

L. BACCHETTA

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria,
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Casaccia

G. BERNABEI

Dottorando ENEA
Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria,
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Casaccia

S. BOLLANTI, P. DI LAZZARO, D. MURRA

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Fisica della Fusione
Laboratorio Sorgenti, Diagnostiche e Interazione Laser-materia
Centro Ricerche Frascati

A. LAI

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Tecnologie Fisiche per la Sicurezza e la Salute
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati

G. METELLI

Dottorando ENEA
Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria,
Laboratorio Biotecnologie
Centro Ricerche Casaccia

M. MONTECCHI

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili
Divisione Solare Termico, Termodinamico e Smart Network
Laboratorio Ingegneria delle Tecnologie Solari
Centro Ricerche Casaccia

**RISPOSTA ORMETICA IN DIVERSE SPECIE VEGETALI
DI INTERESSE AGRONOMICO, STIMOLATA
DA RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA**

RT/2021/11/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

L. BACCHETTA

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria,
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Casaccia

G. BERNABEI

Dottorando ENEA
Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria,
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Casaccia

S. BOLLANTI, P. DI LAZZARO, D. MURRA

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Fisica della Fusione
Laboratorio Sorgenti, Diagnostiche e Interazione Laser-materia
Centro Ricerche Frascati

A. LAI

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Tecnologie Fisiche per la Sicurezza e la Salute
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati

G. METELLI

Dottorando ENEA
Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria,
Laboratorio Biotecnologie
Centro Ricerche Casaccia

M. MONTECCHI

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili
Divisione Solare Termico, Termodinamico e Smart Network
Laboratorio Ingegneria delle Tecnologie Solari
Centro Ricerche Casaccia

RISPOSTA ORMETICA IN DIVERSE SPECIE VEGETALI DI INTERESSE AGRONOMICO, STIMOLATA DA RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA

RT/2021/11/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina www.enea.it

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

RISPOSTA ORMETICA IN DIVERSE SPECIE VEGETALI DI INTERESSE AGRONOMO, STIMOLATA DA RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA

L. Bacchetta, G. Bernabei, S. Bollanti, P. Di Lazzaro, A. Lai, G. Metelli, M. Montecchi, D. Murra

Riassunto

Sono riportati in letteratura risultati di irraggiamenti di specie vegetali con radiazione 'ultravioletta C' (UV-C), che evidenziano una drastica riduzione della presenza di patogeni e di malattie pre- e post-raccolta delle colture. Si tratta di una promettente tecnologia alternativa ai pesticidi, l'uso dei quali deve essere ridotto perché contribuisce all'inquinamento di suolo, acqua, e aria, e rappresenta un rischio per la salute di operatori e consumatori. I migliori effetti germicidi UV-C sono stati ottenuti usando lampade a mercurio a bassa pressione, che emettono radiazione alla lunghezza d'onda di 254 nm. Viceversa, i tentativi di ottenere effetti di ormesi usando lo stesso tipo di lampade hanno prodotto risultati incerti. Per ormesi intendiamo la stimolazione -tramite radiazione UV-C- di metaboliti in grado di aumentare le difese immunitarie naturali delle piante e quindi la resistenza ai patogeni.

In questo Rapporto si descrive l'efficacia dei raggi UV-C alla lunghezza d'onda di 277 nm, emessi da matrici di Light Emitting Diodes (LED), per generare una risposta ormetica in piante di basilico, frutti di mele, fragole e limoni dopo irraggiamento ed esposizione ai patogeni fungini *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*. I LED sono sorgenti di radiazione a stato solido che offrono diversi vantaggi rispetto alle lampade: sono più compatti, hanno maggiore resistenza agli urti, tempo di accensione immediato, possibilità di scegliere la lunghezza d'onda della radiazione UV-C tale da accordarsi sullo spettro di assorbimento dei patogeni senza generare ozono, ed un'alimentazione elettrica più semplice, a basso voltaggio.

Parole chiave: *Botrytis cinerea*; Ormesi; *Penicillium digitatum*; Radiazione ultravioletta; UV-C.

Abstract

*Excellent results have been reported on ultraviolet C (UV-C) radiation to limit pre- and post-harvest diseases of fruit and vegetable crops. UV-C radiation appears a promising and sustainable technological substitute for pesticides, the use of which must be reduced because it damages the environment, and the health of operators and consumers. The best germicidal effects have been obtained using low-pressure mercury lamps, which emit radiation at a wavelength of 254 nm. Conversely, attempts to obtain hormesis effects using mercury lamps have produced uncertain results. Here for hormesis we mean a stimulation -through UV-C electromagnetic radiation- designed to increase the natural immune defenses, and therefore, resistance to pathogens. We have explored the effectiveness of a different UV-C wavelength (277 nm) emitted by Light Emitting Diodes (LED) to stimulate hormesis in basil plants, apples, strawberries, and lemons, after irradiation and exposure to the fungal pathogen *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum*. The LED are solid-state UV-C radiation sources that offer several advantages vs. the lamps: LED are much more compact, have greater resistance to shocks, shorter ignition time, a simpler electrical circuitry with a low working voltage, and choice of the wavelength of UV-C radiation such as not to generate ozone.*

Keywords: *Botrytis cinerea*; Hormesis; *Penicillium digitatum*; Ultraviolet radiation; UV-C.

INDICE

INTRODUZIONE	7
MATERIALI e METODI	8
Materiale vegetale	8
Patogeni	9
Inoculazione artificiale	9
Apparato di irraggiamento UV-C	10
Dosi degli irraggiamenti	11
Analisi con fluorimetro Multiplex	12
RISULTATI	13
Sperimentazione su piante di basilico	13
Sperimentazione su mele	16
Sperimentazione su fragole	17
Sperimentazione su limoni	17
RIASSUNTO e CONCLUSIONI	18
REFERENZE	20

RISPOSTA ORMETICA IN DIVERSE SPECIE VEGETALI DI INTERESSE AGRONOMICO, STIMOLATA DA RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA

INTRODUZIONE

La frutta e la verdura fresca, componenti essenziali di una dieta bilanciata, sono suscettibili a diverse fitopatie e al deterioramento microbico. Per ovviare al problema, gli agricoltori ricorrono a trattamenti fitosanitari, i quali, anche se regolati in base alla soglia di danno economico e non più a calendario, possono arrecare conseguenze negative per l'ambiente, gli operatori, ed i consumatori. L'eccesso di fitofarmaci è diventato il principale problema delle agricolture intensive, la cui estensione in Italia e in Europa è in aumento. È stato infatti dimostrato che il semplice lavaggio di frutta e verdura non è efficace nel rimuovere i residui di pesticidi sistemici né gli agenti patogeni [1], con effetti negativi sulla salute dei consumatori.

Il documento 'Farm to Fork' del recente Green Deal Europeo evidenzia la necessità di una drastica riduzione dell'utilizzo di prodotti fitosanitari in agricoltura, sottolineando come l'uso di sostanze chimiche contribuisca in maniera grave all'inquinamento di suolo, acqua, e aria. Il target proposto è la riduzione del 50% dell'uso di sostanze chimiche fitosanitarie entro il 2030. Nello stesso documento si fa riferimento allo sviluppo dell'agricoltura biologica e alle misure da adottare per avere almeno il 25% del totale dei terreni agricoli dedicato all'agricoltura biologica entro il 2030. Quest'ultimo obiettivo comporta la necessità di trovare alternative ai composti rameici autorizzati in agricoltura biologica che arrecano danni per l'accumulo e la tossicità da rame nei suoli biologici (Regolamento di Esecuzione (UE) n° 1981; regolamento (CE) n. 1107/2009).

Per ridurre la quantità di prodotti fitosanitari irrorati senza diminuire la produzione, occorre trovare processi germicidi alternativi e di minore impatto, oppure aumentare la resistenza di piante e frutti ai patogeni più comuni, tale da preservarne l'integrità e la freschezza. L'irraggiamento con luce ultravioletta UV-C (lunghezza d'onda compresa fra 200 e 280 nm) soddisfa questi requisiti e si è già dimostrato efficace nel ridurre la carica microbica di agenti patogeni presenti su frutta e verdura fresca.

In aggiunta all'effetto biocida, la radiazione UV-C applicata a prodotti ortofrutticoli in post-raccolta ha la capacità di aumentare la produzione di metaboliti vegetali [2], [3]. In dettaglio, lo stress generato dalla radiazione UV attiva il sistema di difesa naturale nelle piante, in seguito alla produzione di fitoalessine, composti a basso peso molecolare sintetizzate dalle piante in risposta a stress biotici e

abiotici, che hanno un effetto inibitore dei microrganismi patogeni [4]. Enzimi antiossidanti, metaboliti secondari, e modificazioni della parete cellulare aumentano le risposte protettive, risolvono il danno ossidativo provocato dai raggi UV tramite l'eliminazione di specie reattive dell'ossigeno [5] e migliorano la resistenza agli agenti patogeni. Altri effetti della radiazione UV-C includono la riduzione della carica patogena e il miglioramento delle caratteristiche nutrizionali [6], [7].

L'insieme di questi eventi biochimici attivati dalla radiazione UV e le loro azioni benefiche per la pianta è conosciuto come "ormesi". La dose (energia per unità di superficie irraggiata) UV-C che innesci l'effetto ormetico nelle piante è minore della dose richiesta per ottenere un effetto biocida dei patogeni delle stesse piante. Di conseguenza, a parità di sorgente UV-C e di distanza tra sorgente e pianta, il tempo di esposizione per ottenere l'effetto ormetico è minore di quello per ottenere l'effetto biocida [8].

In questo Rapporto sono presentati i risultati di irraggiamento UV-C di piante di basilico, frutti di mele, fragole e limoni infettati con i patogeni fungini *Botrytis cinerea* (muffa grigia) e *Penicillium digitatum* (muffa verde). La sorgente di radiazione UV-C utilizzata è una matrice di Light Emitting Diodes (LED) che emettono radiazione a lunghezza d'onda 277 nm, diversa dai 254 nm emessi dalle lampade a mercurio a bassa pressione usate in letteratura. La motivazione della scelta dei LED è duplice: da una parte le matrici di LED hanno caratteristiche di robustezza e trasportabilità migliori delle lampade, e pertanto sono una scelta conveniente per applicazioni sul campo. D'altra parte, le lampade a mercurio hanno ottenuto ottimi risultati biocidi sui patogeni delle piante, ma non altrettanto efficaci nello stimolare effetti ormetici. È pertanto necessario provare altre lunghezze d'onda UV-C, per valutarne l'efficacia nell'indurre ormesi.

L'obiettivo della ricerca descritta in questo Rapporto è valutare l'effetto della radiazione UV-C a 277 nm nell'aumentare la resistenza della pianta ai due patogeni fungini citati. In particolare, ne è stata valutata la capacità biocida e l'effetto ormetico (tolleranza e reazione al patogeno) in piante di basilico e frutti (mele e fragole) inoculati con muffa grigia, e in frutti di limoni sui quali il *P. digitatum* è ospite specifico.

• MATERIALI e METODI

Materiale vegetale

Sono state utilizzate alcune piante di basilico (*Ocimum basilicum* (L.), tipologia genovese) seminate a marzo 2021 in camera di crescita (temperatura 25°C, umidità relativa 70%) mostrate nella figura 1, e trapiantate (3 piante per vaso) all'emissione di due foglie vere. Dopo un mese dal trapianto le piante sono state inoculate e irraggiate a due diverse dosi, come descritto nel seguito.



Figura 1 - Piante di basilico allevate in camera di crescita.

Per le sperimentazioni su frutti sono state utilizzate mele (varietà Golden Delicious), fragole (varietà Favetta di Terracina), e limoni (varietà Femminello) da agricoltura biologica.

Patogeni

Per avere patogeni virulenti, i funghi sono stati isolati da materiale naturalmente infetto e successivamente allevati in vitro per ottenere la quantità sufficiente per l'inoculo. *B. cinerea* è stata isolata da piante di basilico infette, mentre *P. digitatum* è stato isolato da limoni infetti (figura 2). Entrambi i patogeni fungini sono ospiti non obbligati, perché una volta isolati possono essere allevati in vitro su mezzi di coltura artificiali, e mantenuti in camere di crescita. Sono stati quindi allevati su mezzo di coltura sterile PDA (Potato Dextrose Agar) e mantenute a 25° in incubatore LABnet 211DS.



Figura 2 - Isolamento di *B. cinerea* da piante di basilico precedentemente infettate e di *P. digitatum* da limoni infetti.

Inoculazione artificiale

Le piante di basilico sono state inoculate con una sospensione conidica. Per ottenere una concentrazione utile, dopo un mese in coltura sterile il fungo *B. cinerea* è stato raccolto in acqua sterile deionizzata, asportando ife e conidi con una spatola, vedi la figura 3.



Figura 3 - Preparazione dell'inoculo in condizioni di sterilità.

Dopo filtrazione con garza sterile e conta al microscopio con camera di Burker, la sospensione è stata utilizzata alla concentrazione finale di 9×10^5 conidi/ml. L'inoculazione è stata effettuata nebulizzando la sospensione conidica sia sulle piante irraggiate sia sulle piante di controllo, non irraggiate.

Allo scopo di assicurare una umidità del 90% che favorisca lo sviluppo della patogenesi, le piante sono state isolate, coperte da involucri di plastica come mostrato nella figura 4, e poste in camera di crescita a 25 °C. Oltre allo sviluppo del patogeno, è stato valutato lo stato fenologico e fisiologico delle piante per evitare stress idrici.



Figura 4 - Piante separate dopo inoculazione con *B. cinerea* e tenute in ambiente umido.

Per evitare infezioni non controllate, i frutti provenienti da allevamento biologico sono stati sterilizzati superficialmente con metanolo all'80%. Dopo evaporazione del solvente in condizioni di sterilità, i frutti sono stati posti in contenitori sterili e quindi irraggiati a basse dosi, potenzialmente ormetiche. In seguito, i frutti di mela e di fragola sono stati inoculati applicando sulla superficie tasselli di micelio fungino di 1 cm di diametro di *B. cinerea* (vedi figura 5), mentre i frutti di limone sono stati infettati applicando *P. digitatum*. Su ogni frutto, irraggiato e non irraggiato (controllo) è stato posto il tassello di micelio fungino ed è stato osservato lo sviluppo nel tempo. I frutti inoculati sono stati posti a temperatura ambiente, in camera umida ed al buio, per facilitare lo sviluppo del fungo.

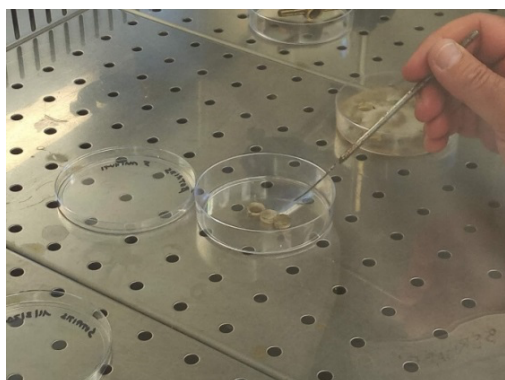


Figura 5 -Tasselli di fungo utilizzati per inoculare i frutti.

Apparato di irraggiamento UV-C

Il singolo LED è un sistema a stato solido alimentato a 5-6 Volt, che emette una bassa potenza di radiazione UV-C. Tuttavia, i LED possono essere organizzati in matrici a molti elementi, ottenendo dispositivi di media potenza, compatti, robusti e rapidi nell'accensione/spegnimento. Queste caratteristiche li rendono preferibili alle lampade per applicazioni dove è richiesta la trasportabilità. Infatti, i LED sono poco ingombranti, leggeri, facili da trasportare, richiedono alimentazione elettrica

a bassa tensione, e sono disponibili in un'ampia gamma di lunghezze d'onda della radiazione, permettendo ad esempio di accordarsi sullo spettro di assorbimento dello specifico patogeno.

Il principale svantaggio dei LED rispetto alle lampade è l'efficienza: i LED UV-C trasformano in radiazione circa il 2% della potenza elettrica di alimentazione, mentre le lampade UV-C possono arrivare fino al 40%.

Presso il Laboratorio Eccimeri del Centro Ricerche ENEA di Frascati sono state progettate, assemblate e caratterizzate diverse matrici di LED Luminus XBT-3535-UV, che emettono radiazione con il picco dello spettro di emissione a 277 nm e larghezza di banda 12 nm (full width at half maximum), vedi https://download.luminus.com/datasheets/Luminus_XBT-3535-UV_Datasheet.pdf. Il dispositivo mostrato nella figura 6 è formato da una matrice di 38 LED disposti in tre file su una basetta rettangolare di dimensioni $9 \times 3 \text{ cm}^2$ ed è controllato da un'elettronica che consente irraggiamenti di durata programmabile. Il dispositivo contiene due termistori per il controllo della temperatura e un sistema di raffreddamento, indispensabile per garantire la stabilità nel tempo dell'intensità irraggiata. L'apparato include un alimentatore a corrente costante da 0,35 ampere.

È stato inoltre sviluppato un software di simulazione ottica che calcola sia la distribuzione spaziale, sia il valor medio dell'intensità della radiazione UV-C al variare della distanza dalla matrice di LED. I risultati della simulazione sono in ottimo accordo con i dati sperimentali di mappatura bidimensionale dell'intensità e della variazione dell'intensità media con la distanza dalla matrice.

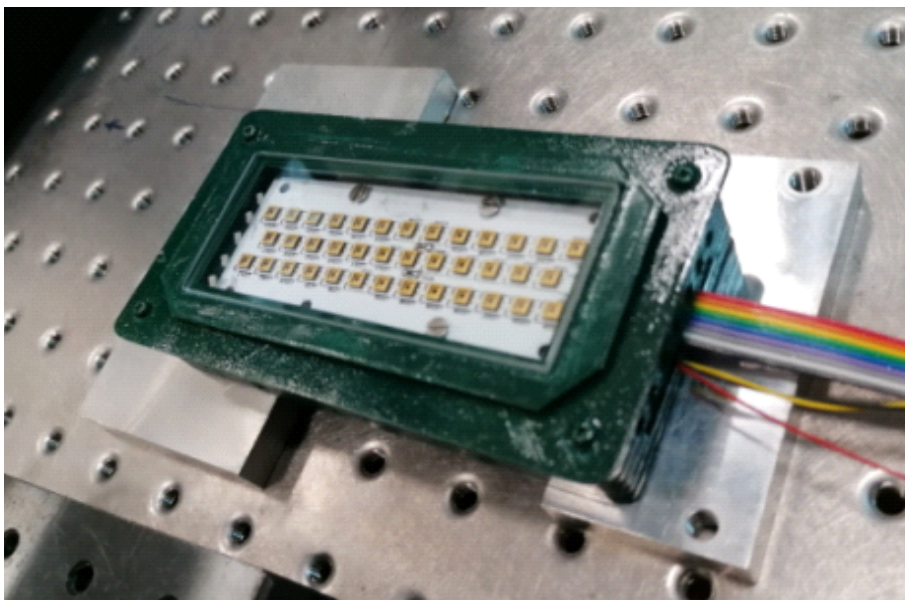


Figura 6 - Matrice di 38 LED UV-C progettata e assemblata nei laboratori ENEA di Frascati. Oltre ai LED, l'involucro contiene un opportuno sistema di raffreddamento, necessario per ottenere prestazioni ottimali di emissione UV-C.

Dosi degli irraggiamenti

La dose rilasciata al bersaglio è espressa in energia della radiazione per unità di superficie. Fissata la distanza tra la matrice di LED e un piano ideale posizionato a circa $2/3$ dell'altezza massima della pianta, la dose media è data dall'intensità luminosa (potenza per unità di superficie) su tale piano, moltiplicata per la durata dell'irraggiamento (tempo di esposizione). Per motivi di praticità, la dose è stata variata agendo sul tempo di esposizione, lasciando fissa la distanza fra LED e pianta/frutto.

Le piante di basilico sono state irraggiate con l'apparato mostrato nella figura 7, usando due diverse dosi:

- 1) alto dosaggio potenzialmente biocida;
- 2) basso dosaggio per indurre ormesi e la produzione di fitoalessine.

I frutti sono stati irraggiati solo a basso dosaggio per indurre l'ormesi e correlare l'eventuale tolleranza/resistenza alle fitopatie.

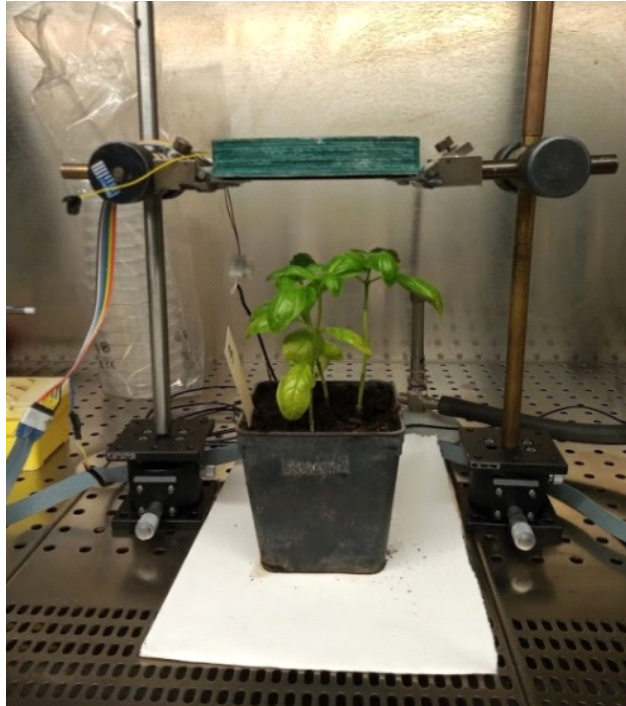


Figura 7 - Irraggiamento con UV-C della pianta di basilico. La matrice di LED è nell'involucro verde, e l'emissione di radiazione è rivolta verso il basso.

I valori di dose biocida e di dose ormetica riportati in letteratura variano a seconda della pianta, del patogeno, e della lunghezza d'onda della radiazione. L'intervallo dei valori è compreso fra $0,1 \text{ J/cm}^2$ e 10 J/cm^2 (effetto biocida) e fra $0,02 \text{ J/cm}^2$ e $0,9 \text{ J/cm}^2$ (effetto ormetico), entrambi alla lunghezza d'onda UV-C di 254 nm [6], [8]. Non abbiamo trovato in letteratura dati sulle dosi ormetiche e biocide alla lunghezza d'onda di 277 nm emessa dai LED. In questi esperimenti si sono scelti valori tentativi di dose biocida e di dose ormetica rispettivamente pari a $0,15 \text{ J/cm}^2$ e $0,05 \text{ J/cm}^2$.

Analisi con fluorimetro Multiplex

Per valutare nel tempo i cambiamenti metabolici indotti dall'irraggiamento e correlarli con una risposta di tolleranza e reazione al patogeno, le piante irraggiate a basse dosi sono state analizzate e confrontate con il controllo non irraggiato utilizzando il fluorimetro portatile Multiplex®3 (<https://www.horta-srl.it/sito/wp-content/uploads/2015/08/MULTIPLEX-RESEARCH-italien.pdf>) mostrato nella figura 8.



Figura 8 - Il fluorimetro portatile Multiplex®3 usato sul campo.

Il fluorimetro è uno strumento ottico che permette di ottenere informazioni sulla salute della pianta evitando di doverne sacrificare porzioni o organi. Attraverso la rilevazione dell'emissione di fluorescenza, ottenuta eccitando i pigmenti presenti nella foglia a determinate lunghezze d'onda, si ottengono informazioni sia del contenuto di clorofilla [9], sia dei pigmenti che assorbono nell'UV come, ad esempio, flavonoli e antociani [10], [11], [12], che risultano proporzionalmente correlati agli indici calcolati in automatico dallo strumento stesso. Il Multiplex permette di seguire nel tempo l'andamento degli effetti causati a seguito dello stress senza influire sul metabolismo della pianta stessa. È infatti possibile verificare la resistenza allo stress (tempo di reazione) e la resilienza della pianta.

Le misure con Multiplex sono state effettuate su piante di controllo non irraggiate e non inoculate, e su piante irraggiate a basse dosi e non inoculate. Su ciascuna pianta irraggiata sono state analizzate le foglie direttamente esposte alla radiazione UV, scelte in modo che fossero più omogenee possibile come accrescimento e come età. Il fluorimetro ha analizzato foglie di ogni pianta, per un totale di 6 misure per trattamento (ogni valore ottenuto dallo strumento è la media di 250 eccitamenti sincronizzati).

L'elaborazione dei dati per il confronto tra i trattamenti è stata effettuata con analisi statistica parametrica ANOVA (Analysis Of Variance, vedi ad esempio <http://www.mathsintheair.org/wp/2016/02/lanalisi-della-varianza-test-anova/>) che permette di analizzare due o più gruppi di dati confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi. ANOVA verifica se i dati dei diversi gruppi sono omogenei, e se le differenze osservate tra i gruppi siano dovute solo alla normale variabilità statistica. Se la risposta di ANOVA è affermativa, i dati sono confrontabili. La piattaforma utilizzata è il software SSPT versione 23.

• RISULTATI

Sperimentazione su piante di basilico

La tabella 1 riporta i dati dell'osservazione visiva, dopo 75 giorni dall'irraggiamento, relativi al danno dovuto a *B. cinerea* sulle piante di basilico trattate con UV-C rispetto al controllo non trattato, in relazione allo sviluppo del fungo sulle stesse piante. La percentuale minore di sviluppo fungino si ottiene su piante irraggiate a basse dosi e successivamente inoculate (30% rispetto all'85% dell'irraggiato ad alte dosi ed al 90% del controllo).

Tabella 1. Osservazione del danno prodotto da *B. cinerea* su piante di basilico trattate e non trattate con UV-C dopo 75 giorni dall'irraggiamento. H è l'altezza della pianta.

Campioni	Stato delle piante	Sviluppo fungino
Controllo non irraggiato e non inoculato	H = 42±0,9 cm; post fioritura formazione semi.	0%
Irraggiato a basse dosi e non inoculato	H = 42 ±0,9 cm; prefioritura	0%
Irraggiato a basse dosi e poi inoculato	H = 30 ±1,2 cm; stadio vegetativo	30%
Inoculato e poi irraggiato ad alte dosi	H = 20 ±0,9 cm; stadio vegetativo	85%
Controllo non irraggiato inoculato	H = 25 ±1,4 cm; stadio vegetativo	90%

La figura 9 mostra i campioni dopo 75 giorni dall'irraggiamento. Nelle piante inoculate e non irraggiate con UV-C (figura 9e) si osserva un progressivo deterioramento della parte epigea a seguito dello sviluppo del patogeno che ha portato al disseccamento della pianta. Dopo 90 giorni dall'irraggiamento le piante inoculate e non irraggiate hanno mostrato necrosi diffusa e disseccamento.

Le piante inoculate e successivamente irraggiate a dosi elevate di UV-C, da trattamento biocida (figura 9d) non hanno evidenziato significative differenze rispetto al controllo inoculato e non irraggiato. Anche se la *B. cinerea* è un ospite secondario del basilico (*Ocimum basilicum*), i risultati mostrano che l'irraggiamento a dosi biocide non ha preservato la pianta dall'attacco fungino. La dose applicata non è sufficiente allo scopo, e deve essere aumentata per ottenere effetti germicidi efficaci.

Risultati più interessanti si sono osservati nelle piante trattate a basse dosi di UV-C, da trattamento ormetico (figura 9c) che a parità di processo infettivo hanno dimostrato la capacità di contenere lo sviluppo fungino. Il danno nelle piante trattate a basse dosi e poi inoculate (figura 9c) è stato meno rilevante rispetto al controllo inoculato e non irraggiato, interessando circa il 30% della parte epigea, come riportato nella tabella 1.



Figura 9 - Foto delle piante inoculate con *B. cinerea* a 75 giorni dall'irraggiamento. a) controllo non irraggiato e non inoculato; b) irraggiate a basse dosi e non inoculate; c) irraggiate a basse dosi e poi inoculate; d) inoculate e poi irraggiate ad alte dosi; e) inoculate e non irraggiate.

Per determinare se l'irraggiamento a basse dosi di UV-C induca un cambiamento metabolico, ed in particolare se favorisca la formazione di metaboliti utili alla difesa della pianta, è stata valutata la presenza e la quantità dei flavonoli e della clorofilla. La tabella 2 riporta i valori medi dei flavonoli rilevati con il Multiplex a 38 e 51 e 62 giorni dall'irraggiamento, oltre ai risultati del test di separazione delle medie.

Le piante irraggiate a dosi ormetiche e non inoculate hanno dimostrato un aumento significativo del contenuto di flavonoli rispetto al controllo non irraggiato. Questo risultato è indicativo dell'effetto ormetico cercato. Infatti, nell'ormesi piccole dosi di agenti diretti contro un organismo o un tessuto vivente sono in grado di elicitare una risposta benefica o protettiva che, nelle piante, è dovuta all'accumulo di fitoalessine [8].

Alcuni autori riportano la perdita di questo effetto in frutti irraggiati a basse dosi di UV-C esposti alla luce visibile. Ad esempio, Stevens et al. [14] riportano i risultati ottenuti su frutti di pesco irraggiati

con basse dosi di UV-C che hanno mostrato la scomparsa dell'effetto protettivo da *Monilia frutticola* dopo esposizione alla luce visibile per 48 ore. I nostri risultati (che devono essere convalidati da misure quantitative spettrofometriche), evidenziano che effetto di UV-C si protrae nel tempo e non sembra limitato dall'esposizione delle piante alla luce visibile. Le piante irraggiate mostrano un contenuto di flavonoli sempre più elevato del controllo nell'arco di due mesi di valutazione, come mostrato nella tabella 2 e nella figura 10, che riassume graficamente l'andamento temporale dei flavonoli nei campioni irraggiati e non irraggiati. A due mesi dall'irraggiamento, la presenza di flavonoli nelle foglie nelle piante trattate a basse dosi è costantemente maggiore rispetto al controllo non irraggiato.

Tabella 2 Valori dei flavonoli determinati con analisi Multiplex su basilico irraggiato a basse dosi e basilico di controllo. Confronto tra i dati rilevati a 38, 51 e 62 giorni dall'irraggiamento. I valori del parametro FLAV sono stati sottoposti al test di Duncan [13] di separazione significativa dei valori delle medie: a lettere diverse corrispondono valori significativi diversi tra loro¹.

Rilievo	Campioni	FLAV
38 giorni	Irraggiato a basse dosi	0,184 ab
	Controllo	-0,014 b
51 giorni	Irraggiato a basse dosi	0,150 abc
	Controllo	0,001 cd
62 giorni	Irraggiato a basse dosi	0,304 a
	Controllo	0,139 bcd
	F-Value	5,536
	Sign	0,001

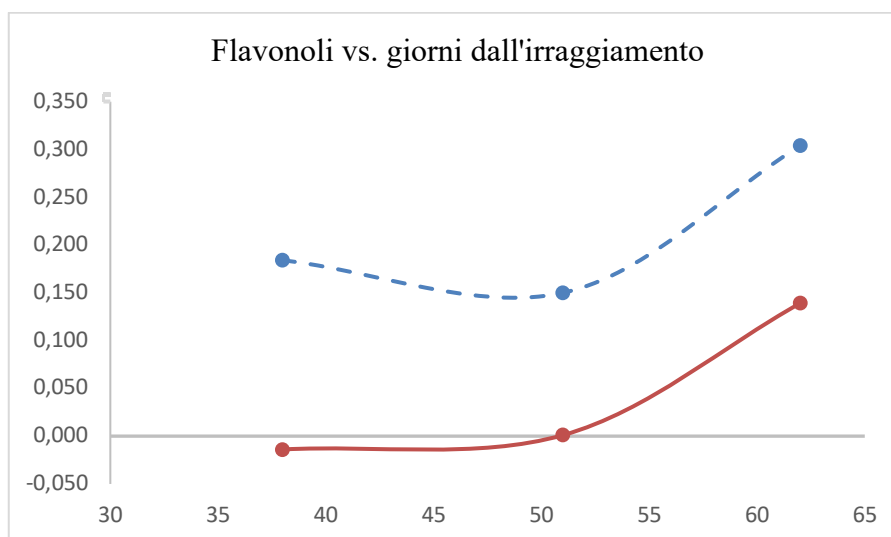


Figura 10 - Andamento del contenuto in flavonoli nel basilico irraggiato (curva tratteggiata) e nel controllo non irraggiato (curva continua), determinato con Multiplex nei tre rilievi a 38, 51 e 62 giorni dall'irraggiamento. In ordinata, i valori del parametro FLAV misurato dal fluorimetro. In ascissa i giorni dall'irraggiamento.

La tabella 3 riporta i valori relativi alla clorofilla rilevata con il Multiplex.

¹ Il test di Duncan [13] è una procedura di confronto multiplo di insiemi di medie. Il risultato del test è un insieme di sottoinsiemi di medie, dove in ciascun sottoinsieme le medie non sono significativamente differenti l'una dall'altra.

Tabella 3 Valori della clorofilla determinati con analisi Multiplex su basilico irraggiato a basse dosi e basilico di controllo. Confronto tra i dati rilevati a 38, 51 e 62 giorni dall'irraggiamento. I valori della clorofilla sono stati sottoposti al test di Duncan di separazione significativa dei valori delle medie: a lettere diverse corrispondono valori significativi diversi tra loro.

Rilievo	Campioni	Clorofille
38 giorni	Irraggiato a basse dosi	1,219 a
	Controllo	1,061 a
51 giorni	Irraggiato a basse dosi	0,939 b
	Controllo	0,803 b
62 giorni	Irraggiato a basse dosi	0,659 bc
	Controllo	0,761 bc
	F-Value	16,351
	Sign	0,000

La tabella 3 mostra un'apprezzabile diminuzione della clorofilla nel tempo. Il decremento è attribuibile alla naturale senescenza delle foglie, che si osserva anche nel controllo non irraggiato. La dose utilizzata pari a $0,05 \text{ J/cm}^2$ non è sufficiente né ad evitare la degradazione, né a stimolare nuova produzione di clorofilla. Ad esempio, in piante di cavolo cinese (*Brassica oleracea* var. alboglabra) irraggiate a dosi maggiori, pari a $0,36$ e $0,54 \text{ J/cm}^2$, è stato osservato un ritardato ingiallimento delle foglie, probabilmente dovuto ad una minore attività della clorofillasi (enzima presente nei cloroplasti, degrada la clorofilla) [15]. Anche Costa et al. [16] hanno osservato l'effetto inibitore dell'UV-C a 1 J/cm^2 sulla degradazione della clorofilla e sull'ingiallimento in broccoli, dovuto ad inibizione degli enzimi di catalasi.

Tuttavia, tali confronti devono essere considerati con cautela, perché i valori di dose efficace sono fortemente dipendenti sia dalla lunghezza d'onda UV-C, sia dalla specie irraggiata: i risultati ottenuti su specie diverse e con lunghezze d'onda diverse sono disomogenei fra loro.

Sperimentazione su mele

La figura 11 mostra i frutti di mele irraggiati a dosi ormetiche ed inoculati con tasselli di *B. cinerea* (muffa grigia), in confronto col controllo non irraggiato ed inoculato a 15 giorni dall'inoculazione artificiale. Il campione controllo (a sinistra della figura) manifesta subito i sintomi tipici della muffa grigia, che appaiono rallentati nei campioni irraggiati a basse dosi UV-C.



Figura 11 – Frutti di mele inoculati con tasselli del micelio di *B. cinerea* a 15 giorni dall'inoculazione. Il controllo non irraggiato è a sinistra.

Dopo un mese, la marcescenza ha interessato i tessuti anche nei frutti irraggiati. La percentuale di necrosi rilevata in media sui campioni irraggiati è stata del 60% rispetto al controllo non trattato (100%). È noto che la maggioranza dei materiali, anche biologici, ha un coefficiente di estinzione

elevato alla radiazione UV-C, la quale è pertanto assorbita in uno spessore sottile. Nel caso delle mele, i raggi UV-C sono assorbiti dall'esocarpo, il tessuto più esterno del frutto [17]. Di conseguenza, anche l'effetto ormetico è limitato alla superficie del frutto, per cui si è osservato un rallentamento della diffusione del patogeno, che tuttavia ha superato, anche se in modo rallentato, la barriera dell'esocarpo e si è propagato.

Ulteriori studi sono necessari per ottimizzare la dose ormetica sulle mele, il cui esocarpo pectico può assorbire dosi leggermente più elevate senza alterazioni dell'integrità del frutto. Un ulteriore aspetto da tenere presente nell'applicazione di UV-C nelle mele è lo stato fisiologico del prodotto al momento del trattamento. Ad esempio, de Capdeville et al. [18] hanno osservato che le mele fresche erano più reattive al trattamento rispetto alla frutta conservata per 3 mesi in un ambiente ad atmosfera controllata.

Sperimentazione su fragole

L'osservazione visiva, dopo 20 giorni dall'inoculazione artificiale con tasselli di micelio di *B. cinerea* (muffa grigia), non ha mostrato risultati significativamente diversi in fragole irraggiate e nel controllo non irraggiato. In questo caso la fragola, che è un ospite elettivo per il fungo, non manifesta una maggiore resistenza allo sviluppo del patogeno a seguito dell'irraggiamento UV-C a dosi ormetiche. Una possibile spiegazione del mancato effetto ormetico è la conformazione irregolare delle fragole, la cui superficie offre nicchie in ombra rispetto alla radiazione che non sono raggiunte dai fotoni UV-C.

Gli effetti di schermatura sono stati dimostrati da Gardner e Shama [19] che hanno depositato spore di *Bacillus subtilis* su filtri e membrane di dimensioni diverse. Le spore che sono rimaste più vicine alla superficie dei filtri, e quindi più esposte ai raggi UV, sono state attivate a dosi più basse. Viceversa, cellule microbiche più distanti dalla superficie, quindi schermate e "nascoste" alla radiazione, sono sfuggite al trattamento UV, rimanendo indenni. Per inattivare i microrganismi che sono schermati alla superficie di un oggetto è necessario aumentare la dose UV, ma nel caso delle fragole è richiesta una particolare attenzione a causa della fragilità del tessuto epidermico. Wojciech et al [20] hanno dimostrato che una dose di 0,24 J/cm² è in grado di inattivare le spore di *B. cinerea* se seguita da un periodo di almeno 4 ore di buio. Probabilmente il buio previene l'attivazione luce-dipendente dei meccanismi di riparazione del DNA nei microrganismi [21], [22].

Sperimentazione su limoni

La metà di un frutto di limone (varietà Femminello) è stato irraggiato a dosi UV-C ormetiche e quindi inoculato con tasselli di micelio di *P. digitatum*, agente causale della muffa verde. Analoga inoculazione è stata effettuata sulla metà non irraggiata. A distanza di 40 giorni dal trattamento, nel controllo non irraggiato (figura 12, a sinistra) si osserva che il fungo ha invaso tutta la superficie del frutto. Nel campione irraggiato con UV-C (figura 12, a destra) si osserva, nell'area irraggiata, l'inibizione dello sviluppo del patogeno.



Figura 12 – Frutto di limone dopo 40 giorni dall'inoculazione con tasselli del micelio di muffa verde. La metà del limone a destra era stato irraggiato con UV-C a dosi ormetiche prima dell'inoculazione. Il controllo non irraggiato è a sinistra.

La letteratura riporta diversi esempi di applicazione di UV-C in grado di limitare lo sviluppo di *P. digitatum*. Tale tolleranza/resistenza è stata attribuita all'accumulo di fitoalessine come lo scoparone e la scopoletina [23], [24]. Nei trattamenti UV-C sulla vite, Nigro et al. [25] riportano la maggiore tolleranza dell'uva alle fitopatie specifiche, come effetto del maggior accumulo di resveratrolo.

• RIASSUNTO e CONCLUSIONI

L'uso eccessivo dei prodotti fitosanitari in agricoltura contribuisce all'inquinamento di suolo, acqua, e aria, e rappresenta un rischio per la salute di operatori e consumatori. Il target proposto a livello europeo è la riduzione del 50% dell'uso di sostanze chimiche fitosanitarie, e l'incremento dei terreni agricoli all'agricoltura biologica al 25% del totale, entro il 2030. Questi obiettivi comportano la necessità immediata di trovare alternative sia ai fitofarmaci, sia ai composti rameici autorizzati in agricoltura biologica che arrecano danni per l'accumulo e la tossicità del rame nei suoli biologici.

Negli ultimi anni, la tecnologia di irraggiamento UV-C dei prodotti agricoli ha dimostrato di essere una promettente e sostenibile alternativa all'uso di fitofarmaci per proteggere piante e frutti dall'aggressione di vari organismi patogeni.

In letteratura sono riportati risultati ottenuti con lampade a mercurio a bassa pressione (emissione di radiazione alla lunghezza d'onda di 254 nm), assai efficaci per quanto concerne l'effetto biocida sui patogeni delle piante, ma non altrettanto efficaci per gli effetti ormetici. Si rende pertanto necessario esplorare altri valori di lunghezze d'onda UV-C, alla ricerca di una maggiore efficacia dell'effetto ormesi.

In questo Rapporto sono presentati i risultati ottenuti con irraggiamento UV-C di piante di basilico, frutti di mele, fragole e limoni esposti ai patogeni fungini *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*. La sorgente di radiazione UV-C è costituita da una matrice di LED (figura 6) che emette radiazione alla lunghezza d'onda 277 nm. Oltre alla lunghezza d'onda diversa rispetto alle lampade, la scelta dei LED è motivata dalle caratteristiche di robustezza e trasportabilità, particolarmente adatte alle applicazioni sul campo.

Sono stati ottenuti risultati incoraggianti nel basilico irraggiato con dosi ormetiche, vedi la tabella 1 e la figura 9. Le analisi Multiplex (tabella 2 e figura 10) dimostrano che le piante di basilico irraggiate presentano un aumento significativo del contenuto di flavonoli rispetto al controllo non irraggiato. La radiazione UV-C ha quindi elicitato metaboliti che concorrono alla protezione della pianta. A differenza di alcuni lavori su specie diverse e irraggiate a lunghezze d'onda diverse [14], [20], l'effetto ormetico non è regredito a seguito dell'esposizione alla luce visibile. Questo risultato rappresenta un vantaggio nelle applicazioni su campo, in quanto gli irraggiamenti a 277 nm possono essere effettuati sia di giorno che di notte.

Anche le mele e i limoni irraggiati a dosi ormetiche hanno mostrato un rallentamento dello sviluppo dei patogeni fungini rispetto ai controlli non irraggiati, vedi le figure 11 e 12.

Le fragole non hanno manifestato tolleranza e reazione allo sviluppo del patogeno nonostante l'irraggiamento a dosi ormetiche di UV-C, probabilmente a causa della conformazione superficiale del frutto che tende a schermare alcune zone dalla radiazione incidente, come discusso in [19].

Gli irraggiamenti a dosi potenzialmente biocide hanno invece mostrato una scarsa efficacia nel contenere lo sviluppo dei patogeni. In letteratura non sono disponibili i valori di dosi biocide ed ormetiche alla lunghezza d'onda utilizzata di 277 nm, e sono necessari ulteriori esperimenti per individuare la dose ottimale per ottenere effetti biocidi. I risultati di irraggiamenti a diverse dosi potenzialmente biocide in vitro sullo sviluppo dei patogeni *B. cinerea* e *P. digitatum* sono in corso di valutazione nei laboratori ENEA.

Oltre all'individuazione delle dosi ottimali, dipendenti sia dalla specifica pianta e frutto, sia dal patogeno, c'è ancora molto lavoro da fare, a cominciare dalle prove in condizioni di campo/serra analizzando il comportamento di patogeni obbligati, come, ad esempio, le peronosspore. Negli ultimi anni l'interesse nella tecnologia UV-C è aumentato di pari passo con i risultati, e sono state realizzate diverse macchine automatizzate in grado, ad esempio, di irraggiare filari di vite per il controllo dell'oidio e della peronospora, vedi la figura 13.



Figura 13. Dettaglio del sistema robotizzato Icaro, che utilizza due strutture verticali formate ciascuna da 24 lampade a mercurio, per l'irraggiamento di filari di viti. Il robot è a trazione integrale permanente di tipo elettrico, a guida autonoma. Vedi https://it.wikipedia.org/wiki/Icaro_X4 . Credito foto: M. Canalicchio.

Si tratta di applicazioni relativamente recenti: fino a un decennio fa non si era consapevoli del potenziale contributo dei raggi UV, che erano addirittura visti come una fonte di danno per le piante. In questi ultimi anni, l'avanzamento delle conoscenze e le nuove sorgenti di radiazione UV-C creano opportunità per realizzare sistemi produttivi a minor impatto rispetto ai sistemi tradizionali. ENEA sta conducendo uno sforzo per rendere le matrici LED UV-C più affidabili ed accessibili, non solo nel campo delle agrobiotecnologie.

In questo Rapporto è stato dimostrato che l'effetto ormesi indotto a basse dosi alla lunghezza d'onda di 277 nm elicitare metaboliti che concorrono alla protezione della pianta. Trattamenti preventivi possono quindi essere utili al controllo integrato di patologie sulle colture. Inoltre, molti di questi metaboliti ricadono nelle categorie dei polifenoli, i quali conferiscono una componente nutraceutica agli alimenti. Diversi studi stanno valutando la possibilità di ottenere prodotti funzionali, definiti *superfood*, con queste metodologie. Inoltre, è dimostrato che l'irraggiamento UV-C agisce sulle poliammine, come le putrescine, in grado di inibire la maturazione nei frutti. Questo effetto comporta un aumento della *shelf-life* dei prodotti con un impatto positivo sulla loro commercializzazione.

Questi risultati incoraggiano lo studio di applicazioni mirate alla possibilità di modulare il processo di maturazione nei vegetali con trattamenti pre-raccolta, tenendo conto della praticità e della convenienza economica.

• REFERENZE

- [1] L.R. Beuchat, et al., **Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce.** J. of Food Protection vol. 61, 1305-1311 (1998)
- [2] A. Freitas, et al. **Effect of UV-C radiation on bioactive compounds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) by-products** J. Sci. Food Agric. vol. 95, 44–52 (2015)
- [3] D. Li, et al. **ABA and UV-C effects on quality, antioxidant capacity and anthocyanin contents of strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.)** Postharvest Biol. Technol. vol. 90, 56–62 (2014)
- [4] X. Yin, et al. **Insights into the mechanisms underlying ultraviolet-C induced resveratrol metabolism in grapevine (*V. amurensis* Rupr.) cv. “Tonghua-3”** Front. Plant Sci. vol. 7, 503 (2016)
- [5] S. Anjum, et al. **Effects of photoperiod regimes and ultraviolet-C radiations on biosynthesis of industrially important lignans and neolignans in cell cultures of *Linum usitatissimum* L. (Flax).** J. Photochem. Photobiol. B Biol. vol. 167, 216–227 (2017)
- [6] G. Shama, P. Alderson, **UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialisation.** Trends Food Sci. Technol. vol. 16, 128–136 (2005)
- [7] M. Turtoi, **Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface: a review.** J. Agroaliment. Process. Technol. vol. 19, 325-337 (2013)
- [8] E.J. Calabrese, **Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status** Mut. Res. vol. 511, 181-189 (2002)
- [9] H.K. Lichtenthaler, et al., **Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology** Radiat. Environ. Biophys. vol. 25, 297-308 (1986).
- [10] G. Agati, et al., **Non-destructive evaluation of anthocyanins in olive (*Olea europaea*) fruits by in situ chlorophyll fluorescence spectroscopy** J. Agric. Food Chem. vol. 53, 1354-1363 (2005).
- [11] G. Agati, et al., **Assessment of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.) berries using a non-invasive chlorophyll fluorescence method** J. Agric. Food Chem. vol. 55, 1053-1061 (2007).
- [12] M.N. Merzlyak, et al., **Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection.** J. Exp. Bot. vol. 59, 349-359 (2008).
- [13] D.B. Duncan, **"Multiple range and multiple F tests"**. Biometrics vol. 11, 1-42 (1955)
- [14] C. Stevens, et al., **The germicidal and hormetic effects of UV-C light on reducing brown rot disease and yeast microflora of peaches** Crop Protection vol. 17, 75-84 (1998).
- [15] B. Chairat, et al., **Effect of UV-C treatment on chlorophyll degradation, antioxidant enzyme activities and senescence in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*)** International Food Research Journal vol. 202 623-628 (2013).
- [16] M.L. Costa, et al., **UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets,** Postharvest Biology and Technology vol. 39, 204-210 (2006).
- [17] G. Sharma, **New role for UV? Shelflife extension of plant foods by UV-induced effects** IJVA News vol. 11 no. 3 (2009).
- [18] G. de Capdeville, et al., **Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'red delicious' apple fruit** Phytopathol. vol. 92, 900-908 (2002).
- [19] D.W.M. Gardner, G. Shama, **The kinetics of *Bacillus subtilis* spore inactivation on filter paper by UV light and UV light in combination with hydrogen peroxide,** J. Appl. Micro. vol. 84: 633-641 (1998).

- [20] J. Wojciech, et al. **Dark Period Following UV-C Treatment Enhances Killing of Botrytis cinerea Conidia and Controls Gray Mold of Strawberries**, *Phytopathology* vol. 106, 386-394 (2016).
- [21] C.B. Beggs, **A quantitative method for evaluating the photoreactivation of ultraviolet damaged microorganisms** *Photochem. Photobiol. Sci.* vol. 1, 431-437 (2002).
- [22] L.O. Essen, T. Klar, **Light-driven DNA repair by photolyases**, *Cell. Mol. Life Sci.* vol. 63, 1266-77 (2006).
- [23] V. Rodov, et al., **Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance**, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* vol. 117, 788-792 (1992).
- [24] G. D'hallewin, et al., **Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date**, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* vol. 124, 702-707 (1999).
- [25] F. Nigro, et al., **Use of UV-C to reduce storage rot of table grape**, *Postharvest Biol. Technol.* vol. 13, 171-181 (1998).

ENEA
Servizio Promozione e Comunicazione
www.enea.it

Stampa: Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati
dicembre 2021