (In Stampa).

JANES H.W., FRENKEL C. (1978). Promotion of softening processes in pear by acetaldehyde, independent of ethylene action. *J. American Society Horticultural Science*. 103(3):397-400.

- LURIE S., PESIS E. (1992). Effects of acetaldehyde and anaerobiosis as postharvest treatments on the quality of peaches and nectarines. *Postharvest Biology and Technology* 1: 317-326.
- NURSTEN H.E. (1970). Volatile compounds : the aroma of fruits. In: A.C. Hulme (Ed.): *The biochemistry of fruits and their products*. Academic Press Vol. 1, 239-268.
- PAZ O., JANES H., PREVOST B., FRENKEL C. (1982). Enhancement of fruit sensory quality of postharvest application of acetaldehyde and ethanol. *Journal of Food Science* 47:270-276.
- PESIS E. , MARINANSKY R., AVISSAR I. (1989) Effect of prestorage treatments with acetaldehyde vapors or anaerobic conditions on volatiles accumulation during storage of various fruits. *Acta Horticulturæ* 258:661-667.
- PESIS E., AVISSAR I. (1988). Effect of acetaldehyde vapors or anaerobic conditions prior to storage on postharvest quality of citrus fruit. *Proceedings of the 6th Int. Citrus Congress*. Balaban Publishers-Margraf Scientific Books: 1393-1399.
- PESIS E., FRENKEL C. (1989). Acetaldehyde vapors influence postharvest quality on table grapes. *HortScience* 24(2): 315-317.
- ROBINSON P.M., PARK D.(1966). Volatile inhibitors of spore germination produced by fungi. *Trans.Brit.Mycol.Soc.* 49(4):639-649.
- ROBINSON P.M., PARK D., GARRET M.K. (1968). Sporostatic products of fungi. *Trans. Brit.Mycol.Soc.* 51(1):113-124.
- SHAW G.W. (1969) . The effect of CA storage on quality and shelf-life of fresh strawberries with special reference to *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* . Ph.D. thesis - University of Maryland, College Park, 62 pp..
- SMAGULA J.M., BRAMLAGE W. (1977). Acetaldehyde accumulation : is it a cause of physiological deterioration of fruits? *HortScience* 12(3):200-203.