

# Università di Pisa

Facoltà di Agraria  
Corso di Laurea in Biotecnologie agro-industriali

Valutazione dell'efficacia fungicida di acqua acida elettrolizzata nei confronti dei conidi di *Botrytis cinerea* e degli effetti collaterali su un suo fungo antagonista (*Trichoderma harzianum* T39)

Candidata:  
Kathrin Eva Annaheim

Relatore:  
Prof. Giovanni Vannacci

Anno accademico 2004-2005

# Indice

<b>1. Introduzione</b>	
1.1. La necessità di nuovi mezzi di difesa contro patogeni	p. 1
1.2. La muffa grigia	p. 3
1.3. Infezione ed Inoculo	p. 8
1.4. L'acqua acida elettrolizzata	p. 9
1.5. <i>Trichoderma harzianum</i> T39	p. 13
<b>2. Scopo del lavoro</b>	p. 14
<b>3. Materiali e metodi</b>	
3.1. Capacità germinativa dei conidi di <i>B. cinerea</i> dopo trattamento con diverse miscele di EAW e EBW	p. 15
3.2. Influenza di un trattamento con acqua a valori di pH determinato sulla vitalità di conidi di <i>B. cinerea</i>	p. 19
3.3. Effetto inibitore di EAW 1:1 da sola o in combinazione con un antagonista ( <i>T. harzianum</i> T39) sulla germinazione dei conidi di <i>B. cinerea</i>	p. 22
3.4. Effetto inibitore di EAW 1:1 da sola o in combinazione con un antagonista ( <i>T. harzianum</i> T39) nei confronti di infezioni su fagiolo	p. 25
<b>4. Risultati e discussione</b>	
4.1. Capacità germinativa dei conidi di <i>B. cinerea</i> dopo trattamento con diverse miscele di EAW e EBW	p. 29
4.2. Influenza di un trattamento con acqua a valori di pH determinato sulla vitalità di conidi di <i>B. cinerea</i>	p. 31
4.3. Effetto inibitore di EAW 1:1 da sola o in combinazione con un antagonista ( <i>T. harzianum</i> T39) sulla germinazione dei conidi di <i>B. cinerea</i>	p. 33
4.4. Effetto inibitore di EAW 1:1 da sola o in combinazione con un antagonista ( <i>T. harzianum</i> T39) nei confronti di infezioni su fagiolo	p. 36
<b>5. Conclusioni</b>	p. 38
<b>6. Bibliografia</b>	p. 40



# 1.Introduzione

## 1.1 La necessità di nuovi mezzi di difesa contro i patogeni

La Provincia Autonoma di Trento, situata nella parte nord-orientale dell'arco alpino, presenta una posizione geografica intermedia tra la zona prealpina e quella alpina. Il paesaggio è in prevalenza montuoso e ricco di emergenze naturali capaci di attirare ogni anno numerosi turisti che visitano questa provincia in tutte le stagioni (oltre 16 milioni, nel 2004) (<http://www.provincia.tn.it/trentino/economia.htm>, dati ufficiali della Banca d'Italia). Di conseguenza il turismo ha assunto un ruolo di primaria importanza per l'economia del Trentino, con un ruolo considerevole anche nell'integrazione del reddito in agricoltura (agriturismo).

Il settore agricolo partecipa in misura rilevante alla formazione del prodotto interno lordo della provincia. Le colture principali sono la vite e il melo. Nel 2000 la superficie coltivata era rispettivamente di 12.084 e 9.055 ha (dati censuari e agricoltura professionale in Trentino, 2004). Con superfici notevolmente inferiori sono anche presenti altre colture arboree (pere, ciliege, susine), piccoli frutti e ortaggi.

La superficie provinciale utilizzata in l'agricoltura è pari a 50.000 ha (Rapporto annuale dell'agricoltura, 2003); quest'area corrisponde a meno del 10% della superficie totale. Va evidenziato che il 50% della superficie totale è coperta da boschi e il 20% è al di sopra dei 2000 m s.l.m. (Rapporto annuale dell'agricoltura, 2003). Di conseguenza è il fondovalle ad essere principalmente interessato dall'agricoltura.

La presenza di un'agricoltura intensiva in una zona turistica può creare dei contrasti tra i due settori. La meccanizzazione spinta e l'utilizzo di pesticidi chimici necessari per mantenersi competitivi sul mercato, difficilmente si

conciliano con un ideale di purezza e salubrità che il turista richiede. Per conciliare le esigenze di produttore e turista, è necessario operare al fine di ridurre il più possibile l'utilizzo di prodotti antiparassitari di sintesi.

L'agricoltura e la ricerca in Trentino hanno da sempre mostrato grande attenzione alle strategie innovative a basso impatto ecologico nella lotta contro gli organismi dannosi delle piante, come per esempio la tecnica della confusione sessuale, con la quale sono efficacemente controllati i principali fitofagi della vite e del melo, sulla maggior parte della superficie provinciale.

Nell'ambito della patologia vegetale esistono purtroppo ancora numerose malattie per le quali non esistono metodi di lotta alternativi ai principi attivi chimici. In molti casi i metodi alternativi non sono disponibili, in altri, non sono sufficientemente efficaci oppure sono di difficile applicazione.

L'obiettivo di questa ricerca è trovare nuovi metodi efficaci e sicuri per contrastare patogeni fungini delle colture, da utilizzarsi da soli o ad integrazione d'altre tecniche a basso impatto ambientale.

Le prove si sono svolte in laboratorio, dopo aver individuato un sistema modello su cui valutare la potenzialità della nuova tecnica. Si è scelto come patogeno l'agente della muffa grigia (*Botrytis cinerea*), un organismo facilmente coltivabile in condizioni di laboratorio, che allo stesso tempo rappresenta un importante problema per numerose colture in campo o nella fase di conservazione dopo la raccolta.

Il fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.) è stato scelto come pianta ospite, poiché è di facile coltivazione e permette di valutare in modo rapido e chiaro sulle foglie l'avvenuta infezione di *B. cinerea*.

## 1.2 La muffa grigia

Questa malattia è causata da un parassita fungino polifago ed ubiquitario. Provoca danni alla produzione di numerose colture agrarie d'interesse economico, come ad esempio vite, fragola, kiwi, melanzana, pomodoro, cetriolo, insalate, ciclamino. Il patogeno può anche sopravvivere come saprofita su materiale organico di vario tipo.

La muffa grigia può colpire tutti gli organi aerei delle piante, soprattutto se essi sono teneri e ricchi di zuccheri. I sintomi sui frutti sono simili tra loro a prescindere dalla specie: *Botrytis cinerea* Pers. provoca marciumi profondi più o meno molli a seconda dell'idratazione dei tessuti e dell'umidità dell'aria, che si ricoprono di feltri grigiastri di fruttificazioni conidiche. Sui lembi fogliari provoca lesioni necrotiche estese, di consistenza ed aspetto variabile, che in condizioni d'elevata umidità si ricoprono anch'essi di micelio e conidi grigiastri. *B. cinerea* può attaccare anche i piccioli ed i peduncoli (in particolare i rachidi dell'uva), rami e fusti, soprattutto quando questi sono erbacei o non completamente lignificati, creando spesso in questi casi delle lesioni asciutte. Gli attacchi su rami e steli determinano il disseccamento della vegetazione soprastante. In agricoltura, a causa di concimazioni eccessive e delle elevate densità d'impianto che portano ad una scarsa aerazione della coltura, le epidemie di muffa grigia sono frequenti e dannose.

La muffa grigia è una delle malattie che causano i danni maggiori nei vigneti in tutto il mondo, sia nella produzione di uva da tavola che da vino. L'attacco sulla vite si manifesta sulle foglie con macchie dapprima clorotiche poi brune, sfumate ai bordi, variamente localizzate, generalmente isolate, ma anche confluenti, che invadono l'intera lamina che dissecca ripiegandosi verso terra. Nei vigneti l'attacco fogliare è poco

frequente; più importante e grave è l'attacco al grappolo, il quale è frequente in certi ambienti e in particolari sistemi di allevamento che non permettono una buona aerazione delle infruttescenze prossime alla maturità. Specialmente gli acini che presentano una soluzione di continuità provocata da grandine, dalle tignole, ecc. sono suscettibili all'infezione (Goidanich, 1964). Particolare attenzione deve essere data, quando si presenta una bagnatura degli organi che raggiunge o supera le 15 ore, con una temperatura media di 15°C. In queste condizioni il pericolo d'infezione è elevato (Mattedi e Varner, 2000).

*B. cinerea* è un Deuteromicete. *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, è la forma perfetta (*Ascomycetes*), la quale in natura compare solo sporadicamente e in rapporto metagenetico con la diffusissima forma conidica *B. cinerea* (Matta, 1996; Mattedi e Varner, 2000).

*B. cinerea* presenta un micelio di colore che va da ialino a leggermente grigio, ramificato, da cui dipartono lunghi conidiofori scuri con cellula basale globosa, ramificati nella regione terminale fino a dare cellule conidiogene rigonfiate in ampolle irregolarmente clavate, che producono conidi lisci (11 x 11-15 µm), non settati, ovoidali, inseriti lateralmente e apicalmente su fini denticolazioni. Il fungo presenta inoltre sclerozi neri, irregolarmente appiattiti, di 1-5 mm di lunghezza. Gli sclerozi possono costituire supporto per la differenziazione degli apotecii. Molto più frequentemente gli sclerozi dopo lo svernamento sono ricoperti da conidiofori e conidi (Matta, 1996).

### **Ciclo biologico di *B. cinerea***

La malattia si può sviluppare entro ampi limiti termici (5 – 31 °C) con un ottimo a 21-25 °C (Matta, 1996). La germinazione non è molto influenzata dalla temperatura, in quanto la germinazione può iniziare a -1 °C e proseguire fino a 40 °C, pur risultando sensibilmente rallentata al di sotto degli 8 °C e sopra 28 °C (Crinò *et al.*, 1993). Le infezioni si producono rapidamente in presenza di un velo d'acqua, ma possono anche

verificarsi, un po' più lentamente, in presenza di un'umidità molto elevata dell'aria, vicina al punto di saturazione (Matta, 1996).

La presenza nell'acqua di essudati contenenti zuccheri o aminoacidi aumenta la percentuale di germinazione dei conidi e abbrevia la durata di tale processo (Kosuge e Hewitt, 1964). Gli zuccheri solubili sono tra le sostanze più attive nello stimolare la germinazione dei conidi (Rossall e Mansfield, 1980). L'inibizione della germinazione dei conidi può essere dovuta a fattori interni o esterni. Un fattore interno che gioca un ruolo fondamentale è l'età dei conidi (Crinò *et al.*, 1993). Oltre ai fattori esterni già citati (temperatura e umidità) importante può essere la presenza sulla superficie vegetale di altri microrganismi, i quali possono essere antagonisti o competitori di *B. cinerea* (Blakeman e Brodie, 1977). L'umidità elevata agisce positivamente sullo sviluppo delle epidemie, sia favorendo la produzione e la germinazione dei conidi, sia esaltando il lussureggiare della pianta, come avviene nel caso di concimazioni azotate, e quindi la sua predisposizione alla malattia (Matta, 1996).

I propaguli di *B. cinerea* sono presenti durante tutte le fasi vegetative della vite (*Vitis vinifera* L.) perciò, in presenza di condizioni favorevoli (clima ottimale, tessuti dell'ospite lesionati o senescenti) nuove infezioni possono originarsi a carico dei vari organi della pianta. Durante l'inverno il patogeno sopravvive soprattutto sotto forma di micelio su residui vegetali sui quali, in primavera, è in grado di originare nuove generazioni di conidi, a partire dal micelio svernante. Lo svernamento può anche avvenire attraverso gli sclerozi, i quali producono in genere nuovo micelio o, più raramente, un apotecio e le ascospore. Su vite nelle condizioni ambientali del Trentino, lo svernamento sotto forma di micelio è in genere più frequente rispetto a quello sotto forma di sclerozi. I conidi che si originano dal micelio svernante sono i principali responsabili dei primi attacchi alle piante in primavera (Mattedi e Varner, 2000). Durante la stagione vegetativa le infezioni sono causate per lo più da conidi, i quali sono idrofobici al momento del rilascio e vengono disseminati dal vento o dalla pioggia. Per germinare i conidi richiedono la presenza d'acqua. L'infezione

può avvenire in campo oppure in post-raccolta, per contatto tra parti sane e parti infette. I conidi germinano dopo essersi fissati tramite un appressorio sulla superficie vegetale formando un promicelio. Gli stiletto di penetrazione partono dal promicelio e possono invadere direttamente il tessuto vegetale perforando la cuticola, o più raramente, attraverso gli stomi. Non tutti i tessuti vegetali possono essere penetrati attivamente, ma solo quelli teneri, con bassa resistenza meccanica (acini maturi d'uva). Le infezioni sono facilitate da ferite o lesioni di vario tipo, determinate da fattori abiotici come grandine, gelo oppure fattori biotici, come insetti o precedenti attacchi fungini (Matta, 1996). Su vite dopo un tempo di incubazione di 6-8 giorni, la zona infetta si ricopre di una caratteristica efflorescenza grigia, costituita dagli elementi di riproduzione agamica del parassita, i conidiofori e i conidi. Durante il periodo vegetativo (estate) si differenziano moltissimi conidi in grado di diffondere la malattia a nuove parti della pianta ospite e ad altre piante. La diffusione avviene attraverso il vento, ma è favorita dalla pioggia che costituisce anche un importante fattore infettivo (Mattedi e Varner, 2000).

### **Difesa contro *B. cinerea***

Nella lotta contro l'agente patogeno *B. cinerea* si può agire in vari modi: moderando la densità degli impianti, orientando i filari secondo la direzione del vento, in serra con aperture frequenti o il loro riscaldamento anche per brevi periodi notturni, agendo con le potature verdi, riducendo le disponibilità idriche, evitando le lavorazioni profonde del terreno, concimando in modo equilibrato, scegliendo nel caso della vite portainnesti poco vigorosi. Per evitare un eccessivo rigoglio vegetativo è importante non eccedere nelle concimazioni con azoto. Inoltre si può prevenire la malattia rimuovendo dal campo il materiale vegetale morto.

Nelle condizioni più favorevoli alla malattia i metodi di lotta agronomica devono essere affiancati da trattamenti con fungicidi, in particolare dicarbosimidici, con le opportune precauzioni che questi composti

richiedono per evitare la comparsa di popolazioni resistenti del parassita. Questo pericolo è grande poichè tali prodotti fitosanitari agiscono con meccanismi d'azione molto specifici e spesso in natura nelle popolazioni di *B. cinerea* esistono ceppi di patogeno con mutazioni genetiche che li rendono insensibili al principio attivo (Matta,1996).

## 1.3 Infezione ed inoculo

L'infezione è il processo mediante il quale un organismo stabilisce un rapporto trofico intimo con cellule o tessuti dell'ospite. L'infezione si può suddividere in due fasi: la penetrazione e la colonizzazione. La penetrazione può essere passiva o attiva e consiste nel superamento delle barriere protettive esterne, mentre durante la colonizzazione, il patogeno supera le barriere interne e si crea un rapporto trofico. Il patogeno deve presentare una corretta combinazione e successione nel tempo dei mezzi d'aggressione per infettare l'ospite (Matta, 1996).

L'inoculo è l'insieme di elementi infettivi (propaguli) di un patogeno. I patogeni possono presentare più di un tipo di propagulo. I patogeni fungini producono due tipi di propaguli, spore e conidi. La maggior parte dei funghi è in grado di produrre spore e/o conidi, e certi funghi presentano tipi di conidi morfologicamente e funzionalmente diversi. Generalmente l'inoculo è prodotto negli o sugli organi parassitizzati, ma esiste anche la possibilità che esso sia prodotto su svariati materiali vegetali morti da parte di parassiti facoltativi (Matta, 1996).

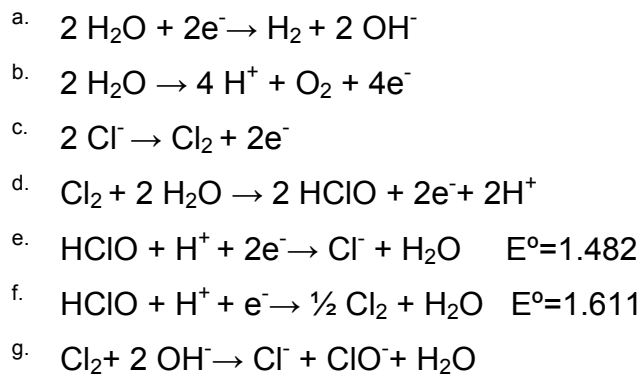
La riduzione dell'inoculo mediante interventi diretti (fungicidi) od indiretti (limitazione delle condizioni che ne favoriscono la formazione) costituisce un importante mezzo per prevenire le infezioni.

## 1.4 L'acqua acida elettrolizzata

L'acqua acida elettrolizzata (electrolized acid water, EAW) è prodotta a partire da una soluzione salina (KCl) in un generatore (Oxilyzer OX-01<sup>TM</sup>), nel quale avviene l'elettrolisi. Il generatore è composto da due taniche separate da una resina (membrana) che permette lo scambio di cationi, ma non di protoni. Un elettrodo positivo (anodo) è posto in una tanica e un elettrodo negativo (catodo) nell'altra. Nella tanica dove si trova l'anodo si forma EAW, la quale presenta un elevato potenziale ossido-riduttivo e un valore basso di pH (Kim *et al.*, 2000a). Nell'altra tanica è prodotta acqua basica elettrolizzata (electrolized basic water, EBW), la quale è caratterizzata da un valore alto di pH (intorno a pH 11,5) e un potenziale ossido-riduttivo negativo (con valori intorno a -850 mV). La membrana permette il passaggio dei cationi dalla parte acida alla parte alcalina, come  $K^+$  (nel caso di KCl), ma non fa passare  $H^+$  dalla parte acida a quella alcalina. Gli ioni  $H^+$  e  $OH^-$  mantengono rispettivamente la natura acida nella tanica contenente l'elettrodo positivo e basica nella tanica contenente l'elettrodo negativo.

### Le reazioni chimiche nella produzione di EAW

Durante l'elettrolisi avviene al catodo la riduzione di acqua a ione idrossido ed idrogeno (Figura 1, a), mentre intorno all'anodo si ha la scissione dell'acqua e la correlata produzione di protoni (Figura 1, b) e l'ossidazione dello ione cloruro in cloro (Figura 1, c).



**Figura 1** reazioni che avvengono nell'ossidatore

Nella tanica anodica il cloro ( $\text{Cl}_2$ ) reagisce con l'acqua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) a formare acido ipocloroso ( $\text{HClO}$ ) (Figura 1, d) e acido cloridrico ( $\text{HCl}$ ). L'acido ipocloroso ha una forte tendenza a ridursi. La riduzione dell'acido ipocloroso avviene in due modi (Figura 1, e, f) con forze elettromotrici elevate. In ambiente alcalino la dismutazione del cloro (Figura 1, g) ha come prodotti lo ione ipoclorito e lo ione cloruro.

### **Le proprietà di EAW**

L'acqua acida prodotta presenta un pH basso, un potenziale ossidoriduttivo (ORP) alto e diverse specie di cloro:  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{HClO}$ ,  $\text{ClO}^-$  dipendenti dal pH come riportato nella tabella del produttore del prototipo (Oomori *et al.*, 1999). Esistono diverse ipotesi sul funzionamento di EAW, ma non si è a conoscenza del suo esatto meccanismo nella disattivazione microbica (Buck *et al.*, 2002).

Il potenziale ossidoriduttivo extracellulare (ORP) è stato dimostrato modificare i flussi metabolici e la produzione di ATP, e ciò probabilmente è dovuto ad un cambiamento negli scambi elettronici nella cellula (Rionder *et al.*, 2000). Altri autori attribuiscono più specificamente la responsabilità

dell'effetto disinfettante alla natura ossidativa dell'acido ipocloroso. Inoltre il basso valore pH della soluzione ha come effetto che l'acido ipocloroso non degradi immediatamente (Tsuji *et al.*, 1999).

A valori pH bassi (valori da pH 1 a pH 5) la soluzione acquosa contiene  $\text{Cl}_2$  e  $\text{HClO}$ , a valori pH più elevati la soluzione contiene  $\text{HClO}$  e  $\text{ClO}^-$ . Il  $\text{ClO}^-$  è presente a partire dal valore pH di ca. 5,5 e raggiunge al valore pH 10 il 100%. Il  $\text{HClO}$  invece presenta una concentrazione del 100% intorno al pH di 5. Intorno al pH 6 (circa pH 5,5-pH 6,5) l'acqua acida elettrolizzata presenta una maggiore stabilità, il potenziale ossido-riduttivo ha valori intorno a 800 – 900 mV (dati e informazioni forniti da A. Iodice, Cbc europe, azienda fornitrice del prototipo usato).

### **Applicazioni pratiche di EAW**

È nota la proprietà di EAW di devitalizzare un'ampia gamma di specie batteriche (Buck *et al.*, 2002, Venkitanarayanan *et al.*, 1999), e fungine (sia spore, ife e lieviti) (Buck *et al.*, 2002), ed anche diversi virus (Tsuji *et al.*, 1999). Attualmente viene utilizzata per disinfettare endoscopi (Tsuji *et al.*, 1999) e ha attirato l'attenzione dell'industria alimentare come metodo disinfettante non termico (Kim *et al.*, 2000b). È stato dimostrato igienizzare superfici per la preparazione di alimenti, come taglieri da cucina (Venkitanarayanan, 1999), e superfici di verdure (Izumi, 1999; Bari *et al.*, 2003).

EAW non irrita gli occhi e la pelle quando ne viene a contatto e, su colture di cellule, non risulta né tossica né mutagena (Tsuji *et al.*, 1999).

### **Difficoltà nell'uso di EAW**

Un problema nell'utilizzo pratico consiste nel fatto che EAW generalmente viene applicata su superfici che presentano altro materiale organico oltre ai patogeni. Il materiale organico viene ossidato e il cloro rimane nella forma combinata, la quale non ha più potere ossidativo (Oomori *et al.*,

2000). Per questo motivo EAW è di difficile applicazione contro malattie radicali perché la sua attività è neutralizzata da agenti riduttivi non selettivi nel suolo o nel terriccio, e ha invece un potenziale più grande per il controllo di malattie fogliari (Oomori *et al.*, 2000).

Una problematica che si pone è l'effetto corrosivo dell'EAW quando viene a contatto con materiali metallici.

Un altro problema si verifica quando si effettuano trattamenti frequenti con EAW. Certe specie di piante possono mostrare un effetto fitotossico su foglie e fiori (Buck *et al.*, 2003). Inoltre il cloro libero, seppur presente in basse quantità, potrebbe risultare poco gradito all'operatore che dovrebbe effettuare le applicazioni nelle colture.

## 1.5 *Trichoderma harzianum* T39

Della maggior parte dei ceppi di *Trichoderma* si conosce solo l'anamorfo. Nonostante alcuni *Trichoderma* spp. possono essere associati con la forma teleomorfica del genere *Hypocrea* (Kubicek, 1998).

Isolati del genere *Trichoderma* sono conosciuti per la loro caratteristica di essere agenti di biocontrollo nei confronti di diversi patogeni vegetali (Freeman et al., 2004), e vengono studiati da più di 70 anni per questa loro caratteristica (Hjeljord e Tronsmo, 1998). Si è evidenziato che i ceppi di *Trichoderma* spp. possiedono diversi meccanismi responsabili delle interazioni antagonistiche con altri funghi: la produzione di enzimi extracellulari (Inbar et al., 1994.) e antibiotici antifungini (Ghisalberti e Rowland, 1993), la competizione per spazio e nutrienti con i patogeni fungini (Simon e Sivasithamparan, 1989), la promozione della crescita della pianta (Inbar et al., 1994) e l'induzione di resistenze in piante (De Meyer et al., 1998, Zimand et al., 1996).

Uno dei primi agenti di biocontrollo registrati e commercializzati è stato l'isolato T39 di *T. harzianum*, il quale controlla efficacemente le malattie causate da *B. cinerea* in colture in serra e vigneti (Elad, 1993). La germinazione dei conidi e l'allungamento del tubetto germinativo di *B. cinerea* su foglie di fagiolo sono ridotte in presenza dell'agente di biocontrollo *T. harzianum* T39 (Zimand et al., 1996). Oltre alla capacità di ridurre l'attività degli enzimi degradanti la pectina prodotti da *B. cinerea* (Zimand et al., 1996), altri meccanismi coinvolti nell'antagonismo di *T. harzianum* T39 nei confronti di *B. cinerea*, sono la competizione per i nutrienti e l'induzione di resistenza nella pianta.

## 2. Scopo del lavoro

Questo lavoro ha lo scopo di verificare le potenzialità di EAW nel controllo di importanti patogeni fungini, mediante la sua capacità di ridurre l'inoculo sulle colture vegetali. Come organismo sperimentale è stato scelto *B. cinerea* per la facilità e rapidità di allevamento in condizioni di laboratorio e per la sua estrema dannosità su alcune diffuse colture, sia in campo che in post-raccolta. Si tratta di uno studio preliminare condotto in condizioni controllate in laboratorio, sia *in vitro*, che *in vivo*. Si vuole studiare gli effetti della concentrazione di EAW sulla specie modello (*B. cinerea*) attraverso diluizioni che abbassano il contenuto del cloro libero, tali da rendere meno nociva per l'operatore una ipotetica applicazione in grandi quantità in campo. Si vuole verificare l'effetto di EAW e della combinazione di EAW con un agente di biocontrollo (*Trichoderma harzianum* T39) sulla vitalità dei conidi di *B. cinerea* e sull'inibizione delle infezioni in un sistema modello su foglie di fagiolo.

## **3. Materiali e metodi**

### **3.1 Capacità germinativa dei conidi di *B. cinerea* dopo trattamento con diverse miscele di EAW e EBW**

#### **Preparazione della sospensione**

Tre piastre Petri contenenti colture di *B. cinerea* cresciute su PDA (Oxoid, Ltd. Basingstoke, UK) per 18 giorni, a 25° C, sono state lavate ognuna con 10 ml di Tween 80 al 0,01% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per asportare i conidi presenti. La sospensione è stata filtrata attraverso quattro strati di garza sterile in tubi Falcon da 50 ml.

La sospensione è stata centrifugata per 5 minuti a 8000 rpm. Il surnatante è stato rimosso ed il pellet risospeso in 20 ml di acqua distillata.

La concentrazione della sospensione di conidi è stata determinata con una cella contaglobuli "Thoma". La concentrazione finale della sospensione ottenuta era di  $7.125 \times 10^5$  conidi/ml.

#### **Preparazione delle miscele di EAW ed EBW e valutazione dell'efficacia sulla germinazione dei conidi di *B. cinerea***

Sono state prodotte acqua acida elettrolizzata (EAW) e acqua alcalina elettrolizzata (EBW) e di esse sono state preparate nove miscele di rapporto diverso, secondo la tabella 1. Il pH e l'ORP sono stati misurati (Microprocessor pH-mV Meter pH 538, WTW GmbH, Weilheim, Germania; Elettrodo combinato per pH SenTix 50, WTW GmbH, Weilheim, Germania;

Liq-Glass ORP, Hamilton Bonduz AG, Bonaduz, Svizzera). Il simbolo “↑↓” significa che il valore non è attendibile dato che durante la misurazione si verificavano dei continui salti del valore.

**Tabella 1.** Diversi rapporti di miscela di EAW e EBW e relativi valori di pH e ORP nella prima e seconda prova

<b>EAW : EBW</b>	<b>pH prova 1</b>	<b>pH prova 2</b>	<b>ORP prova 1</b>	<b>ORP prova 2</b>
10: 0	2.53	2.64	1113	1110
9:1	2.63	2.75	1092	1088
7:3	3.25	3.33	800↑↓	830↑↓
6:4	6.15	6.26	590↑↓	540↑↓
5.5:4.5	7.32	7.15	514	451 ↑↓
5:5	8.79	8.90	141	130 ↑↓
3:7	10.90	10.89	-118	-300 ↑↓
1:9	11.36	11.27	-780	-825
0:10	11.46	11.37	-851	-853

↑↓, valore non attendibile a causa dei salti di valore durante la misurazione

In 10 provette da 15 ml (Kartel S.p.A., Noviglio, Italia) sono stati posti 2 ml della sospensione e centrifugate per 5 minuti a 4000 rpm. Dopodichè i pellet sono stati risospesi in 4 ml di EAW, ognuna con una delle varie concentrazioni. Nell'ultima provetta è stata aggiunta acqua distillata sterile come un controllo non trattato. Le provette sono state mescolate tramite il Vortex per pochi secondi e agitate a mano dolcemente per 30 min.

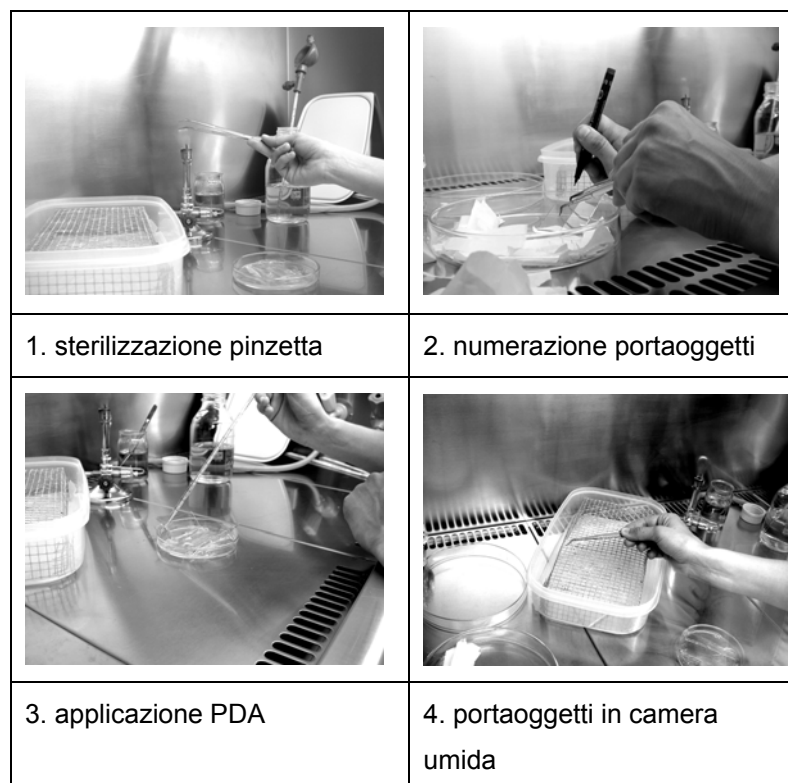
Le provette sono state nuovamente centrifugate (4000rpm, 5min), il surnatante rimosso e il pellet sospeso in 4 ml di acqua distillata (concentrazione finale:  $3.56 \times 10^5$  conidi/ml).

In ambiente sterile veniva applicato uno strato di PDA con una pipetta da 1 ml su vetrini da microscopia (portaoggetti). I portaoggetti si ponevano in camera umida, composta da una scatola ermetica di plastica, con carta sterile bagnata sul fondo e una griglia di metallo sterilizzata (Figura 2).

Si è posta sul vetrino portaoggetti una goccia di 100 µl della sospensione di conidi di *B.cinerea* ( $3.56 \times 10^5$  conidi per ml) con una micropipetta. Tale goccia è stata poi distribuita con una bacchetta di vetro.

I portaoggetti sono stati incubati per 6 ore e 20 minuti a temperatura ambiente (20-25°C) nelle camere umide. Dopo il tempo di incubazione, la crescita avvenuta veniva bloccata con un fissativo a base di fucsina, che permetteva anche una migliore visibilità al microscopio.

**Figura 2** sequenza di quattro passaggi nella preparazione dei vetrini ricoperti con PDA



È stata valutata la vitalità dei conidi di *B. cinerea* dopo un trattamento per trenta minuti con diverse miscele di EAW e EBW. Per ogni replica si sono contati 100 conidi; in caso di avvenuta germinazione si valutava la lunghezza del tubo germinativo come multiplo della lunghezza del conidio, quindi si classificavano i conidi in cinque gruppi: 0x (per assenza di germinazione); 1x, 2x, 3x, 4x e oltre. In quest'esperimento sono stati combinati i dati della ripetizione poiché i dati di ogni gruppo non differiscono significativamente (ANOVA, Test di Duncan).

### **3.2 Influenza di un trattamento con acqua a valori di pH determinato sulla vitalità di conidi di *B. cinerea***

#### **Preparazione della sospensione di conidi**

La sospensione di conidi di *B. cinerea* è stata preparata il giorno precedente a partire da colonie cresciute su PDA, per 10 o 20 giorni (rispettivamente nelle due prove ripetute).

La piastra è stata lavata con 5ml di Tween 80 (0,01%) sterile, agitando leggermente la superficie con un'ansa di vetro. La sospensione è stata versata in una provetta Falcon sterile ed è stata determinata la concentrazione della sospensione. Si è diluito la sospensione con acqua sterile fino ad avere una concentrazione di  $6 \times 10^3$  conidi/ml.

#### **Preparazione di miscele a pH determinato**

La prova è stata ripetuta due volte e similmente all'esperimento precedente, sono state preparate 9 soluzioni acquose a valore pH medio (valore di riferimento) tra i valori misurati delle diverse miscele EAW:EBW nell'esperimento "capacità germinativa" (Tabella 2).

Si è aggiunto all'acqua sterile rispettivamente HCl e NaOH in soluzione per ottenere le diverse soluzioni a pH determinato. Il controllo è rappresentato da acqua sterile che aveva un valore pH 6.10. I valori pH sono stati misurati con il pH-metro.

**Tabella 2** valori di pH delle miscele nelle due prove e delle soluzioni di riferimento

<b>EAW : EBW</b>	<b>pH prova 1</b>	<b>pH prova2</b>	<b>pH di riferimento</b>
10:0	2.53	2.64	<b>2.6</b>
9:1	2.63	2.75	<b>2.7</b>
7:3	3.25	3.33	<b>3.3</b>
6:4	6.15	6.26	<b>6.2</b>
5.5:4.5	7.32	7.15	<b>7.2</b>
5:5	8.97	8.90	<b>8.9</b>
3:7	10.90	10.89	<b>10.9</b>
1:9	11.36	11.27	<b>11.3</b>
0:10	11.46	11.37	<b>11.4</b>
Controllo (acqua sterile)	6.10	6.12	<b>6.1</b>

### **Trattamento dei conidi**

In 10 provette sterili da 15 ml sono stati posti 4 ml della soluzione di conidi di *B. cinerea*. Le provette sono state centrifugate per 5 minuti a 4000 rpm. Con una pipetta sterile si è rimosso il surnatante e si è risospeso il pellet in 4 ml delle rispettive soluzioni a pH determinato. Le provette sono state mescolate tramite il Vortex per pochi secondi e i conidi sono stati lasciati in contatto con la soluzione per 30 minuti, agitando leggermente le provette a mano. Dopodichè le provette sono state centrifugate nuovamente per 5 minuti a 4000 rpm. Con una pipetta sterile è stato rimosso di nuovo il surnatante e si è risospeso il pellet in 4 ml di acqua sterile. Da questa sospensione (1/1) è stata preparata anche una diluizione 1/10.

Con 50  $\mu\text{l}$  della sospensione trattata sono state inoculate delle piastre Petri ( $\varnothing = 90 \text{ mm}$ ) contenenti PDA. La sospensione è stata distribuita sulla superficie del substrato con una ansa di vetro. Per ogni trattamento e diluizione sono state preparate 5 repliche. Le piastre sono state incubate al buio a temperatura ambiente ( $20 - 27^\circ\text{C}$ ). Dopo 24 ore con l'ausilio del microscopio sono state contate le colonie presenti all'interno di 5 quadrati di  $1 \text{ cm}^2$  di superficie, delimitati casualmente sul retro della piastra.

### **3.3 Effetto inibitore di EAW 1:1 da sola o in combinazione con un antagonista (*T. harzianum* T39) sulla germinazione di conidi di *B. cinerea***

#### **Preparazione della sospensione di conidi di *B. cinerea* e *T. harzianum* T39**

Le due sospensioni conidiche sono state preparate immediatamente prima dell'avvio dell'esperimento a partire da colonie cresciute su PDA, per 9 giorni nel caso di *B. cinerea* e 5 giorni nel caso di *T. harzianum*. Ognuna delle due sospensioni è stata preparata lavando la superficie della piastra di crescita con 10 ml di Tween 80 (0,01%) sterile. La sospensione è stata versata in una provetta Falcon ed è stata centrifugata per 5 minuti a 4000 rpm. Successivamente si è determinata la concentrazione dei conidi e si è diluito la sospensione con acqua sterile fino ad avere una concentrazione di  $1 \times 10^5$  conidi/ml.

#### **Produzione di acqua acida elettrolizzata ed acqua basica elettrolizzata**

Gli esperimenti da questo momento in poi sono stati eseguiti dopo l'intervento di riparazione dell'apparecchio generatore di EAW. L'intervento stesso ha modificato sostanzialmente il funzionamento dell'apparecchio rendendo impossibile l'ottenimento di valori di pH simili, a parità di rapporto di EAW:EBW, prima e dopo la riparazione.

L'acqua elettrolizzata è stata preparata immediatamente prima dell'utilizzo. Il valore pH della miscela 1:1 di EAW e EBW era pH 3,34 e l'acqua sterile bidistillata aveva pH 6,20. Per semplicità in seguito si farà riferimento alla miscela EAW:EBW con il termine "EAW 1:1".

### **Trattamento dei conidi *in vitro***

I conidi sono stati trattati secondo le metodiche riportate in Tabella 3. Sono state inoculate le piastre Petri contenenti PDA con le sospensioni trattate. Per ogni trattamento sono state effettuate 5 repliche. Le piastre sono state incubate al buio a temperatura ambiente. Dopo 24 ore sono state contate le colonie visibili, presenti all'interno di 5 quadrati da 1 cm<sup>2</sup> scelti casualmente. Quattro giorni dopo si sono valutate le dimensioni delle colonie formatesi. Dopo i diversi trattamenti le sospensioni conidiche e EAW 1:1 e l'acqua sterile singolarmente, sono stati incubati in una piastra Petri (ø=90mm) contenente PDA al buio per 24 ore a temperatura ambiente. Sono stati contati per ognuna delle 5 repliche i conidi presenti in 5 cm<sup>2</sup> scelti a caso. Le piastre sono state incubate per 4 giorni dopo il conteggio dei conidi. In tutte le 5 repliche inoculate con *B. cinerea*, trattate con acqua sterile e successivamente inoculate con *T. harzianum*, si è osservata la contemporanea crescita dei due funghi. *T. harzianum* ha mostrato un effetto antagonistico sulla crescita di *B. cinerea*.

**Tabella 3** schema dei trattamenti effettuati sulla sospensione conidica di *B. cinerea* con EAW e *T. harzianum* T39

	<b>momento 0</b>	<b>dopo 10 min</b>	<b>dopo 20 min</b>
1	<i>B. cinerea</i> (200 µl) + 10 ml di EAW 1:1	Inoculare le piastre Petri	
2	<i>T. harzianum</i> (200 µl) +10ml di EAW	Inoculare le piastre Petri	
3	<i>B. cinerea</i> (200 µl) + 10 ml di EAW 1:1	+ 200 µl di <i>T. harzianum</i>	Inoculare le piastre Petri
4	10 ml di EAW	Inoculare le piastre Petri	
5	<i>B. cinerea</i> (200 µl) + 10 ml di acqua sterile	Inoculare le piastre Petri	
6	200 µl di <i>T. harzianum</i> + 10ml di acqua sterile	Inoculare le piastre Petri	
7	<i>B. cinerea</i> (200 µl) + 10 ml di acqua sterile	+ 200 µl di <i>T. harzianum</i>	Inoculare le piastre Petri
8	10 ml di acqua sterile	Inoculare le piastre Petri	

### **3.4 Effetto inibitore di EAW 1:1 da sola o in combinazione con un antagonista (*T. harzianum* T39) nei confronti di infezioni su fagiolo**

#### **Preparazione della sospensione di conidi di *B. cinerea* e *T. harzianum* T39**

Le due sospensioni conidiche sono state preparate immediatamente prima dell'avvio dell'esperimento a partire da colonie cresciute su PDA, per 9 giorni nel caso di *B. cinerea* e 5 giorni nel caso di *T. harzianum*. Ognuna delle due sospensioni è stata preparata lavando la superficie della piastra di crescita con 10 ml di Tween 80 (0,01%) sterile. La sospensione è stata versata in una provetta Falcon ed è stata centrifugata per 5 minuti a 4000 rpm. Successivamente si è determinata la concentrazione dei conidi, e si è diluito la sospensione con acqua sterile fino ad avere una concentrazione di  $1 \times 10^5$  conidi/ml.

#### **Produzione di acqua acida elettrolizzata ed acqua basica elettrolizzata**

L'acqua elettrolizzata è stata preparata immediatamente prima dell'utilizzo. Il valore pH della miscela 1:1 di EAW e EBW era 3,34 e l'acqua sterile bidistillata aveva pH 6,20. Per semplicità in seguito si farà riferimento alla miscela EAW:EBW con il termine "EAW 1:1".

#### **Preparazione delle foglie di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Sono state utilizzate piante di fagiolo dell'età di 25 giorni, da cui sono state raccolte foglie della dimensione adatta per essere poste in piastre Petri ( $\varnothing=90$ mm). Ogni foglia è stata posta in una piastra Petri contenente sul

fondo un disco di carta assorbente e un disco di carta “scottex” soprastante, entrambi sterili.

### **Trattamento delle foglie**

Prima di trattare le foglie con le sospensioni conidiche sono stati aggiunti 0,1% di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,1% di Glucosio anidro (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germania). Su ogni foglia sono state poste 6 gocce di un volume di 10  $\mu\text{l}$  con una micropipetta (Figura 3). Le gocce sono state lasciate asciugare fino al punto in cui si osservava ancora un velo d’acqua. I trattamenti sono stati fatti seguendo lo schema riportato in Tabella 4. Le gocce delle sospensioni (10  $\mu\text{l}$ ) asciugavano entro un’ora a temperatura ambiente.

**Figura 3** illustrazione del posizionamento delle gocce sulle foglie



**Tabella 4** schema degli inoculi conidici dei due funghi e trattamenti effettuati con EAW 1:1 e relativi controlli; gocce successive al primo inoculo sono sempre state poste in corrispondenza di esso

	<b>momento 0</b>	<b>dopo 60 min</b>	<b>dopo 120 min</b>
1	Gocce (10 µl) della sospensione conidica (sc) di <i>B. cinerea</i> sulle foglie	Gocce (25 µl) di EAW 1:1	
2	Gocce (10 µl) della sc di <i>T. harzianum</i> sulle foglie	Gocce (25 µl) di EAW 1:1	
3	Gocce (10 µl) della sc di <i>B. cinerea</i> sulle foglie	Gocce (25 µl) di EAW 1:1	Gocce (10 µl) della sc di <i>T. harzianum</i>
4	Gocce (25 µl) di EAW 1:1		
5	Gocce (10 µl) della sc di <i>B. cinerea</i> sulle foglie	Gocce (25 µl) di acqua sterile	
6	Gocce (10 µl) della sc di <i>T. harzianum</i> sulle foglie	Gocce (25 µl) di EAW 1:1	
7	Gocce (10 µl) della sc di <i>B. cinerea</i> sulle foglie	Gocce (25 µl) di acqua sterile	Gocce (10 µl) della sc di <i>T. harzianum</i>
8	Gocce (25 µl) di acqua sterile		

## **Analisi statistica dei dati**

I dati ottenuti nelle diverse prove sono stati elaborati con il pacchetto statistico "Statistica" (Statsoft, Italia).

I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) e le medie separate mediante il test di Tukey.

## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Capacità germinativa dei conidi di *B. cinerea* dopo trattamento con diverse miscele di EAW e EBW

Per la valutazione dei risultati sono stati combinati i dati ottenuti nei due esperimenti, dato che essi dall'analisi statistica non risultano significativamente diversi.

In questi esperimenti si è saggiato l'effetto di un trattamento di miscele di EAW e EBW su conidi di *B. cinerea*. I risultati ottenuti (Tabella 5) mostrano che i conidi, dopo un trattamento con una miscela che presenta un valore pH 8.85 (valore medio tra le due repliche) o con valori pH inferiori e un ORP 136 mV o più elevati, perdono la vitalità e la germinazione osservata è bassa. Nel caso di diluizioni maggiori al rapporto 1:1 dell'EAW con EBW, si è osservato una percentuale bassa di conidi devitalizzati; nei trattamenti con le miscele con il rapporto 3:7, 1:9 e 0:10 (EAW:EBW) la media dei conidi devitalizzati è del 14,2%.

Si è evidenziato che non solo EAW pura ha una netta proprietà conidicida, ma anche le miscele fino ad un rapporto di 5:5. Per valori pH superiori a pH 8,85 e per valori ORP inferiori a 141mV la vitalità dei conidi viene influenzata in maniera molto inferiore.

Si è anche valutata l'influenza del pH sui conidi (inibizione della germinazione). Non si conosce ancora l'esatto meccanismo dell'azione fungicida di EAW (Buck *et al.*, 2002), ma si è dimostrato che l'alto potenziale ossidoriduttivo extracellulare (ORP) modifica i flussi metabolici

e la produzione di ATP, la quale probabilmente è dovuta ad un cambiamento nel flusso di elettroni nella cellula (Rionder *et al.*, 2000).

**Tabella 5** percentuali dei conidi di *B.cinerea* non germinati in relazione al tipo di miscela di EAW e EBW utilizzato per il trattamento, riferito al valore di pH e ORP medio delle due prove.

EAW:EBW	pH medio	ORP medio	Conidi devitalizzati (%)
10:0	2,59	1112	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
9:1	2,69	1090	100,00 ± 0,00
7:3	3,29	815↑↓	99,80 ± 0,32
6:4	6,21	565↑↓	99,20 ± 0,52
5.5:4.5	7,24	483↑↓	99,60 ± 0,42
5:5	8,85	136↑↓	99,80 ± 0,32
3:7	10,90	209↑↓	7,21± 2,50
1:9	11,32	803	15,54 ± 7,50
0:10	11,42	852	19,96 ± 11,63
controllo	6,20		6,00 ± 2,87

<sup>a</sup> deviazione standard ↑↓, valore non attendibile a causa dei salti di valore durante la misurazione

## 4.2 Influenza di un trattamento con acqua a valori di pH determinato sulla vitalità di conidi di *B. cinerea*

Dalla valutazione di 5 cm<sup>2</sup>, scelti casualmente sulle piastre Petri, si è evidenziato una elevata percentuale di germinazione, che in ognuna delle repliche dei trattamenti è maggiore di 71% (Tabella 6).

**Tabella 6** percentuale di germinazione dopo trattamento dei conidi di *B. cinerea* in soluzioni a valore di pH determinato, ogni replica è rappresentata da un x.

valori pH di riferimento	0-35%	36-70%	71-100%
2.6	–	–	XXXXX
2.7	–	–	XXXXX
3.3	–	–	XXXXX
6.1	–	–	XXXXX
6.2	–	–	XXXXX
7.2	–	–	XXXXX
8.9	–	–	XXXXX
10.9	–	–	XXXXX
11.3	–	–	XXXXX
11.4	–	–	XXXXX

Con questo esperimento è stato confermato che il solo valore pH non ha influenza sulla vitalità dei conidi di *B. cinerea*. Quindi un altro meccanismo d'azione di EAW è responsabile della perdita della vitalità dei conidi di *B. cinerea*.

Questo non significa che il valore pH non abbia una funzione importante per il funzionamento dell'acqua elettrolizzata, infatti è stato dimostrato che un valore pH basso della soluzione ha come effetto che l'acido ipocloroso non degradi immediatamente (Tsuji *et al.*, 1999).

Per conoscere l'esatto funzionamento di EAW si dovranno condurre esperimenti chimico-biologici più approfonditi.

### **4.3 Effetto inibitore di EAW 1:1 da sola o in combinazione con un fungo antagonista (*T. harzianum*) sulla germinazione dei conidi di *B. cinerea***

In vista di un uso pratico di EAW si può immaginare che esso potrebbe avere ancora più potenzialità in combinazione con un agente di biocontrollo (BCA). L'isolato T39 di *Trichoderma harzianum* è attivo contro diversi patogeni fungini, tra cui *B. cinerea*.

In questo esperimento è stato saggiato l'effetto della combinazione di EAW 1:1 e T39 sulla vitalità dei conidi di *B. cinerea* in vitro.

Tutte le tesi con EAW non davano luogo a colonie né di *B. cinerea* né di *T. harzianum* (Tabella 7), dimostrando così un'elevata tossicità nei confronti di ambedue gli organismi. Per questo motivo non si è ritenuto opportuno contare le colonie di *B. cinerea* e *T. harzianum* separatamente per la tesi nr. 8. Tuttavia, in tutte le 5 repliche inoculate con *B. cinerea*, trattate con acqua sterile e successivamente inoculate con *T. harzianum* si è osservata la contemporanea crescita dei due funghi. *T. harzianum* ha mostrato un effetto antagonistico sulla crescita di *B. cinerea*.

Nei saggi dove è stata aggiunta l'acqua elettrolizzata i conidi sia di *B. cinerea*, sia di *T. harzianum* hanno perso vitalità. I conidi di *T. harzianum* aggiunti 10 minuti dopo il trattamento con EAW 1:1 hanno perso anch'essi la vitalità. Ciò può essere dovuto al grande volume di EAW 1:1 utilizzato (10 ml) rispetto al volume di sospensione conidica (200 µl). EAW 1:1 non si è neutralizzata con l'aggiunta dei conidi di *B. cinerea*, prima di *T. harzianum* e il potere ossidativo rimasto è stato sufficiente per uccidere i conidi del fungo antagonista.

**Tabella 7** valori medi di 5 repliche di conidi germinati in 5 cm<sup>2</sup> delle diverse tesi.

n°	Tesi		<i>B.cinerea</i>	<i>T.harzianum</i>	
1	EAW 1:1		– <sup>x</sup>	–	
2	<i>B.cinerea</i>	EAW 1:1	0,0	–	
3	<i>T. harzianum</i>	EAW 1:1	–	0,0	
4	<i>B. cinerea</i>	EAW 1:1	<i>T. harzianum</i>	0,0	0,0
5	Acqua sterile		–	–	
6	<i>B.cinerea</i>	Acqua sterile	57,4	–	
7	<i>T. harzianum</i>	Acqua sterile	–	99,4	
8	<i>B.cinerea</i>	Acqua sterile	<i>T. harzianum</i>	>0	>0

(<sup>x</sup>) – assenza di colonie in quanto non inoculato

Da precedenti esperimenti (non riportati in questa tesi) si era verificato che bastavano pochi minuti a contatto con l'aria o con conidi fungini per avere una completa disattivazione del potere fungicida di EAW. Quest'aspetto è importante da considerare nell'eventuale applicazione pratica: nel caso in cui si ipotizzasse l'utilizzo di EAW prima dell'aggiunta di un organismo antagonista, sarà necessario far passare il tempo necessario ad ottenere una completa inattivazione di EAW.

Dopo quattro giorni di crescita si osserva che nelle piastre trattate con EAW 1:1 non si è avuta crescita; conidi di *B. cinerea* trattati con acqua sterile sono germinati e hanno occupato tutta la superficie della piastra e anche i conidi di *T. harzianum* trattati con acqua sterile sono germinati e hanno occupato tutta la superficie della piastra. Nel caso del trattamento di conidi *B. cinerea* con acqua sterile ed il successivo inoculo di *T.*

*harzianum* si osserva un netto effetto antagonistico di *T. harzianum* nei confronti di *B. cinerea* (Tabella 8).

I risultati ottenuti non consentono di trovare utili informazioni, visto l'effetto letale su ambedue gli organismi saggiati dall'EAW.

**Tabella 8** Superfici medie, in percentuale, coperte rispettivamente dai due funghi dopo 4 giorni di crescita su PDA in piastra

Nr.	Tesi		Superficie coperta da <i>B.cinerea</i>	Superficie coperta da <i>T. harzianum</i>
1	EAW 1:1		0	0
2	<i>B.cinerea</i>	EAW 1:1	0	0
3	<i>T. harzianum</i>	EAW 1:1	0	0
4	<i>B. cinerea</i>	EAW 1:1	<i>T. harzianum</i>	0
5	Acqua sterile		0	0
6	<i>B.cinerea</i>	Acqua sterile	100%	0
7	<i>T. harzianum</i>	Acqua sterile	0	100%
8	<i>B.cinerea</i>	Acqua sterile	<i>T. harzianum</i>	4,49%
				95,51%

#### **4.4 Effetto inibitore di EAW 1:1 da sola o in combinazione con un antagonista (*T. harzianum* T39) sull'inibizione di infezioni su fagiolo**

Dopo aver accertato il range di diluizione di EAW con EBW, che risulta efficace nell'uccidere i conidi di *B.cinerea* in vitro e dopo aver ottenuto i risultati sulla combinazione con l'antagonista *T. harzianum* si è voluto vedere l'effetto di un trattamento di EAW mescolata con EBW nel rapporto 1:1 in combinazione con *T. harzianum* in vivo, cioè nei confronti di infezioni di *B. cinerea* su foglie di fagiolo.

Dopo 2 giorni di incubazione si potevano notare i primi sintomi e dopo 4 giorni si è raggiunto il grado ottimale di espansione delle infezioni per effettuare la valutazione. Si può notare che EAW 1:1 (Tabella 9, tesi 2 ) ha un effetto inibitore sulla capacità infettiva di *B. cinerea*. *T. harzianum* non infetta la foglia. Inoltre si può osservare una significativa diminuzione di infezione nel caso del trattamento con acqua sterile e *T. harzianum* (Tabella 9, tesi 8) rispetto al solo trattamento con acqua sterile (Tabella 9, tesi 6) dopo l'inoculo con *B. cinerea*.

Dai risultati di questo esperimento è evidente che sia il trattamento con EAW 1:1 che l'azione di *T. harzianum* (da soli e in combinazione) hanno ridotto in maniera considerevole l'infezione della foglia di fagiolo da parte del patogeno, in quanto i valori delle superfici delle aree lesionate sono risultate significativamente diverse rispetto al controllo trattato con acqua sterile per un  $\alpha=0.05$ .

Il test di Tukey non mette in evidenza che nel caso del trattamento con EAW 1:1 e la successiva inoculazione con *T. harzianum* ci sia una maggiore riduzione dell'infezione rispetto al trattamento con il solo EAW o con il solo *T. harzianum*.

**Tabella 9** Analisi della varianza dei valori medi di 5 repliche ognuna costituita da una foglia di fagiolo inoculato con 6 gocce di sospensione conidica di *B. cinerea*; gruppi con lettera diversi corrispondono a valori significativamente diversi (ANOVA a 1 via, test Tukey per il confronto tra medie,  $\alpha=0.05$ ).

Nr.	Tesi		Area media delle lesioni (cm <sup>2</sup> )	gruppi	
1		EAW 1:1	0,0	a	
2	<i>B.cinerea</i>	EAW 1:1	9,3	a	
3	<i>T. harzianum</i>	EAW 1:1	0,0	a	
4	<i>B. cinerea</i>	EAW 1:1	<i>T. harzianum</i>	0,6	a
5		Acqua sterile	2,5	a	
6	<i>B.cinerea</i>	Acqua sterile	46,3	b	
7	<i>T. harzianum</i>	Acqua sterile	0,0	a	
8	<i>B.cinerea</i>	Acqua sterile	<i>T. harzianum</i>	9,6	a

## 5. Conclusioni

Le prove effettuate in questa tesi sono un'indagine preliminare che ha permesso di conoscere alcuni aspetti legati al potenziale utilizzo pratico di EAW come fungicida.

Gli aspetti più interessanti di EAW sono il suo basso costo di produzione (una volta ammortizzato il costo della macchina, i costi sono irrisori), la rapida disattivazione e l'assenza di residui sugli organi trattati, il basso rischio per gli operatori. D'altro canto ci sono ancora numerose difficoltà da superare, come i tempi limitati di efficacia, l'effetto di ossidazione che si può avere sulle parti metalliche nelle serre e la necessità di effettuare numerosi trattamenti.

Il suo principale vantaggio è quello di abbassare la carica d'inoculo, in modo particolare se costituita da spore e micelio. Questa azione potrebbe essere combinata con l'uso successivo di mezzi di controllo con ridotta efficacia, come ad esempio i biofungicidi basati sull'azione di microrganismi antagonisti o induttori di resistenza. Questa possibilità dovrà essere ulteriormente studiata, ottimizzando i protocolli di applicazione.

Visto l'effetto rapido e di superficie di EAW, è verso i funghi produttori di grosse quantità di conidi che s'indirizzeranno gli studi futuri. Considerata l'elevata efficacia nei confronti dei conidi probabilmente anche il lavaggio dei frutti dopo la raccolta potrebbe essere un settore d'intervento da non trascurare.

Rimane interessante l'ipotesi, da valutare con successivi esperimenti, di poter ridurre la quantità di inoculo di *Trichoderma harzianum* grazie all'eventuale effetto positivo dell'EAW.

In conclusione l'utilizzo di EAW si è dimostrato promettente per futuri sviluppi nell'ambito della difesa delle colture dai patogeni.

# Ringraziamenti

La sperimentazione è stata svolta presso l'istituto Agrario di S. Michele all'Adige, nell'ambito delle attività del Centro SafeCrop, finanziato dal Fondo per la ricerca, Provincia Autonoma di Trento, in collaborazione con l'azienda CBC Europe, Milano, che ha fornito il prototipo di elettrolizzatore.

Esprimo sincera gratitudine alla Dott.ssa Ilaria Pertot per la pazienza e gli insegnamenti ricevuti.

Rivolgo sentiti ringraziamenti al Prof. Giovanni Vannacci, Dott. Cesare Gessler e Dott. Yigal Elad.

## 6. Bibliografia

Bari M. L., Sabina Y., Isobe S., Uemura T., Isshiki K., 2003. Effectiveness of electrolyzed oxidized water in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes. *Journal of Food Protection* 66, 542- 548.

Blakeman J. P., Brodie I. D. S., 1977. Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens and beetroot leaves. *Physiological Plant Pathology* 10, 29-42.

Buck J., van Iersel M. W., Oetting R. D., Hung Y.-C., 2002. In Vitro Fungicidal Activity of Acidic Electrolyzed Oxidizing Water. *Plant Disease* 86, 278- 281.

Buck J., van Iersel M. W., Oetting R. D., Hung Y.-C., 2003. Evaluation of acidic electrolyzed water for phytotoxic symptoms on foliage and flowers of bedding plants. *Crop protection* 22, 73-77.

Crinò P., A. Sonnino, F. Saccardo, M. Buiatti, A. Porta-Puglia, G. Surico, 1993. Miglioramento genetico delle piante per resistenza a patogeni e parassiti. Edagricole, Bologna.

De Meyer G., Bigirimana J., Elad Y., and Hofte M., 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104, 279–286.

Elad Y., 1993. Biological control on grape mould by means of *Trichoderma harzianum*. *Crop Protection* 13, 35-38.

Freeman S., Minz D., Kolesnik I., Barbul O., Zveibil A., Maymon M., Nitzani Y., Kirshner B., Rav-David D., Bilu A., Dag A., Shafir S., Elad Y., 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 110, 361–370.

Ghisalberti E. L., Rowland G. Y., 1993. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Production* 56, 1799–1804.

Goidanich G., 1964. Manuale di patologia vegetale. Edizioni agricole, Bologna.

Hjeljord L., Tronsmo A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biocontrol: an overview, p. 135–151. In Kubicek C. P., Harman G. E., *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis, London.

Inbar J., Abramsky D., Cohen D., Chet I., 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology* 100, 337–346.

Izumi H., 1999. Electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut vegetables. *Journal of Food Science* 64, 536-539.

Kim C., Hung Y.-C., Brackett R. E., 2000a. Rules of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food related pathogens. *Journal of Food Protection* 63, 19-24.

Kim C., Hung Y.-C., Brackett R. E., 2000b. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 61, 199-207.

Kosuge T., Hewitt W. B. 1964. Exudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 54, 167-172.

Kubicek C. P., 1998. In: Harman G. E., *Trichoderma & Gliocladium* Vol.1. Taylor & Francis, London.

Matta A., 1996. Fondamenti di patologia vegetale. Patròn Editore, Bologna.

Mattedi L., Varner M., 2000. Natura e Agricoltura, produzione integrata attraverso la conoscenza delle principali malattie fungine del melo e della vite. Gruppo Mezzocorona, Mezzocorona.

Oomori T., Oka T., Inuta T., Arata Y., 2000. The efficiency of disinfection of acidic electrolyzed water in the presence of organic materials. *Analytical Sciences* 16, 365-369.

Rionder C., Cachon R., Waché Y., Alcaraz G., Diviès C., 2000. Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 128, 620-626.

Rossall S., Mansfield J. W. 1980. Investigation of the causes of poor germination of *Botrytis* spp. On broad bean leaves (*Vicia faba* L.). *Physiological Plant Pathology* 16, 369-382.

Simon A., Sivasithamparan K., 1989. Pathogen suppression: a case study of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 331–337.

Tsuji S., Kawano S., Oshita M., Ohmae A., Shinomura Y., Miyazaki Y., Hiraoka S., Matsuzawa Y., Kamada T., Hori M., Maeda T., 1999. Endoscope Disinfection Using Acidic Electrolytic Water. *Endoscopy* 31, 528-535.

Venkitanarayanan K., Ezeike G. O. I., Hung Y.-C., Doyle M.P., 1999. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on plastic kitchen cutting boards by electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Protection* 62, 857-860.

Zimand G., Elad Y., Chet I., 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* Pathogenicity. *Phytopathology* 86, 1255-1260.