

Uno sguardo all'evoluzione della lotta biologica alle malattie da conservazione dei prodotti ortofrutticoli

Samir Droby* - Davide Spadaro**

* Dept. Postharvest Science, Institute of Postharvest and Food Sciences, ARO, the Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israele.

** Dipartimento di Scienze Agrarie, forestali e Alimentari DISAFA e Centro di Competenza per l'Innovazione in campo agro-ambientale AGROINNOVA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO).

Riassunto

Uno dei principali approcci di difesa alternativi che sostituiscono l'uso di fungicidi chimici è l'uso di antagonisti microbici. Questi antagonisti possono essere applicati ai sui prodotti ortofrutticoli come agenti di lotta biologica per inibire una varietà di agenti patogeni post-raccolta. I batteri e i lieviti antagonisti sono stati isolati dalla frutta e da altre superfici della pianta e hanno dimostrato di presentare relativamente elevati livelli di efficacia nei saggi di laboratorio e in condizioni semi-commerciali. La presente rassegna offre una panoramica sui vari aspetti dell'uso di antagonisti microbici come agenti di lotta biologica post-raccolta, incluse le metodiche per identificare potenziali antagonisti, gli studi sui meccanismi che contribuiscono all'antagonismo, l'influenza dei parametri ambientali sulla crescita e sulla fitness di un antagonista, le tecnologie di produzione di massa e di formulazione e l'integrazione dell'uso di antagonisti con altri approcci alternativi.

Parole chiave: antagonisti, biofungicidi, fermentazione, formulazione, marciumi post-raccolta.

Summary

A glance over the evolution of biocontrol of postharvest diseases on fruit and vegetables

One of the major alternative control approaches replacing the use of chemical fungicides is the use of microbial antagonists. These antagonists can be applied to harvested produce as biocontrol agents to inhibit a variety of postharvest pathogens. Bacterial and yeast antagonists have been isolated from fruit and other plant surfaces and demonstrated to exhibit relatively high levels of efficacy in lab and pilot tests conducted under semi-commercial conditions. This chapter presents an overview of the various aspects of using microbial antagonists as postharvest biocontrol agents, including the procedures used to identify potential antagonists, the mechanisms that contribute to biocontrol activity, the influence of environmental parameters on the growth and fitness of a biocontrol agent, mass production and formulation technologies and the integration of the use of antagonists with other alternative approaches.

Key words: antagonists, biofungicides, fermentation, formulation, postharvest decay.

Spinte verso strategie di difesa alternative in post-raccolta

La richiesta di sistemi di produzione più sostenibili, basati sull'agricoltura biologica, di produzioni alimentari localizzate, l'avversione pubblica alle colture geneticamente modificate e la sensibilità verso la protezione dell'ambiente, sono tutti argomenti che negli ultimi 20 - 30 anni hanno alimentato un crescente interesse verso la ricerca di approcci alternativi alla lotta chimica nella gestione delle malattie delle piante. Sulla base di queste preoccupazioni pubbliche e delle legittime preoccupazioni in materia di salute e sicurezza, la regolamentazione è diventata più restrittiva riguardo ai prodotti che possono essere utilizzati in agricoltura. La situazione è particolarmente complicata per l'uso di fungicidi in post-raccolta e le restrizioni hanno avuto un grande impatto sull'esportazione e sulla spedizione di prodotti verso i mercati esteri. Al momento, l'Unione Europea impone i maggiori limiti all'impiego di agrofarmaci di sintesi sui prodotti ortofrutticoli (Wisniewski *et al.*, 2016).

Le grandi catene di supermercati e molti fornitori all'ingrosso di frutta hanno iniziato a stabilire i propri standard per quantità massime di residui chimici e numero di ingredienti attivi ammessi nei prodotti, o addirittura utilizzati in campo. Restrizioni all'uso di alcuni fungicidi in pre-raccolta si traducono anche in un aumento dei livelli di infezione di alcuni agenti patogeni post-raccolta e delle infezioni latenti già presenti alla raccolta.

Una delle principali attività condotte negli ultimi decenni è stata la ricerca e l'impiego di antagonisti microbici applicati in conservazione come agenti di lotta biologica per il contenimento di numerosi agenti patogeni in post-raccolta. Batteri e lieviti antagonisti sono stati isolati dalla superficie dei frutti e hanno mostrato elevati livelli di efficacia in prove condotte in condizioni controllate e semi-commerciali.

Scoperta di agenti di lotta biologica: isolamento, selezione e identificazione di antagonisti

La protezione delle ferite superficiali è stato il principale tema di ricerca sulla lotta biologica alle malattie in post-raccolta negli ultimi tre decenni. L'attenzione si è concentrata sull'isolamento di microrganismi epifitici che possono rapidamente colonizzare e crescere nelle ferite. I conidi dei patogeni germinano molto rapidamente (entro 24 ore) e colonizzano le ferite che sono ricche di zuccheri e altre sostanze nutritive. In ferita, è necessario interferire con la germinazione dei conidi e/o la crescita dei tubuli germinativi in tempi rapidi al fine di prevenire o inibire le infezioni. Per proteggere le ferite contro la colonizzazione dei patogeni, sono state definite le caratteristiche di un antagonista ideale da Wilson e Wisniewski (1989); tra esse spiccano una rapida crescita e colonizzazione di ferite fresche, la stabilità genetica, l'efficacia a basse concentrazioni, la sopravvivenza in condizioni ambientali avverse, l'efficacia contro un'ampia gamma di patogeni, la crescita senza particolari richieste nutrizionali su terreni di crescita economici, l'assenza di tossicità per l'uomo, la compatibilità con le pratiche di lavorazione commerciale e la possibilità di una più lunga conservazione grazie alla formulazione. Tra i primi tentativi di sviluppare agenti di lotta biologica

per il post-raccolta, Pusey e Wilson (1984) descrissero la capacità di un ceppo di *Bacillus subtilis* di contenere il marciume bruno delle pesche causato da *Monilinia fructicola*. Successivamente, si è scoperto che l'antibiotico iturina, prodotto dal batterio, era il principale fattore responsabile del contenimento del marciume bruno. L'uso di un microorganismo che produce antibiotici negli alimenti ha sollevato numerose preoccupazioni. Per evitare l'isolamento di antagonisti produttori di antibiotici, Wilson *et al.* (1993) hanno suggerito di utilizzare ferite sui frutti per selezionare lieviti come potenziali antagonisti contro i marciumi post-raccolta. Questa strategia per la selezione rapida di potenziali antagonisti con minimo dispendio di tempo e di costi è stata successivamente utilizzata in molti programmi di lotta biologica post-raccolta in tutto il mondo, invece della selezione *in vitro* su capsule Petri. Gli organismi vengono isolati dalle ferite che non sviluppano marciume, piastrandoli e ottenendo colture pure. Le colture pure dei microrganismi vengono successivamente valutate singolarmente come potenziali agenti di lotta biologica mediante trattamento in ferita su frutta. Gli organismi che mostrano un'attività antagonistica contro un ampio spettro di funghi post-raccolta e di prodotti ortofrutticoli sono identificati mediante caratterizzazione morfologica e fisiologica e/o il sequenziamento del DNA di regioni conservate del DNA ribosomiale (Kurtzman e Droby, 2001). Questa procedura ha portato all'identificazione di numerosi antagonisti del lievito. Un elenco completo di antagonisti identificati è stato recentemente pubblicato da Sharma *et al.* (2009) e Wisniewski *et al.* (2016).

Droby *et al.* (2009) hanno sollevato diverse obiezioni sulla rilevanza del paradigma esistente per l'identificazione di antagonisti che si prevede funzionino in situazioni reali, dove sono presenti molte ferite che fungono da via di accesso alle infezioni fungine. Nell'attuale paradigma della lotta biologica in post-raccolta, è previsto che un solo antagonista isolato da una specie vegetale sia efficace su altre colture che sono diverse per aspetti genetici, fisiologici, di lavorazione post-raccolta e di suscettibilità a marciumi da conservazione. Forse questo paradigma è inappropriato, date le conoscenze di ecologia microbica e del microbiota vegetale accumulate negli ultimi anni, favorite dagli approcci metagenomici.

Il meccanismo di azione dei microrganismi antagonisti

La comprensione del meccanismo di azione degli antagonisti post-raccolta è essenziale per lo sviluppo del biofungicida ed è rilevante ai fini della commercializzazione, poiché consente di migliorare le prestazioni della lotta biologica mediante formulazioni e metodi di applicazione appropriati e facilita il processo di registrazione del formulato commerciale (Spadaro *et al.*, 2010a). Gli agenti di lotta biologica mostrano quattro principali meccanismi d'azione: i) antibiosi; ii) competizione per sostanze nutritive e spazio; iii) parassitismo o interazione diretta con il patogeno; e iv) resistenza indotta nell'ospite (Janisiewicz e Korsten, 2002; Liu *et al.*, 2013; Spadaro e Droby, 2016). Spesso, più di un meccanismo è coinvolto. Ad esempio, i ceppi delle due specie sorelle *Metschnikowia pulcherrima* e *M. fructicola* possono competere per le sostanze nutritive, rilasciare idrolasi, indurre resistenza nell'ospite, produrre

e indurre specie reattive dell'ossigeno, ma possono anche biodegradare micotossine prodotte dai patogeni fungini (Herschkowitz *et al.*, 2012; 2013; Macarasin *et al.*, 2010; Spadaro *et al.*, 2008; 2013). Un antagonista efficace è dotato di diverse caratteristiche, che lavorano in maniera sinergistica. Alcuni tratti degli antagonisti di successo possono essere la capacità di adesione al frutto, il rilascio di idrolasi extracellulari, l'induzione di resistenza, la regolazione della densità di popolazione, la formazione di biofilm e la secrezione di sostanze antimicrobiche. Inoltre, la resistenza allo stress ossidativo e la capacità di produrre specie reattive dell'ossigeno sono anch'esse associate all'efficacia della lotta biologica.

Una delle principali modalità di azione degli antagonisti è la competizione per le sostanze nutritive e per lo spazio, una sovrapposizione di nicchie risultante dalla contemporanea richiesta per la stessa risorsa da parte del patogeno e dell'antagonista. Nella competizione per lo spazio, lieviti e batteri presentano il vantaggio di una rapida moltiplicazione e colonizzazione (Droby *et al.*, 1989; Spadaro *et al.*, 2010b) e possono formare una capsula polisaccaridica extracellulare che promuove l'adesione alla superficie del frutto. Sulla superficie interna delle ferite, la capacità di formare biofilm, dove i microrganismi sono racchiusi in una matrice idratata, favorisce la competizione (Lutz *et al.*, 2013). I lieviti che formano biofilm sono risultati efficaci contro *Penicillium expansum* su mela, ma solo le cellule di lievito raccolte dalla fase di biofilm sono state in grado di colonizzare in modo efficiente la superficie interna delle ferite (Ianiri *et al.*, 2013).

Nelle ferite sui frutti, la competizione per le sostanze nutritive è particolarmente rilevante per il ferro. Il ferro è essenziale per la crescita e la patogenesi dei funghi e la capacità di sequestrare il ferro da parte di microrganismi non patogeni può essere sfruttato nei sistemi di lotta biologica in post-raccolta.

Determinare il ruolo, i componenti e i fattori coinvolti nella competizione per le sostanze nutritive e per lo spazio è fondamentale per migliorare l'efficacia della lotta biologica durante la produzione e la formulazione. L'aggiunta di un fattore limitante o di una sostanza nutritiva essenziale per una migliore crescita dell'antagonista può migliorare significativamente la sua efficacia.

L'antibiosi è l'inibizione o la distruzione di un microorganismo da parte di antibiotici diffusibili o volatili prodotti da un altro microorganismo. Alcuni microrganismi iniziano a produrre antibiotici quando la disponibilità di substrati nutrizionali diminuisce, impedendo ad altri microrganismi di utilizzare la quantità rimanente di substrato.

Oltre ai composti diffusibili, è noto che molte specie fungine producono composti organici volatili con proprietà antifungine, che possono essere utilizzati per la biofumigazione. *Muscodor albus* è un fungo endofitico che produce una miscela di volatili con attività antimicrobica per il contenimento di malattie della frutta in post-raccolta (Mercier e Smilanick, 2005). I microrganismi che producono volatili aprono nuove possibilità per la lotta biologica in post-raccolta, poiché la biofumigazione non richiede il contatto fisico con i frutti da trattare e riduce l'impegno lavorativo rispetto

all'irrorazione.

Gli antagonisti e i patogeni possono anche interagire attraverso parassitismo diretto, con conseguente distruzione diretta o lisi del micelio e dei propaguli fungini composti da glucani, mannoproteine e chitina. I micoparassiti utilizzano enzimi che degradano la parete cellulare, come β -1,3-glucanasi, chitinasi e proteasi, per sciogliere le pareti cellulari e penetrare nelle cellule fungine.

Lo stress ossidativo svolge un ruolo cruciale nella lotta biologica e potrebbe essere coinvolto nelle vie di segnalazione associate all'attivazione della risposta di resistenza dei frutti (Chan e Tian, 2005). La capacità di sopravvivere e proliferare nei tessuti dell'ospite feriti e di tollerare lo stress ossidativo è essenziale per gli antagonisti post-raccolta (Castoria *et al.*, 2003).

Produzione e formulazione su larga scala

La formulazione e la produzione degli antagonisti sono aspetti critici per l'applicabilità e il successo commerciale dei biofungicidi. Di solito, questi processi sono condotti in associazione o direttamente da aziende private, in base ad un accordo con il ricercatore o l'ente avente diritti sull'antagonista.

I lieviti e i batteri antagonisti possono essere prodotti mediante un processo di fermentazione liquida in fermentatore (produzione liquida) o, in alcuni casi, utilizzando la fermentazione semisolida o in stato solido. La composizione nutrizionale del mezzo di crescita e le condizioni di crescita sono fondamentali sia per la produzione di biomassa sia per la produzione di metaboliti secondari, se questi ultimi sono richiesti nella formulazione finale. I componenti del mezzo di crescita dovrebbero fornire i nutrienti necessari, essere poco costosi e prontamente disponibili. L'uso di prodotti commerciali e sottoprodotti di altre industrie è una buona opzione per ridurre i costi e di facile reperimento. I sottoprodotti, tuttavia, non sono standardizzati e possono contenere impurità (Stanbury *et al.*, 1995). La loro composizione, inoltre, può variare con la stagione e il luogo di origine. Tutti questi aspetti hanno limitato il loro uso nei processi industriali. Alcuni dei sottoprodotti più comunemente utilizzati sono i concentrati di proteine animali, il siero latteo, la melassa e i derivati dei cereali. Uno dei colli di bottiglia nella produzione di biofungicidi è il processo di formulazione a causa del profondo effetto che ha sull'efficacia e sulle prestazioni in condizioni commerciali su larga scala. La formulazione finale dovrebbe garantire una lunga durata, la capacità di crescere e sopravvivere dopo l'applicazione, l'efficacia nel contenimento della malattia, una facilità d'impiego, distribuzione ed applicazione, oltre ad essere economicamente conveniente (Fravel *et al.*, 1998). Le formulazioni per antagonisti possono essere sia liquide sia solide. Le formulazioni liquide sono a base oleosa, acquosa, polimerica, o loro combinazioni. Tali formulazioni richiedono misure aggiuntive, tra cui la possibilità di conservare le cellule antagoniste in una soluzione con diversi additivi, al fine di stabilizzare la sopravvivenza per un lungo periodo di tempo e migliorare l'applicazione del prodotto. Gli additivi utilizzati sono stabilizzanti, aderenti, tensioattivi, coloranti, nutrienti aggiuntivi o altri tipi di coadiuvanti. I prodotti a base

oleosa riducono l'evaporazione delle goccioline e consentono un'applicazione a volume ultra-ridotto. Alcuni esempi di microrganismi formulati in liquido sono *Candida sake* (Abadias *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2003), *C. laurentii* (Liu *et al.*, 2009) e *Pichia anomala* (Melin *et al.*, 2011). Il principale limite di questo tipo di formulato è la necessità di conservazione a bassa temperatura.

Le formulazioni secche, comprese le polveri bagnabili (WP), i granuli idrodispersibili (WG), le polveri solubili (SP) e i granuli (GR), possono essere prodotte mediante processi di essiccazione, come la liofilizzazione, l'essiccazione per irrorazione e l'essiccazione su letto fluido. Le fasi di lavorazione aggiuntive necessarie per produrre una formulazione secca aumentano i costi di produzione, ma riducono i costi di spedizione a causa della riduzione di peso. La maggior parte delle formulazioni secche include un veicolante inerte, come alginato, argilla fine, torba, vermiculite, talco, derivati della cellulosa (carbossimetilcellulosa) e altri polimeri come xantano.

Rispetto alle formulazioni liquide, i prodotti essiccati sono più vantaggiosi a causa della loro conservazione prolungata, della praticità di trasporto e della capacità di produrre grandi quantità di prodotto essiccato ad un costo relativamente basso. I prodotti secchi hanno frequentemente una bassa vitalità delle cellule a causa dello stress termico e da disidratazione provocati durante il processo di essiccazione. Ciononostante, la vitalità delle cellule microbiche e l'efficacia antagonista possono essere migliorate aggiungendo stabilizzanti e sostanze protettive (ad esempio polimeri, zuccheri, albumina, latte, sali, miele, polioli o amminoacidi) al mezzo di formulazione. I componenti dei mezzi di formulazione esplicano due funzioni importanti nel preservare la vitalità delle cellule: forniscono un residuo secco che funge da recettore nel processo di reidratazione e proteggono le cellule dai danni biologici causati dal processo di essiccazione (Abadias *et al.*, 2001; Melin *et al.*, 2011). Alcuni di questi additivi aiutano anche il microrganismo a sopravvivere all'esposizione a condizioni ambientali variabili e frequentemente avverse, come la luce ultravioletta (UV), il basso potenziale idrico, la scarsità di sostanze nutritive, le temperature estreme e le precipitazioni (Cañamás *et al.*, 2008; Köhl e Fokkema, 1998).

Non esiste una ricetta generale per la formulazione di agenti di lotta biologica e diversi metodi sono stati messi a punto in maniera empirica per ogni organismo o ceppo. I requisiti critici per la formulazione sono determinati dal meccanismo di azione degli antagonisti, insieme alle condizioni ambientali in cui verrà applicato l'organismo e alla funzione che l'antagonista dovrebbe svolgere (Burgess and Jones, 1998).

Sviluppo commerciale di biofungicidi per il post-raccolta

Cambiamenti significativi nelle normative sulla sicurezza alimentare, nonché una maggiore consapevolezza ambientale, hanno aumentato la domanda di prodotti per la lotta biologica. Di conseguenza, le multinazionali agrochimiche e le industrie microbiche (come i produttori di lievito) hanno investito fortemente in progetti di espansione nelle tecnologie di lotta biologica. Ciò si

riflette nel numero di acquisizioni di società di piccole e medie dimensioni specializzate nello sviluppo di tecnologie verdi per la difesa dalle malattie delle piante da parte di grandi multinazionali, tradizionalmente legate alla lotta chimica (CPM, 2010). Nel caso delle industrie interessate a produzioni microbiche per la panificazione, la fermentazione della birra e del vino, risultano nuovi l'applicazione dei microrganismi e di competenze. Considerando vincoli posti dai fattori esterni (coltivatori, consumatori e legislatori), le grandi multinazionali agrochimiche sono guidate da due parametri: la prevenzione della resistenza agli agrofarmaci e la necessità di residui minimi o nulli nelle derrate alimentari. Il loro ulteriore obiettivo è quello di offrire un portafoglio completo di strumenti di difesa, tra cui prodotti convenzionali e biologici, ai loro clienti (distributori e coltivatori). Se un prodotto destinato principalmente all'utilizzo in post-raccolta è anche in grado di contenere le infezioni pre-raccolta o è utilizzabile come trattamento complementare ai prodotti convenzionali esistenti allo scopo di gestire la resistenza e i problemi di residui, le multinazionali saranno molto più interessate ad un impiego pratico dei biofungicidi. L'obiettivo principale rimane comunque la riduzione al minimo o l'eliminazione dei residui chimici nei prodotti ortofrutticoli.

In studi di laboratorio, semi-commerciali e commerciali sono stati identificati numerosi antagonisti microbici (lieviti e batteri) di patogeni post-raccolta (Droby *et al.*, 2009). Molti di questi antagonisti hanno raggiunto livelli avanzati di sviluppo e commercializzazione. Nella prima generazione di biofungicidi registrati e resi commercialmente disponibili c'erano *Candida oleophila* (Aspire, Ecogen, Langhorne, Stati Uniti) (Droby *et al.*, 2016), *Cryptococcus albidus* (YieldPlus, Lallemand, Montreal, Canada), *Candida sake* (Candifruit, IRTA, Lleida, Spagna) (Teixidó *et al.*, 2011), *Pseudomonas syringae* (BioSave, JET Harvest, Longwood, Stati Uniti) (Janisiewicz e Jeffers, 1997; Janisiewicz e Korsten, 2002). Aspire, Yieldplus e Candifruit sono stati commercializzati per alcuni anni, ma sono stati ritirati a causa di problemi aziendali e di marketing. Biosave è ancora impiegato sul mercato statunitense per diversi usi in post-raccolta (Janisiewicz e Peterson, 2004). *Bacillus subtilis* (Avogreen, Università di Pretoria, Pretoria, Sud Africa) è stato introdotto in Sud Africa per il contenimento della cercosporiosi dell'avocado, ma non ha avuto successo commerciale a causa di risultati non costanti (Demoz e Korsten, 2006). Un ceppo di *C. oleophila* (Nexy, Lesaffre, Lille, Francia) è stato sviluppato in Belgio per l'applicazione in post-raccolta su pomacee, agrumi e banane (Lahlali *et al.*, 2009). Nexy ha ricevuto l'approvazione alla registrazione in tutta l'Unione Europea nel 2013 (Massart e Jijakli, 2014). *Aureobasidium pullulans* (BoniProtect, Bio-Ferm, Tulln, Austria) può essere impiegato in pre-raccolta per il contenimento dei patogeni per ferita che si sviluppano sulle pomacee in conservazione (Lima *et al.*, 2015). Un altro prodotto basato su *Pantoea agglomerans* CPA-2 (Pantovital, Domca, Granada, Spagna) efficace contro i principali patogeni post-raccolta di pomacee e agrumi (Cañamás *et al.*, 2008; Plaza *et al.*, 2004; Teixidó *et al.*, 2001) è stato formulato ma mai commercializzato (Torres

et al., 2014). *M. fructicola* (Shemer, Bayer, Leverkusen, Germania) registrato in Israele per l'applicazione in pre- e post-raccolta su vari prodotti ortofrutticoli, tra cui albicocche, agrumi, uva, pesche, peperoni, fragole e patate dolci rappresenta un esempio di maggior successo di un prodotto per la lotta biologica in post-raccolta. Shemer è stato acquisito da Bayer CropScience (Germania) e la licenza è stata concessa a Koppert (Paesi Bassi) (Spadaro e Droby, 2016).

Limiti della lotta biologica in post-raccolta

Nonostante centinaia di rapporti che documentano potenziali antagonisti commercialmente validi, l'uso diffuso di un singolo prodotto non è stato raggiunto. Diversi prodotti hanno inizialmente raggiunto il mercato, ma in seguito sono stati interrotti, mentre altri hanno raggiunto il successo in mercati di nicchia limitati (Droby *et al.*, 2016). Ciò è dovuto a diversi fattori tra cui prestazioni inconsistenti, mancanza di accettazione da parte dell'industria, costo relativo ai fungicidi sintetici, ostacoli alla registrazione e problemi di formulazione (Droby *et al.*, 2009; 2016). Quello che era iniziato come una semplice idea, usando antagonisti microbici per gestire le malattie post-raccolta, si è evoluto lentamente in complessità, poiché sono state esplorate strategie per superare vari problemi. L'ambiente post-raccolta, compresi i trattamenti di condizionamento, lo stoccaggio, la spedizione e tutti gli altri aspetti della catena di approvvigionamento sono ora visti come un sistema che richiede un'ampia visione olistica per affrontare una vasta gamma di problemi.

Droby *et al.* (2009) hanno discusso in dettaglio i principali ostacoli alla commercializzazione dei prodotti per la lotta biologica in post-raccolta. Il più grande ostacolo è la necessità di prestazioni coerenti e affidabili in una vasta gamma di condizioni (diverse linee di imballaggio, diversi livelli di inoculo, uso di altre tecnologie utilizzate per mantenere la qualità). I costi associati allo sviluppo del prodotto, al marketing e all'accettazione dell'industria sono altri fattori che hanno limitato l'adozione di tecnologie alternative. C'è un bisogno urgente di trovare il modo per colmare il divario tra ricerca e industria in modo che gli antagonisti microbici possano diventare dei successi commerciali.

Nonostante centinaia di studi che documentano potenziali antagonisti commercializzabili, non è stato raggiunto un uso significativo per alcun biofungicida in post-raccolta. Diversi prodotti hanno inizialmente raggiunto il mercato, ma in seguito sono stati ritirati, mentre altri hanno raggiunto un discreto successo in mercati di nicchia (Droby *et al.*, 2016). Ciò è dovuto a diversi fattori tra cui prestazioni non costanti, mancata accettazione da parte dell'industria, costo elevato rispetto ai fungicidi di sintesi, difficoltà nel processo di registrazione e problemi di formulazione (Droby *et al.*, 2009; 2016). Quello che era iniziato come una semplice idea, cioè la possibilità di impiego di antagonisti microbici per le malattie del post-raccolta, si è lentamente evoluto in complessità, man mano che sono state esplorate possibili strategie per superare i problemi nel frattempo insorti. L'ambiente post-raccolta, compresi i trattamenti di condizionamento, conservazione, spedizione e tutti gli altri aspetti della catena ortofrutticola sono ora visti come un sistema

che richiede una visione olistica per la risoluzione dei problemi.

Droby *et al.* (2009) hanno evidenziato i principali ostacoli alla commercializzazione dei biofungicidi per il post-raccolta. Il più grande ostacolo è rappresentato dalla necessità di prestazioni coerenti e affidabili in un'ampia gamma di condizioni (diverse linee di imballaggio, diversi livelli di inoculo, uso di altre tecnologie per mantenere la qualità). I costi associati allo sviluppo del prodotto, al marketing ed all'accettazione da parte dell'industria sono altri fattori che hanno limitato l'adozione della lotta biologica. Vi è una notevole quantità di informazioni sull'uso degli agenti di lotta biologica per le malattie del post-raccolta, ma nessuno di questi prodotti è stato impiegato su larga scala. Occorre trovare criticamente un modo per colmare il divario tra ricerca e industria in modo che i biofungicidi possano diventare dei successi commerciali.

Integrazione della lotta biologica e di altri metodi alternativi

Gli antagonisti in genere non sono in grado di contenere completamente le infezioni fungine, in particolare quelle avvenute in pre-raccolta. Pertanto, la ricerca ha esplorato la possibilità di impiegare una combinazione di due o più trattamenti post-raccolta in cascata simile alla strategia di ostacolo utilizzata nell'industria alimentare.

Sono stati segnalati molti tentativi di combinazione dei trattamenti fisici con gli antagonisti. Il più riuscito e ben studiato è l'integrazione di antagonisti microbici con trattamenti termici (aria calda e acqua calda). I trattamenti con aria calda o acqua calda sono tecnologie semplici che possono essere facilmente utilizzate e inserite in linee di lavorazione per ridurre le malattie post-raccolta. Inoltre, sono sicuri per l'uomo e per l'ambiente e non richiedono la registrazione (Usall *et al.*, 2016).

Le atmosfere controllate e modificate sono state anche combinate con l'impiego di antagonisti per migliorare la loro efficacia. La capacità del lievito *C. sake* di contenere il marciume verde-azzurro sulle mele è stata migliorata in atmosfera controllata al 3% in O₂ e al 3% in CO₂ (Usall *et al.*, 2016). Risultati simili sono stati ottenuti con il batterio *P. agglomerans* contro la maggior parte delle malattie delle mele (Nunes *et al.*, 2002).

Sono stati condotti diversi studi per valutare la possibilità di combinare antagonisti con sostanze generalmente classificate come *generally regarded as safe* (GRAS), prodotti naturali o induttori di resistenza (Spadaro e Gullino, 2004; Sharma *et al.*, 2009). I composti GRAS, come gli additivi del sale, possono migliorare l'efficacia degli antagonisti microbici nel contenimento del marciume in post-raccolta. Tra i composti salini, il cloruro di calcio, il propionato di calcio, il carbonato di sodio, il bicarbonato di sodio, il metabisolfito di potassio e il molibdato di ammonio, hanno mostrato di migliorare le prestazioni degli antagonisti microbici nel contenimento delle malattie post-raccolta. Il miglioramento dell'efficacia dell'antagonista dipende dalla concentrazione dell'antagonista, dalla concentrazione dei sali, dalla loro reciproca compatibilità, dalla durata e dai tempi di applicazione. I carbonati e bicarbonati sono buoni candidati per l'impiego insieme ad antagonisti per il contenimento delle malattie post-raccolta degli agrumi

(Usall *et al.*, 2008). Questi composti sono fungistatici, poco costosi, facilmente reperibili, non molto persistenti e possono essere utilizzati con un basso rischio di fitotossicità.

Conclusioni

Dopo oltre tre decenni di ricerca sull'impiego di microrganismi antagonisti per la lotta alle malattie da conservazione dei prodotti ortofrutticoli, rimane vivo l'interesse a trovare approcci alternativi alla lotta chimica. Le preoccupazioni dei consumatori sulla salubrità dei prodotti alimentari, nonché le normative più restrittive sulle tecnologie impiegabili in campo e in post-raccolta sono state decisive nello sviluppo di strategie di difesa alternative.

Sono stati fatti progressi significativi nella scoperta, nello sviluppo e nel miglioramento dell'efficacia degli antagonisti microbici. L'industria dei bioagrofarmaci continuerà a crescere ed è destinata a diventare un approccio chiave nel contenimento delle malattie. Ci stiamo decisamente spostando verso un'era della biologia e contemporaneamente allontanando dall'era della chimica. L'applicazione commerciale dei biofungicidi per il post-raccolta rappresenta al momento una quota minima del potenziale mercato. Affinché un prodotto per la lotta biologica diventi interessante, deve funzionare in modo efficace e affidabile, essere ampiamente accettato, avere una protezione della proprietà intellettuale (brevetto), essere sicuro per l'impiego e redditizio per l'azienda che ha investito nel suo sviluppo, registrazione, e commercializzazione.

La comprensione del meccanismo d'azione degli antagonisti microbici è un problema chiave nello sviluppo di efficaci agenti di lotta biologica. I progressi delle tecnologie -omiche (genomica, trascrittomica, metabolomica, proteomica e metagenomica) hanno notevolmente migliorato la nostra comprensione delle interazioni tra antagonisti microbici, tessuti ospiti, patogeni, elicitatori dei meccanismi di difesa e dell'ambiente. Il microbioma è un componente integrale e attivo dei prodotti ortofrutticoli che viene influenzato da fattori biotici e abiotici. Comprendere tutti i fattori coinvolti nell'assemblaggio e nella composizione di uno specifico microbioma è importante per comprendere le interazioni multi-trofiche coinvolte nei sistemi di lotta biologica in post-raccolta.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato svolto con il contributo del progetto "LIFE.SU.SA.FRUIT - Low pesticide IPM in sustainable and safe fruit production", finanziato dall'Unione Europea. (LIFE13 ENV/HR/000580).

Lavori citati

ABADIAS M., TEIXIDÓ N., USALL J., BENABARRE A., VIÑAS I. (2001) - Viability, efficacy and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective ad rehydration media. *Journal of Food Protection* 64, 856-861.

ABADIAS M., USALL J., TEIXIDÓ N., VIÑAS I. (2003) - Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology*, 93, 436-442.

- BURGES H. D., JONES K.A. (1998) - Formulation of bacteria, viruses and Protozoa to control insects. In: Formulation of microbial biopesticides (Burges H. D. coord.). Kluwer Academic Publishers, London, 31-128.
- CAÑAMÁS T. P., VIÑAS I., USALL J., CASALS C., SOLSONA C., TEIXIDÓ N. (2008) - Control of postharvest on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 86-95.
- CAÑAMÁS T. P., VIÑAS I., TORRES R., USALL J., SOLSONA C., TEIXIDÓ N. (2011) - Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*, 56, 150-158.
- CASTORIA R., CAPUTO L., DE CURTIS F., DE CICCO V. (2003) - Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: A possible new mechanism of action. *Phytopathology*, 93, 564-572.
- CHAN Z., TIAN S. (2005) - Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 215-223.
- CPM (2010) - Bayer acquires biofungicide from Agrogreen. CPM, 30 gennaio 2010, 14.
- DEMOZ B. T., KORSTEN L. (2006) - *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control*, 37, 68-74.
- DROBY S., CHALUTZ E., WILSON C. L., WISNIEWSKI M. E. (1989) - Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 794-800.
- DROBY S., WISNIEWSKI M., MACARISIN D., WILSON C. (2009) - Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52, 137-145.
- DROBY S., WISNIEWSKI M., TEIXIDÓ N., SPADARO D., JIJAKLI M. H. (2016) - The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22-29.
- FRAVEL D. R., CONNICK W. J., LEWIS J. A. (1998) - Formulation of microorganisms to control plant diseases. In: Formulation of Microbial Biopesticides (Burges H. D. coord.). Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, 187-202.
- HERSHKOVITZ V., BEN-DAYAN C., RAPHAEL G., PASMANIK-CHOR M., LIU J., BELAUSOV E., ALY R., WISNIEWSKI M., DROBY S. (2012) - Global changes in gene expression of grapefruit peel tissue in response to the yeast biocontrol agent *Metschnikowia fructicola*. *Molecular Plant Pathology*, 13, 338-349.
- HERSHKOVITZ V., SELA N., TAHA-SALAIME L., LIU J., RAFAEL G., KESSLER C., ALY R., LEVY M., WISNIEWSKI M., DROBY S. (2013) - De-novo assemble and characterization of the transcriptome of *Metschnikowia fructicola* reveals differences in gene expression following interaction with *Penicillium digitatum* and grapefruit peel. *BMC Genomics*, 14, 168.
- IANIRI G., IDNURM A., WRIGHT S.A.I., DURAN-PATRON R., MANNINA L., FERRACANE R. (2013) - Searching for genes responsible for patulin degradation in a biological control yeast provides insights into the basis for resistance to this mycotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 3101-3115.
- JANISIEWICZ W. J., JEFFERS, S. N. (1997) - Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*, 16, 629-633.
- JANISIEWICZ W. J., KORSTEN L. (2002) - Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 411-441.
- JANISIEWICZ W. J., PETERSON D.L. (2004) - Susceptibility of the stem pull area of mechanically harvested apples to blue mold decay and its control with a biocontrol agent. *Plant Disease*, 88, 662-664.
- KÖHL J., FOKKEMA N. J. (1998) - Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. In: Plant microbe interactions and biological control (Boland G. J., Kuykendall L. D. coord). Marcel Dekker Press, New York, 49-88.
- KURTZMAN C. P., DROBY S. (2001) - *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast effective for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematics and Applied Microbiology*, 24, 395-399.
- LAHLALI R., DE CLERCQ D., SERRHINI M. N., CREEMERS P., JIJAKLI M. H. (2009) - Assessment of *Pichia anomala* (strain K) efficacy against blue mould of apples when applied pre- or post-harvest under laboratory conditions and in orchard trials. *Plant Pathology*, 123, 37-45.
- LIMA G., SANZANI S. M., DE CURTIS F., IPPOLITO A. (2015) - Biological control of postharvest diseases. In: Advances in Postharvest Fruit and Vegetable Technology (Wills R. B. H., Golding J. coord). CRC Press, Boca Raton, Florida, 65-81.
- LIU J., TIAN S. P., LI B. Q., QIN G. Z. (2009) - Enhancing viability of two biocontrol yeasts in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. *Biological Control*, 54, 817-824.
- LIU J., SUI Y., WISNIEWSKI M., DROBY S., LIU Y. (2013) - Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 153-160.
- LUTZ M. C., SOSA M. C., RODRIGUEZ M. E., LOPEZ C. A., SANGORRÍN M. P. (2013) - Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest rots of pear pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 164, 166-172.
- MACARISIN D., DROBY S., BAUCHAN G., WISNIEWSKI M. (2010) - Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: A new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biology and Technology*, 58, 194-202.
- MASSART S., JIJAKLI H. (2014) - *Pichia anomala* and *Candida oleophila* in Biocontrol of Postharvest Diseases of Fruits: 20 Years of Fundamental and Practical Research. In: Plant Pathology in the 21st Century (Prusky D., Gullino M. L. coord.), Springer, Switzerland, 111-122.
- MELIN P., SCHNÜRER J., HAKANSSON S. (2011) - Formulation and stabilization of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 99, 107-112.
- MERCIER J., SMILANICK J. L. (2005) - Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with

- Muscodor albus*. *Biological Control*, 32, 401-407.
- NUNES C., USALL J., TEIXIDÓ N., ABADIAS M., VIÑAS I. (2002) - Improved control of postharvest decay of pears by the combination of *Candida sake* (CPA-1) and ammonium molybdate. *Phytopathology*, 92, 281-287.
- PLAZA P., USALL J., SMILANICK J. L., LAMARCA N., VIÑAS I. (2004) - Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. *Journal of Food Protection*, 67, 781-786.
- PUSEY P. L., WILSON C. L. (1984) - Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, 68, 753-756.
- SHARMA R. R., SINGH D., SINGH R. (2009) - Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, 205-221.
- SPADARO D., GULLINO M. L. (2004) - State of art and future perspectives of biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 185-194.
- SPADARO D., SABETTA W., ACQUADRO A., PORTIS E., GARIBALDI A., GULLINO M. L. (2008) - Use of AFLP for differentiation of *Metschnikowia pulcherrima* strains for postharvest disease biological control. *Microbiological Research*, 163, 523-530.
- SPADARO D., CIAVORELLA A., LOPEZ G., GARIBALDI A., GULLINO M. L. (2010a) - Effect of culture age, protectants, and initial cell concentration on viability of freeze-dried cells of *Metschnikowia pulcherrima*. *Canadian Journal of Microbiology*, 56, 809-815.
- SPADARO D., CIAVORELLA A., ZHANG D., GARIBALDI A., GULLINO M. L. (2010b) - Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Canadian Journal of Microbiology*, 56, 128-137.
- SPADARO D., LORÉ A., GARIBALDI A., GULLINO M. L. (2013) - A new strain of *Metschnikowia fructicola* for postharvest control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 1-8.
- SPADARO D., DROBY S. (2016) - Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*, 47, 39-49.
- STANBURY P. F., WHITAKER A., HALL S. J. (1995) - Media for industrial fermentation. In: Principles of fermentation technology (Stanbury P., Whitaker A., Hall S. coord). Pergamon Press, Oxford, 93-121.
- TEIXIDÓ N., USALL J., PALOU L., ASENSIO A., NUNES C., VIÑAS I. (2001) - Improving control of green and blue molds on oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 685-694.
- TEIXIDÓ N., TORRES R., VIÑAS I., ABADIAS M., USALL J. (2011) - Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. In: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation (Lacroix C., coord.). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 201, Cambridge, 364-402.
- TORRES R., USALL J., TEIXIDÓ N., ABADIAS M., VIÑAS I. (2003) Liquid formulation of the biocontrol agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 330-339.
- TORRES R., SOLSONA C., VIÑAS I., USALL J., PLAZA P., TEIXIDÓ N. (2014) - Optimization of packaging and storage conditions of a freeze-dried *Pantoea agglomerans* formulation for controlling postharvest diseases in fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 173-184.
- USALL J., SMILANICK L., PALOU L., DENIS-ARRUE N., TEIXIDÓ N., TORRES R., VIÑAS I. (2008) - Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 1-7.
- USALL J., TORRES R., TEIXIDÓ N. (2016) - Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative? *Current Opinion in Food Science*, 11, 51-55.
- WISNIEWSKI M., DROBY S., NORELLI J., LIU J., SCHENA L. (2016) - Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 3-10.
- WILSON C. L., WISNIEWSKI M., DROBY S., CHALUTZ E. (1993) - A selection strategy for microbial antagonist to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*, 53, 183-189.
- WILSON C. L., WISNIEWSKI M. (1989) - Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 425-441.