



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI E
AMBIENTALI**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI
TRATTAMENTI INNOVATIVI PER IL CONTROLLO
DELLA MONILIOSI DELLE DRUPACEE ED
IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DEGLI AGENTI
COINVOLTI**

***INNOVATIVE TREATMENTS TO CONTROL BROWN ROT OF
STONE FRUITS AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF
CAUSAL AGENTS***

Studente:

ANNAMARIA LUCREZIA

D'ORTENZIO

Relatore:

PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

Correlatore:

DOTT.SSA LUCIA LANDI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

INDICE

RIASSUNTO	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUZIONE	6
1.1 MONILIOSI DELLE DRUPACEE	6
1.2 AGENTI EZIOLOGICI	6
1.2.1 <i>Monilinia fructicola</i>	7
1.2.2 <i>Monilinia fructigena</i>	8
1.2.3 <i>Monilinia laxa</i>	9
1.2.4 <i>Monilinia polystroma</i>	10
1.3 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA	10
1.4 SINTOMATOLOGIA	11
1.4.1 Avvizzimento dei fiori	12
1.4.2 Avvizzimento ramoscelli e foglie	12
1.4.3 Cancro rameale	13
1.4.4 Frutti infetti	13
1.5 CICLO BIOLOGICO ED EPIDEMIOLOGIA DELLA MALATTIA	14
1.6 FATTORI AGRONOMICI ED AMBIENTALI CHE FAVORISCONO LA MALATTIA	16
1.6.1 Fattori agronomici	16
1.6.2 Fattori ambientali	17
1.7 METODI DI LOTTA UTILIZZATI IN PRERACCOLTA E IN POSTRACCOLTA	18
1.7.1 Pratiche colturali	19
1.7.2 Trattamenti con agrofarmaci	20
1.7.3 Uso di sostanze alternative	21
1.7.4 Trattamenti fisici	22
1.7.5 Trattamenti con biopesticidi	25
2 OBIETTIVI DELLA RICERCA	27

3	MATERIALI E METODI	28
	3.1 PROVA SPERIMENTALE 1: STUDIO DELL'EFFICACIA DI COMPOSTI ECOSOSTENIBILI IN POSTRACCOLTA NEL CONTENIMENTO DELLA MONILIOSI	28
	3.1.1 Caratteristiche dei frutteti oggetto di indagine	28
	3.1.2 Trattamenti in postraccolta	29
	3.1.3 Valutazione delle infezioni latenti.....	33
	3.2 PROVA SPERIMENTALE 2: IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DELLE SPECIE DI <i>MONILINIA</i> SPP. PRESENTI ALL'INTERNO DEL FRUTTETO	33
	3.2.1 Raccolta campioni	33
	3.2.2 Isolamento e caratterizzazione delle specie di <i>Monilinia</i>	34
	3.2.3 Estrazione del DNA.....	35
	3.2.4 Amplificazione del DNA tramite PCR Multiplex.....	35
	3.2.5 Elettroforesi con gel di agarosio	36
4	RISULTATI.....	37
	4.1.1 Diffusione marciume bruno su pesche in postraccolta: azienda 'Baronciani'	37
	4.1.2 Diffusione marciume bruno su pesche in postraccolta: azienda 'Acciarri'	38
	4.2 PROVA SPERIMENTALE 2: IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DELLE SPECIE DI <i>MONILINIA</i> SPP. PRESENTI ALL'INTERNO DEL FRUTTETO.....	39
	4.2.1 Isolamento dei patogeni fungini.....	39
	4.2.2 Identificazione molecolare	39
5	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	46
6	BIBLIOGRAFIA	50

RIASSUNTO

La moniliosi, causata da funghi del genere *Monilinia*, è una malattia delle drupacee che, in particolar modo nelle aree che presentano climi caldo-umidi, può provocare gravi perdite di produzione sia in campo, sia in postraccolta. Questo lavoro di tesi si colloca nel progetto PSR Marche 'ZeroSprechi' e ha riguardato la verifica dell'efficacia di prodotti alternativi ai fungicidi di sintesi per il controllo delle infezioni causate da *Monilinia* spp. in postraccolta, con identificazione molecolare degli agenti causali. Per la prova in postraccolta sono state analizzate pesche della cultivar 'Tardibelle' provenienti dal frutteto biologico dell'azienda 'Agri Baronciani S.R.L.' sita in provincia di Pesaro-Urbino, e nettarine della cultivar '16/20' dell'Azienda 'Acciarri Società Agricola S.R.L.' situata in provincia di Fermo. È stata saggiata l'efficacia di 6 prodotti alternativi, a base di chitosano, olio essenziale di arancio dolce, *Bacillus subtilis*, *Aureobasidium pullulans*, miscela di timolo, geraniolo ed eugenolo e COS-OGA, messi a confronto con un testimone chimico e un testimone non trattato. Per ciascuna tesi è stata valutata la diffusione della moniliosi dopo 3 e 8 giorni di shelf life. Pur non evidenziandosi una significativa e costante riduzione della malattia rispetto al controllo o al fungicida di sintesi, la prova ha mostrato differenze di efficacia significative tra i diversi prodotti utilizzati. Una maggiore capacità di ridurre la diffusione della malattia è stata osservata con i composti a base di *B. subtilis* ('Serenade Aso') e chitosano. Lo studio molecolare effettuato con un sistema convenzionale 'Multiplex PCR', atto ad individuare le specie di *Monilinia* presenti nel frutteto e realizzato per il frutteto 'Acciarri', ha evidenziato che dei 62 isolati analizzati, 44 erano ascrivibili a *Monilinia fructicola*, 13 a *Monilinia laxa* e 5 a *Monilinia fructigena*. L'indagine sottolinea la maggiore diffusione di *M. fructicola*, mostrando che questa specie ha conquistato aree geografiche precedentemente colonizzate da *M. laxa*. Questo lavoro di tesi evidenzia che l'applicazione di trattamenti con prodotti alternativi richiede un'attenta valutazione dei composti utili a contenere la diffusione della moniliosi sulle drupacee, al fine di adottare la migliore strategia sia in campo che in postraccolta non potendo semplicemente sostituire un prodotto chimico di sintesi con uno alternativo. L'identificazione delle specie presenti in campo potrà contribuire all'applicazione di adeguate strategie di protezione dalla moniliosi.

ABSTRACT

Brown rot, caused by *Monilinia* spp., is one of the most destructive diseases of stone fruits, which can result in serious economic losses, particularly in areas with humid climates, both in preharvest and postharvest. The aims of the thesis, in the framework of the PSR Marche *ZeroSprechi* project, consisted of testing eco-friendly alternative products for the management of postharvest *Monilinia* spp. infections. At the same time, the *Monilinia* isolates from peach orchard were molecularly identified. The samples analyzed are peaches of the cultivar +5Tardibelle from the organic orchard of 'Agri Baronciani S.R.L. company', located in Province of Pesaro-Urbino, and nectarines '16/20' from the 'Acciarri Società Agricola S.R.L. company', located Province of Fermo, Marche Region. The effectiveness of 6 alternative treatments based on chitosan, sweet orange essential oil, *Bacillus subtilis*, *Aureobasidium pullulans*, thymol, geraniol and eugenol mixture and COS-OGA was assessed and compared with a chemical formulation and an untreated control. For each treatment, the disease incidence caused by *Monilinia* spp. was recorded after 3 and 8 days shelf life. While not showing a significant reduction of the disease by to the alternative compounds tested compared to the control or the synthetic fungicide, significant differences in effectiveness between the different products used were observed. The highest ability to reduce disease incidence of the disease was observed using compounds based on *B. subtilis* ('Serenade Aso') and chitosan. The molecular study, with a conventional 'Multiplex PCR' system, was carried out for the *Monilinia* isolates from peaches by 'Acciarri' orchard. Among 62 isolates analyzed, 44 were *Monilinia fructicola*, 13 *Monilina laxa* and 5 *Monilinia fructigena*. This investigation highlights the greater diffusion of *M. fructicola*, showing that this species could be dominant in the geographical areas previously colonized by the *M. laxa*. This work highlights that the brown rot control on stone fruits required the application of alternative compounds to fungicide in order to adopt the best strategy both in the field and in postharvest. The identification of the *Monilinia* species present in the field will contribute to the development of appropriate management strategies.

1 INTRODUZIONE

1.1 MONILIOSI DELLE DRUPACEE

La moniliosi, o marciume bruno degli alberi da frutto, è una delle più importanti e comuni malattie che colpisce le drupacee e le pomacee sia in preraccolta che in postraccolta causando pesanti perdite in termini di resa e conservabilità della frutta. La malattia a livello mondiale è particolarmente diffusa sulle drupacee nei climi caldi e umidi. In condizioni ambientali favorevoli l'incidenza della malattia può causare fino all'80% di perdita della produzione in postraccolta stimata incidere annualmente 1,7 miliardi di euro (Petróczy et al., 2012; Martini e Mari, 2014).

1.2 AGENTI EZIOLOGICI

Gli agenti della moniliosi sono funghi del genere *Monilinia*, appartenente al phylum *Ascomycota*, classe degli *Ascomycetes*, ordine *Helotiales*, famiglia *Sclerotinaceae*. Il genere *Monilinia* comprende attualmente 35 specie, quelle più comuni sono *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey, *Monilinia fructigena* (Pers.) Honey, *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) e *Monilinia polystroma* (G. Leeuwen) L.M. Kohn. I corpi fruttiferi, apotecii, sono prodotti da pseudosclerozi che si formano nei frutti mummificati nel terreno o in residui vegetali infetti dove le ascospore sono state prodotte. L'apotecio ha una forma a coppa o a disco e la facciata superiore è ricoperta di aschi contenenti otto ascospore intervallate da ife sterili. Il micelio è ben sviluppato e le ife sono settate. Le pareti delle ife e il citoplasma dei tessuti infetti assumono colorazioni che vanno dal trasparente al marrone chiaro e verde oliva. In condizioni di caldo ed umidità, il micelio può produrre catene ellittiche di conidi o branche di ife raccolte in ciuffi. Le specie di *Monilinia* possono anche produrre microconidi a catene, i quali sono piriformi e unicellulari. La malattia è conosciuta come 'marciume bruno' e le specie, anche se sono difficili da distinguere, hanno ciclo, sintomi e ospiti differenti (Martini e Mari, 2016). Le specie di *Monilinia* possono entrare nel loro ospite attraverso ferite o aperture naturali come gli stomi sulle foglie o attaccare frutti sani. *M. laxa* e *M. fructicola* possono infettare sia i frutti sani che quelli feriti mentre *M. fructigena* può infettare solo quest'ultimi (Rungjindamai et al., 2014).

1.2.1. *Monilinia fructicola*

M. fructicola è il patogeno più distruttivo rispetto ad altre specie del genere *Monilinia* (De Miccolis Angelini et al., 2019). *M. fructicola* causa gravi danni, in particolar modo alle drupacee, sia in preraccolta sia in postraccolta (Ogawa e English, 1991; Hong et al., 1997) con una maggiore incidenza sulle specie appartenenti alla sottofamiglia *Prunoideae* rispetto a quella delle *Pomoideae* (Holb, 2008). In generale è maggiormente diffusa nelle pesche e nelle nettarine (Wilson e Ogawa, 1979). La propagazione di questo agente patogeno può avere conseguenze molto gravi, soprattutto quando le temperature favorevoli al suo sviluppo si verificano durante la fase di maturazione dei frutti e quando il periodo di raccolta risulta piovoso. Allevata *in vitro* su PDA, *M. fructicola* cresce più velocemente rispetto a di *M. laxa* ad una temperatura di 22°C. Dopo 7 giorni di incubazione, la colonia presenta un'estensione maggiore di diametro (80-85 mm) rispetto alle altre specie (Poniatowska et al., 2013). Il margine della colonia è intero e compatto (Figura 1). Lo stroma è grigio-marrone chiaro e presenta strati irregolari e sclerozi discoidali (De Miccolis Angelini et al., 2019). Questo patogeno produce conidi a temperature comprese tra 15°C e 20°C (Rungjindamai et al., 2014; Obi et al., 2018) con dimensioni di 12,5-14,5 × 8-10 µm e con un solo tubetto germinativo per ciascun conidio. Una ricostruzione completa e funzionale del genoma di *M. fructicola* è stata recentemente effettuata (De Miccolis Angelini et al., 2019).

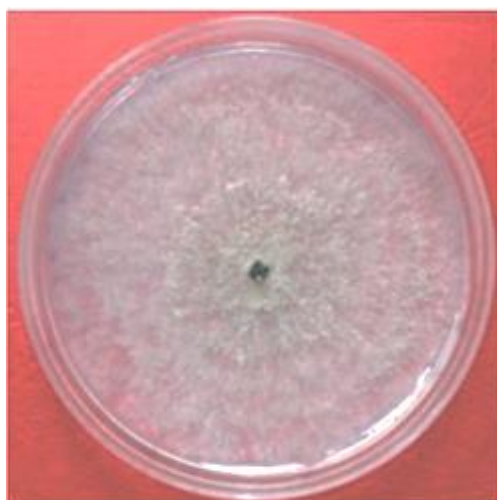


Figura 1 - Colonia di *Monilinia fructicola* su piastra Petri contenente un substrato a base di Potato Dextrose Agar (PDA) (Poniatowska et al., 2013).

1.2.2 *Monilinia fructigena*

M. fructigena colpisce prevalentemente le pomacee (Di Francesco et al., 2018). Provoca principalmente il marciume dei frutti, prima o durante la conservazione, mentre sono rare le infezioni di fiori, ramoscelli e rami (Martini and Mari, 2014). Sebbene le perdite di produzione più significative siano a carico delle pomacee, *M. fructigena* può infettare anche le drupacee, tra le quali il susino è il più sensibile (Byrde e Willetts, 1977; Anonimo, 2004), dove non causa però gravi perdite di produzione (Ritchie, 2000). Questa specie è meno virulenta e aggressiva rispetto a *M. laxa* e *M. fructicola* (Cox et al., 2018). Allevata *in vitro* su PDA, come osservato per *M. laxa*, *M. fructigena* cresce circa la metà rispetto a quelle di *M. fructicola* ad una temperatura di 22°C. Nei primi giorni di allevamento, le colonie sono di colore bianco-rosato e dopo 10 giorni risultano di colore biancastro (Poniatowska et al., 2013) (Figura 2). I conidi sono più grandi rispetto a quelli di *M. fructicola* e *M. laxa*, e solitamente forma due tubetti germinativi per ciascun conidio (van Leeuwen e van Kesteren, 1998). L'agente patogeno può produrre conidi a temperature di 15-20°C con dimensioni di 17,5-20,5 × 10,5-12,5 µm. La sporulazione è scarsa (Rungjindamai et al., 2014; Obi et al., 2018). Una ricostruzione completa e funzionale del genoma di *M. fructigena* è stata recentemente effettuata (Landi et al., 2018).

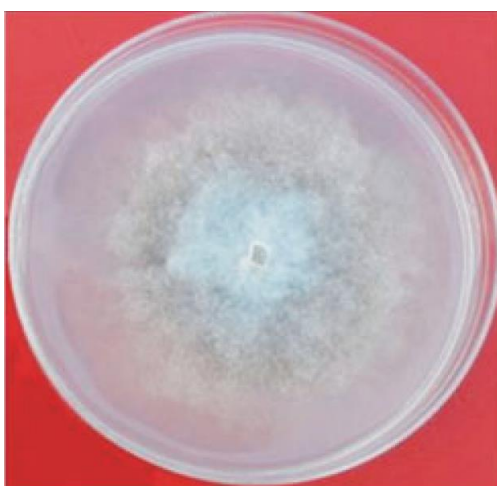


Figura 2 - Colonia di *Monilinia fructigena* su piastra Petri contenente un substrato a base di Potato Dextrose Agar (PDA) (Poniatowska et al., 2013).

1.2.3 *Monilinia laxa*

La malattia causata da questo fungo ascomicete è solitamente indicata come marciume bruno europeo perché è stato segnalato per primo in quasi tutti i paesi europei (Holb, 2008). Gli ospiti principali sono il pesco, l'albicocco il prugno, l'amarena e, più raramente, il melo. L'avvizzimento dei fiori è un sintomo caratteristico che si presenta sulle piante ospiti (Holb, 2008). Oltre alle perdite subite durante la stagione colturale, si verificano danni significativi anche sui frutti, in particolare durante la conservazione (Holb, 2006).

M. laxa allevata *in vitro* su substrato a base di patata (Patato Dextrose Agar) PDA mostra, a 22°C, un tasso di crescita inferiore rispetto agli isolati della specie *M. fructicola*. Le colonie sono marcatamente lobate e hanno una sporulazione scarsa. Nei primi giorni di incubazione, le colonie sono di colore bianco-rosato (Figura 3); dopo 6 giorni cambiano colore e dopo 10 giorni diventano grigio-olivastro (Poniatowska et al., 2013). Lo stroma può essere grigiastro o marroncino. I conidi sono simili a quelli di *M. fructicola*, il tubetto germinativo è corto e ruotato. La dimensione dei conidi è di 11,5-17 × 8-11 μm, i tubi germinali sono corti e le ramificazioni sono vicino ai margini (Martini et al., 2014; Rungjindamai et al., 2014). Lo sviluppo di *M. laxa* può verificarsi a 10°C, ciò significa che la specie si sviluppa anche a basse temperature (Obi et al., 2018). Una ricostruzione completa e funzionale del genoma di *M. laxa* è stata recentemente effettuata (Landi et al., 2019).

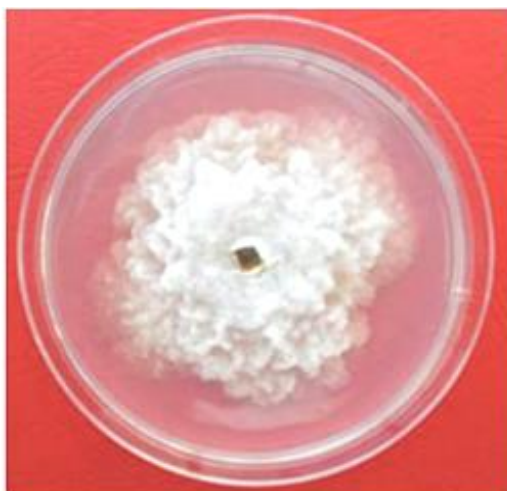


Figura 3 - Colonia di *Monilinia laxa* su piastra Petri contenente un substrato a base di Potato Dextrose Agar (PDA) (Poniatowska et al., 2013).

1.2.4 *Monilinia polystroma*

Il marciume bruno era già presente in tutto il mondo, quando *M. polystroma* fu rilevata in Giappone per la prima volta alla fine degli anni '70 (Cox et al., 2018). Allevata *in vitro* su PDA le colonie di *M. polystroma* ad una temperatura di 22°C presentano una crescita moderata con sporulazione scarsa e un'intensa formazione di placche di stroma nere dopo 10-12 giorni di incubazione (van Leeuwen et al., 2002) (Figura 4). *M. polystroma* è una specie più recentemente identificata nel genere *Monilinia*. In Europa è segnalata come causa di disseccamento dei fiori e marciume bruno nelle drupacee e nel melo. In alcune aree, tra cui l'America settentrionale, la malattia è comunemente indicata come marciume bruno asiatico; tuttavia, la malattia non è sostanzialmente diversa da quella che viene tradizionalmente definita marciume bruno delle drupacee causato dalle altre specie di *Monilinia*.

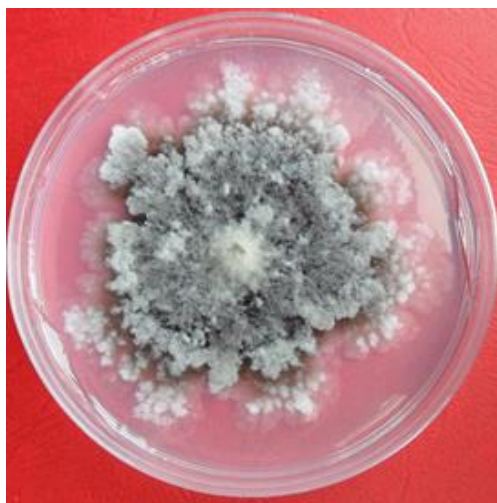


Figura 4 - Colonia di *Monilinia polystroma* su piastra Petri contenente un substrato a base di Potato Dextrose Agar, PDA (Poniatowska et al., 2013).

1.3 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

Le specie di *Monilinia* principalmente coinvolte nel marciume bruno sono distribuite in tutto il mondo ma in misura differente. In Asia centrale ed orientale, regioni geografiche di origine degli ospiti vegetali principali, appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae*, generi *Malus* Mill., *Pyrus* L. e *Prunus*, tutte le specie fungine appartenenti al genere *Monilinia* sono diffuse (Abate et al., 2018).

M. fructicola è responsabile del marciume bruno americano ed originariamente era localizzata in Nord e Sud America, Giappone, Australia, Nuova Caledonia e

Nuova Zelanda ma attualmente è diffusa in tutto il mondo. I primi rilevamenti in Europa di *M. fructicola* sono stati su pesco in Francia nell'anno 2001. Da allora la specie si è diffusa in altri paesi Europei, in particolare in Italia, Polonia, Germania, Spagna e Ungheria (Rungjindamai et al., 2014). In Italia, *M. fructicola* è stata rilevata negli ultimi anni in Piemonte (Pellegrino et al., 2009) e in seguito è comparsa anche in Emilia-Romagna, Lazio (Martini et al., 2013) e Marche (Landi et al., 2016).

M. fructigena è confinata in Europa e in parte dell'Asia, è assente in Sud America, Australia e Nuova Zelanda, ed è una specie presente sia su drupacee che soprattutto su pomacee (<http://www.cabi.org/isc/datasheet/34747>).

M. laxa è l'agente causale dell'avvizzimento dei fiori e dei rami delle drupacee (Holb, 2006) ed è presente in tutte le aree di produzione frutticola del mondo (Balaž, 2000). In Europa *M. laxa* e *M. fructigena* erano le uniche specie presenti fino al millennio scorso (Abate et al., 2018). Tra queste *M. laxa* è la specie più diffusa nel vecchio continente rappresentando l'85-90% degli isolati identificati (Di Francesco e Mari, 2018).

M. polystroma, inizialmente descritta in Giappone (Van Leeuwen et al., 2002) è ora presente in alcune regioni dell'Asia e dell'Europa compresa l'Italia centrale (Martini et al., 2014). Si ipotizza che il commercio internazionale di drupacee all'interno e attraverso i continenti abbia portato alla diffusione e all'affermazione di *M. polystroma* in Asia e in Europa (Poniatowska et al., 2016).

1.4 SINTOMATOLOGIA

Le specie di *Monilinia* colpiscono la parte aerea delle piante. All'inizio della primavera, quando gli alberi sono in fiore, la malattia si manifesta sui fiori e foglie provocandone l'avvizzimento e sui rami provocando cancri. Successivamente il fungo colpisce il frutto provocandone il marciume prevalentemente nelle 2-3 settimane prima della raccolta, a causa dell'aumento del contenuto zuccherino man mano che i frutti maturano, e in fase di postraccolta quando i frutti sono più suscettibili a causa di diversi fattori che creano condizioni di sviluppo favorevoli.

1.4.1 Avvizzimento dei fiori

I primi segni di infezione in un frutteto si manifestano sui fiori in primavera provocandone l'avvizzimento (Figura 5). I fiori sono più suscettibili dalla formazione delle gemme alla caduta dei petali (Holb, 2008b). I primi organi ad essere infettati sono le antere e il pistillo. Il fungo invade poi l'ovario, il peduncolo e solitamente il ramoscello a cui è attaccato il peduncolo. I fiori infetti appassiscono, disseccano e rimangono attaccati al ramoscello. Come conseguenza si ha una riduzione dell'allegagione e la presenza di un'infezione latente nei frutticini. Il tessuto infetto diventa marrone scuro e lo scolorimento può diffondersi in tutte le parti del fiore. All'interno del fiore infetto e appassito il fungo produrrà conidiofori e conidi che potranno infettare altri alberi all'interno del frutteto (Byrde et al., 1977; Di Francesco et al., 2018).



Figura 5 - Avvizzimento florale causata da *Monilinia* spp.

1.4.2 Avvizzimento ramoscelli e foglie

L'avvizzimento del ramoscello è un'estensione dell'avvizzimento del fiore infettato precedentemente. Sul tessuto infetto appaiono aree marroni con produzione di gomma. A sua volta, l'avvizzimento delle foglie deriva da quello dei ramoscelli; è difficile che il fungo riesca a penetrare direttamente nelle foglie. Le foglie iniziano a diventare marroni con conseguente essiccazione della parte malata o morte. Questa infezione è causata in particolare da *M. laxa* (Hrustic et al., 2012).

1.4.3 Cancro rameale

Questo sintomo è caratterizzato da necrosi della corteccia seguita da scolorimento del tessuto sottostante che dà luogo ad una ferita. L'area infetta viene ricoperta da gomma (Figura 6). Questo sintomo non si sviluppa per penetrazione diretta dei conidi ma è il risultato della crescita del micelio nei ramoscelli avvizziti o di quello cresciuto nei frutti infetti (Byrde et al., 1977; Di Francesco et al., 2018).



Figura 6 - Trasudazione di sostanza gommosa causata da *Monilinia* spp. su ramo di pesco.

1.4.4 Frutti infetti

L'infezione del frutto può verificarsi durante l'allegagione se i fiori sono già infetti, per penetrazione diretta a causa della presenza di ferite e lesioni, o attraverso l'apertura naturale degli stomi (Emery et al., 2000). La malattia rimane dormiente fino a quando le condizioni diventano favorevoli per il suo sviluppo e crescita; il frutto immaturo è più resistente grazie alla presenza di meccanismi di difesa molto forti nei frutti giovani (Obi et al., 2018). I frutti diventano più suscettibili man mano che maturano a causa dell'aumento del contenuto di zucchero e dell'indebolimento dei meccanismi di difesa. Inizialmente il sintomo appare come una piccola macchia marrone e circolare che si espande gradualmente (Liberato e Miles, 2006). Ad alte temperature ed umidità l'infezione può invadere completamente il tessuto in pochi giorni con conseguente comparsa di masse bruno- grigiastre contenenti spore

(Figura 7a). La frutta perde umidità, inizia ad avvizzire e, infine, mummifica (Figura 7b).



Figura 7 - Marcata presenza di muffa causata da *Monilinia* spp. su nettarina (a). Mummie derivate da frutti di pesco (b).

1.5 CICLO BIOLOGICO ED EPIDEMIOLOGIA DELLA MALATTIA

Il patogeno sverna come micelio nelle mummie dei frutti rimasti sull'albero e sui cancri presenti sui rametti, oppure come pseudosclerozi nelle mummie. Questi focolai diventano la fonte primaria di inoculo. I nuovi conidi vengono prodotti dal micelio presente sulle mummie e nei cancri dei rametti, mentre gli pseudosclerozi, presenti nei frutti caduti, producono apotecii dai quali si originano aschi e ascospore. I fiori che si aprono sono il primo tessuto sensibile che emerge in primavera ed ogni organo può essere un sito di infezione. Il tessuto infettato assume una colorazione marrone scura e il micelio produce conidi nelle parti fiorali che presentano marciumi o avvizzimenti. Il micelio avanza nei piccioli, nei rametti e nei germogli dei frutti, dando origine ad un cancro scuro e diventando una fonte di inoculo secondario. Le fonti d'inoculo per i fiori sono le mummie, i peduncoli infetti e i cancri. I conidi provenienti da queste fonti sono disseminati dal vento e dalla pioggia (van Leeuwen e van Kesteren, 1998; Ritchie, 2000) o attraverso insetti (Figura 8). L'infezione dipende dal permanere di condizioni di umidità e di temperatura idonee che ne favoriscono la crescita (Adaskaveg et al., 2000). Affinché l'infezione del fiore si verifichi a 10°C, sono necessarie 18 ore di bagnatura; al contrario, a 24°C sono necessarie solo 5 ore. Il tempo necessario per lo sviluppo dei sintomi può variare da pochi giorni a 1-2 settimane, a seconda della temperatura. In condizioni ottimali, bastano pochissimi fiori infettati per causare

gravi danni ai frutti. Con la maturazione dei frutti e l'aumento del contenuto zuccherino, essi diventano sempre più suscettibili alle infezioni. Al contrario, i frutti verdi e immaturi sono meno esposti alle infezioni, a meno che non siano lesionati. Tra le fonti di infezione per i frutti vi sono i fiori malati, i cancri rameali, le mummie della stagione precedente e i frutti malati sull'albero o sul terreno del frutteto. Condizioni climatiche caratterizzate da temperature e umidità elevate, durante le 2 o 3 settimane prima della raccolta, aumentano la gravità della malattia. Se queste condizioni sono presenti anche durante il periodo della raccolta, le perdite di produzione possono essere consistenti. Il marciume può svilupparsi durante il periodo di postraccolta (Byrde e Willetts, 1977). L'infezione può anche diffondersi rapidamente durante lo stoccaggio, tramite il contatto miceliale tra frutti infetti e sani (Willetts e Bullock, 1993). Le stesse condizioni aumentano anche l'inoculo svernante disponibile per le infezioni da fiore nella primavera successiva (Ritchie, 2000). I conidi possono entrare nei frutti dalle ferite in un lasso di tempo molto breve e, in alcuni casi, possono anche passare attraverso gli stomi (EFSA, 2011). Inizialmente i funghi crescono nelle zone intercellulari, poi secernono enzimi che causano la macerazione e la rugginosità dei tessuti infetti. Così la frutta viene invasa rapidamente dal patogeno e vengono prodotti altri conidi che a loro volta possono avviare nuove infezioni. Le infezioni che avvengono in campo possono rimanere latenti fino a che la frutta non matura, permettendo così a *Monilinia* spp. di superare le difese dell'ospite e causare malattia (Emery et al., 2000).

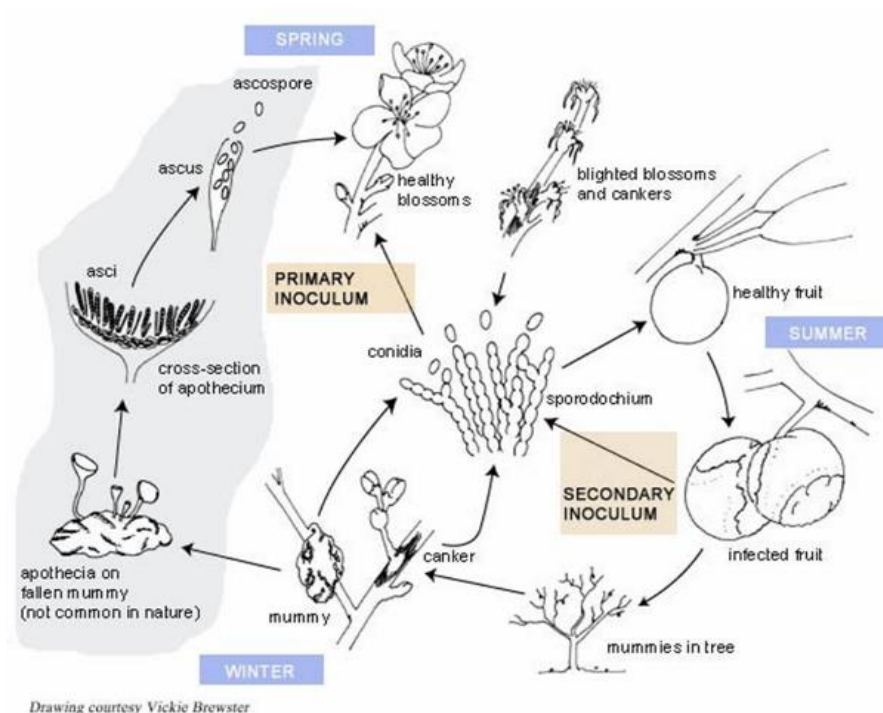


Figura 8 - Ciclo vitale di *Monilinia* spp.

1.6 FATTORI AGRONOMICI ED AMBIENTALI CHE FAVORISCONO LA MALATTIA

Diversi fattori ambientali ed agronomici influenzano lo sviluppo dei funghi modificando lo sviluppo della malattia e la dinamica dell'epidemia di marciume bruno durante la stagione. Possono verificarsi dei picchi di infezione che possono portare notevoli perdite in termini di resa. Conoscendo questi fattori, sapendo come e quando esercitano la loro influenza e individuando il periodo in cui il rischio di infezione è più alto, è possibile riuscire a prevenire lo scoppio della malattia (Biggs e Northover, 1988).

1.6.1 Fattori agronomici

La presenza o l'assenza di inoculo determina se la malattia si verifica o meno in un frutteto (Keane et al., 1997). Le parti aeree di alberi infettati sono fonti di inoculo a causa della presenza di frutti mummificati lasciati sugli alberi che aumentano il carico di spore nell'ambiente e quindi diventano fonte primaria di inoculo (Villarino et al., 2010). La chioma spessa e densa degli alberi può causare un microclima umido all'interno dell'albero con conseguente minor circolazione dell'aria. La penetrazione della luce è limitata privando le parti interne della fonte più necessaria per la fotosintesi. Questo crea condizioni favorevoli per lo sviluppo del patogeno.

In diversi studi è stato messo in evidenza il rapporto tra sviluppo della malattia e presenza di insetti. In un esperimento condotto da Lack (1989) su mele ferite artificialmente con specie di *Monilinia* lo sviluppo della malattia è stato osservato maggiormente sui tessuti visitati dagli insetti rispetto a quelli dove il contatto non è avvenuto a causa dei danni inflitti come quelli procurati dai coleotteri della specie *Carpophilus* (*Nitiduladae*), parassiti che infliggono alti livelli di danni su drupacee, in particolare su varietà altamente suscettibili (Hossain et al., 2013). Quindi il controllo degli insetti nocivi è fondamentale per prevenire danni ai frutti che aumentano la suscettibilità alla malattia.

1.6.2 Fattori ambientali

Il primo fattore che influenza la malattia è la temperatura. Determinate temperature predispongono la pianta all'infezione riducendo il livello di resistenza parziale, supportando contemporaneamente la rapida germinazione, la penetrazione dell'ospite, la riproduzione e la sporulazione dei conidi (Agrios, 2005). Il marciume bruno rimane dormiente nei mesi invernali e sopravvive su frutti mummificati, ramoscelli avvizziti e lesioni cancerose. Byrde e Willetts (1977) hanno evidenziato che la temperatura ottimale per lo sviluppo e la sporulazione miceliale è di circa 25°C. Tuttavia, Willetts e Harada (1984) hanno dimostrato che per la maggior parte delle specie di *Monilinia* la temperatura ottimale per la crescita miceliare varia da 15°C a 20°C; solo *M. laxa* necessita di 25°C per crescere in modo ottimale. Temperature che si discostano dall'intervallo 0-30°C ritardano la germinazione (Biggs et al., 1988; Luo et al., 2001).

La temperatura influisce anche sullo sviluppo degli apotecii ed è in relazione con la fioritura del pesco. Infatti, quando il pesco fiorisce precocemente, anche l'apotecio è prodotto in anticipo (Norton et al., 1923). Le temperature più adatte per l'iniziazione e la differenziazione degli apotecii sono inferiori a quelle per la crescita e la sporulazione miceliale. La temperatura ottimale per la loro formazione e lo sviluppo è di circa 15°C. Temperature primaverili moderate (da 10°C a 15,5°C) favoriscono lo sviluppo degli apotecii mentre un clima più freddo lo scoraggia (Ogawa e English, 1991). Le temperature comprese tra 15°C e 25°C favoriscono lo sviluppo della malattia, sebbene l'infezione possa verificarsi anche in condizioni più estreme tra 5°C e 30°C.

Il secondo fattore meteorologico più importante che influenza lo sviluppo di *Monilinia* è l'umidità relativa (Villarino et al., 2012). Le precipitazioni, che si verificano durante il periodo del raccolto, quando i frutti sono maturi, aumentano l'incidenza e la gravità del marciume bruno (Adaskaveg et al., 2005). Le precipitazioni abbondanti e il perdurare dell'umidità per più di 4 ore aumentano il rischio dell'avvizzimento dei fiori (Luo et al., 2001). L'umidità disponibile nel tessuto ospite infetto, il tipo e la condizione del tessuto infetto influenzano notevolmente la quantità di micelio prodotto. Ad umidità relativamente elevate, o quando l'organo è impregnato d'acqua, l'infezione dei tessuti legnosi come i ramoscelli possono diventare severi, ma in condizioni meno umide le attività del fungo vengono seriamente limitate o bloccate (Corbin e Cruickshank, 1963).

In *M. fructigena* è stato dimostrato che il conidio germina solo in condizioni di umidità prossimi alla saturazione, maggiore o uguale al 97% di umidità relativa (Xu et al., 2001). Inoltre, la sporulazione di *M. fructigena* a 10-20°C sembrava non essere influenzata dall'umidità relativa una volta stabilita l'infezione. Umidità relativamente alta è necessaria per una buona formazione dello stroma (Willetts e Harada, 1984). I frutti si seccano durante il processo di mummificazione e sopravvivono in condizioni sfavorevoli in inverno. A fine stagione, quando la temperatura sale e le mummie sono bagnate, o con l'assorbimento di acqua libera, o di vapore acqueo, si sviluppano i conidi. Il contenuto minimo di umidità delle mummie per la sporulazione a 26°C è risultato essere del 21% (Byrde e Willetts, 1977). Per quanto riguarda gli apotecii si sviluppano solo su mummie di frutta sul terreno e non sono mai stati riportati su frutti mummificati ancora appesi agli alberi. Questa situazione è probabilmente associata alla maggiore essiccazione del frutto dell'albero rispetto a quello nel terreno. Le mummie hanno una ridotta capacità di assorbire l'umidità e mantenerla per un tempo abbastanza lungo da indurre l'iniziazione e la differenziazione degli apotecii (Byrde e Willetts, 1977; Willetts e Harada, 1984).

1.7 METODI DI LOTTA UTILIZZATI IN PRERACCOLTA E IN POSTRACCOLTA

L'abbondanza relativa delle specie di *Monilinia* in un frutteto influisce sull'efficacia di controllo (Holmes et al., 2011). Fitofarmaci, pratiche colturali, controlli biologici e altre misure di controllo possono ridurre o eliminare la possibilità di un'epidemia,

tuttavia, l'uso di alcune di queste pratiche, possono avere conseguenze anche negative come lo sviluppo di resistenze. Rilevare questa malattia è un processo complesso a causa della natura delle infezioni che diventano molto visibili solo nelle fasi finali della maturazione e possono svilupparsi, a causa delle infezioni latenti, durante il trasporto e presso il domicilio del consumatore. Il rilevamento rapido, accurato e affidabile delle infezioni latenti da *Monilinia* spp. è raccomandato per prevenire e controllare la dispersione di questi patogeni (Obi et al., 2018). La previsione delle infezioni può essere effettuata sulla base di un monitoraggio accurato, conoscendo e controllando le possibili fonti di inoculo, il ciclo della malattia e conoscendo la suscettibilità intrinseca delle varie varietà.

1.7.1 Pratiche colturali

Le pratiche colturali, la selezione del sito di collocazione del frutteto, la densità di impianto, l'habitus di crescita, la selezione varietale, l'allevamento di varietà meno suscettibili, sono tutti fattori importanti capaci di ridurre il rischio di incidenza della malattia (Kišpatić e Maceljki, 1989). Nella realizzazione di un frutteto, occorre selezionare un terreno in pendenza e orientare le file in direzione dei venti dominanti per una migliore ventilazione. Gli alberi piantati in frutteti con scarso arieggiamento, e quindi con condizioni di umidità permanenti, hanno maggiori probabilità di contrarre la malattia (Trkulja, 1996). La riduzione della quantità di inoculo nell'ambiente è un aspetto importante nella gestione della malattia. L'inoculo primario in primavera ha origine principalmente da frutti svernanti infettati nella stagione precedente. I frutti infetti, che rimangono nella chioma dell'albero come mummie, contribuiscono al pool di inoculo primario nell'anno successivo. È sempre raccomandato rimuovere e distruggere i frutti mummificati e non, durante la potatura nella stagione dormiente (Byrde e Willetts, 1977). I frutti che cadono a terra subito dopo l'infezione generalmente si decompongono rapidamente e quindi non sono in grado di contribuire all'inoculo primario nell'anno successivo. Tuttavia, nel caso di *M. fructicola*, possono servire come fonte importante di inoculo ascosporico. Per questo è consigliato lavorare il terreno e non lasciarlo incolto in modo da eliminare possibili fonti di infezione. Una eccessiva fertilizzazione, inoltre, può influenzare la densità dei rami, limitando la circolazione dell'aria e favorendo la proliferazione dei patogeni, mentre concimazioni a base di

calcio, effettuate prima della raccolta, sembrano ridurre significativamente l'incidenza del marciume bruno durante la conservazione. Elmer et al. (2007) hanno evidenziato che i frutti contenenti più calcio nell'epidermide sono molto meno soggetti ad infezioni. Anche le irrigazioni non equilibrate, specialmente durante gli ultimi giorni della raccolta, possono comportare un aumento di umidità e microlesioni sulla superficie dei frutti che favoriscono l'ingresso delle spore di *Monilinia*.

1.7.2 Trattamenti con agrofarmaci

Per il contenimento dei marciumi nei frutteti si utilizzano fungicidi le cui dosi di utilizzo dipendono dalla natura dell'inoculo, dall'ontogenesi dell'ospite e del fungo, dalle modalità di infezione, dagli organi attaccati, dalle condizioni pedoclimatiche e dai costi dei prodotti. I fungicidi sono stati utilizzati per la prima volta contro le specie di *Monilinia* all'inizio degli anni '20, quando sono stati introdotti i fungicidi a base di rame (Holb, 2006). Miscele bordolesi e sostanze simili sono state applicate per i trattamenti invernali, che hanno ridotto significativamente il potenziale infettivo del patogeno svernante (Holb, 2005). A partire dagli anni '50, un effettivo controllo dei marciumi è stato ottenuto con l'introduzione di captano e dicloran. Negli anni '70 sono stati introdotti prodotti contenenti benzimidazolo (MBC), i quali hanno migliorato notevolmente il controllo nei frutteti della diffusione della malattia. In particolare, il benomyl o il metil tiofanato sono risultati efficaci nei trattamenti in fioritura. Nel 1977, è stata rilevata per la prima volta la resistenza di *Monilinia* spp. ai benzimidazoli in vari paesi dopo soli 5 anni dalla loro registrazione. Il rapido insorgere della resistenza è motivato dalla modalità di azione del fungicida che va a inibire un solo sito di un gruppo di microtubuli durante la meiosi e la resistenza è stata associata ad una mutazione puntiforme del gene della β -tubulina. Dopo la diffusa insorgenza di resistenza ai fungicidi MBC, gli inibitori dell'ergosterolo (fungicidi DMI) sono diventati i fungicidi più efficaci e più utilizzati contro specie di questo genere su drupacee, nella prevenzione della malattia sia sui fiori che sui frutti (Zehr et al., 1999; Schnabel et al., 2004). Per più di due decenni i fungicidi DMI sono stati utilizzati senza segnalazioni di sviluppo di resistenze. La resistenza è stata segnalata per la prima volta nel 2004 in Georgia e successivamente in Carolina del Sud, Ohio, New York, Pennsylvania, New Jersey

e Brasile. Dopo la comparsa di isolati resistenti a MBC e DMI sono stati registrati nuovi gruppi di fungicidi con diverso meccanismo d'azione: strobilurine, carbossamidi, idrossianilidi e anilinopirimidine, che vengono proposti per un utilizzo contro gli agenti causali del marciume bruno. Tuttavia, le strobilurine azoxystrobin e pyraclostrobin sono considerati fungicidi ad alto rischio in termini di sviluppo di resistenza (Amiri et al., 2008). Oggi il protocollo di protezione dei frutti contro le specie di *Monilinia* inizia anche con trattamenti invernali preventivi con fungicidi a base di rame. L'applicazione di fungicidi durante la fioritura e nella fase successiva rimane il metodo principale per gestire il marciume bruno in frutteto, nonostante i potenziali effetti negativi a lungo termine sull'ambiente. Nelle aree in cui è frequente il disseccamento dei fiori in primavera a causa delle condizioni meteorologiche favorevoli al patogeno, si effettuano da 1 a 3 trattamenti con fungicidi durante la fioritura. Per il controllo del marciume bruno, vengono solitamente effettuati 2 o 3 trattamenti 2 o 3 settimane prima della raccolta. Nello stesso periodo è importante il controllo degli insetti, specialmente quelli che danneggiano direttamente i frutti, in modo da ridurre le infezioni che avvengono attraverso le lesioni (Ritchie, 2000).

1.7.3 Uso di sostanze alternative

Psota et al. (2013) hanno dimostrato l'uso efficace di prodotti alternativi nel controllo del marciume bruno e nell'avvizzimento dei fiori di albicocco. I trattamenti sono stati effettuati utilizzando questi prodotti: Alginure (estratto di alghe marine 24%, aminoacidi vegetali 7%, fosfati 20%), Kocide 2000 (53,8% di rame puro), Kumulus WG (80% di zolfo puro), VitiSan (idrogeno di potassio bicarbonato 100%), e Polisenio (calce zolfo, 380 g/l). L'efficacia del trattamento contro l'avvizzimento dei fiori è stata registrata come segue; 63,34%, 65,82%, 56,21%, 63,34% e 38,48%. La combinazione di Alginure e Kocide 2000 ha mostrato la massima efficacia con 100% prevenzione delle infezioni.

In postraccolta l'utilizzo di acido paracetico e biossido di calcio sono efficaci in determinate condizioni nella devitalizzazione dei conidi portando ad una riduzione della malattia (Mari et al., 1999). Un'altra tipologia di prodotti utilizzabili sono gli induttori di resistenza. Tra gli induttori di resistenza, uno dei più utilizzati è il chitosano, contenuto in numerosi formulati commerciali (Romanazzi et al., 2018).

Il chitosano si ottiene dalla decomposizione dei gusci di crostacei che apportano un'elevata quantità di chitina di provenienza naturale, che simula il contenuto delle pareti cellulari dei funghi, e stimola le naturali difese immunitarie e il vigore vegetativo della pianta. L'applicazione del chitosano alle piante promuove una reazione difensiva endogena. I meccanismi difensivi indotti prevedono una protezione fisica attraverso un ispessimento di tessuti e pareti cellulari per bloccare la penetrazione del patogeno e la sua diffusione; inoltre, prevedono una protezione biochimica mediante la produzione di composti ad azione antifungina ed antibatterica come fitoalessine ed enzimi idrolitici (Landi et al., 2017). Ma *et al.* (2013) hanno evidenziato che l'applicazione di chitosano su pesche aumenta la produzione di enzimi antiossidanti e di enzimi che innescano meccanismi di difesa. I trattamenti con chitosano su ciliegie sono risultati i più efficaci nel ridurre il marciume bruno in postraccolta a confronto con altri induttori di resistenza (Feliziani et al., 2013). Altre prove *in vitro* e su pesche in postraccolta hanno mostrato l'efficacia del chitosano nei confronti di *M. fructicola* (Yang et al., 2012; Ma et al., 2013).

1.7.4 Trattamenti fisici

Tra i metodi fisico-chimici, il calore è quello maggiormente studiato e può essere applicato utilizzando aria o acqua calda. La germinazione dei conidi di *M. laxa*, *M. fructigena* e *M. fructicola* viene inibita completamente in acqua a 55°C per 1 minuto; con la diminuzione della temperatura sono richiesti tempi maggiori per ottenere lo stesso risultato. Tra le tre specie, *M. fructicola* si è dimostrata la più resistente, e ciò probabilmente è dovuto alla sua capacità di tollerare l'accumulo intercellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Helmerhorst et al., 2001). In *vivo*, i migliori risultati sono stati ottenuti con immersioni di 20 secondi in acqua a 60°C, ottenendo riduzioni dal 51% al 94,7% dei marciumi causati da *M. laxa* (Spadoni et al., 2013). Le brevi immersioni sono ottime per conservare il prodotto durante i trasporti e buone per applicazioni commerciali rispetto ai trattamenti più lunghi di 6-12 minuti. I trattamenti con acqua calda (HW), pur richiedendo un'attrezzatura e conoscenze tecniche specifiche, sono un metodo sostenibile, economico e piuttosto efficace. L'applicazione di aria calda (50°C per 2 ore con 95-99% di umidità relativa) sembra inibire completamente *M. laxa* e *M. fructicola* in

quattro varietà di pesche e nettarine, senza causare danni esterni ed interni (Casals et al., 2010). I trattamenti con il calore sono efficaci anche con le infezioni latenti di *Monilinia* spp., poiché esso stimola i meccanismi di difesa dell'ospite. Il calore ha un'azione diretta e letale nei confronti dell'inoculo fungino, perché attacca le spore e il micelio presenti sulla superficie dei frutti o nei primi strati, e un'azione indiretta, perché induce la pianta ad aumentare la resistenza alla malattia. Le radiazioni sono un valido metodo per ridurre i marciumi causati da *Monilinia* spp. L'esposizione a raggi UV in esperimenti *in vitro* sembra inibire la crescita del micelio di *Monilinia* spp. (De Cal e Melgarejo, 1999), mentre non ha effetti su ciliegie (Marquenie et al., 2002). Un trattamento di 18 minuti sembra essere efficace sui marciumi in pesche, ma non in nettarine (Martini e Mari, 2016). Possono essere utilizzati, senza particolari restrizioni in Europa e Nord America, sali di comune uso. Tra questi, il carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, sorbato di potassio, propionato di sodio presentano una buona attività antimicrobica, non sono costosi, sono disponibili rapidamente e idonei alle pratiche di trasporto in postraccolta. Il sorbato di potassio e il benzoato di sodio mostrano una buona attività nei saggi preliminari, ma poca efficacia e persistenza quando testati contro *M. fructicola* in prove su piccola scala, presentando una riduzione dei marciumi inferiore al 40% (Palou et al., 2012). Al contrario, un trattamento a base di sorbato di potassio assicura un buon controllo di *Monilinia* spp. (riduzione dei marciumi superiore all'80% in diversi test) su pesche e nettarine naturalmente infette dalla *Monilinia* spp. (Gregori et al., 2008). L'utilizzo di questi prodotti comporta anche svantaggi, sono fungistatici, non sono molto persistenti e non possono essere applicati frequentemente.

Tra i metodi di prevenzione postraccolta sta diventando sempre più frequente l'utilizzo del pre-condizionamento dei frutti poco dopo la raccolta che impedisce la perdita di umidità, mantenendo così la compattezza dei frutti e prolungando la durata di conservazione; ciò è dovuto all'eliminazione del calore di campo. L'hydrocooling è il metodo di raffreddamento più utilizzato per i frutti di pesca. Durante il trattamento di idro-raffreddamento, il calcio, presente nella lamella mediana e nelle pareti cellulari primarie del tessuto vegetale con la funzione di legare i materiali cellulari, si infila nelle pareti cellulari con conseguente aumento dei livelli dello ione e quindi promuove la stabilità e protegge il frutto dalle infezioni

fungine (Kalbasi-Ashtari, 2004). Tra i metodi più innovativi per le infezioni postraccolta c'è l'uso dell'ozono e dell'acqua elettrolizzata (EO), poiché è sufficiente un'esposizione di un minuto in acqua ozonata a ridurre l'incidenza dei marciumi (Smilanick et al., 2002). È stato osservato che un trattamento intenso con EO è capace di posticipare o anticipare l'inizio dei marciumi da *Monilinia* spp. in postraccolta (Martini e Mari, 2016). I metodi alternativi non sono sempre capaci di ridurre i marciumi, specialmente se applicati individualmente: è necessario quindi utilizzarli in combinazione. Ad esempio, la combinazione tra HW ed etanolo risulta migliore nel controllo di *M. fructicola* su pesche e nettarine rispetto al trattamento con HW ed etanolo singolarmente (Margosan et al., 1997). Allo stesso modo, la combinazione tra acido peracetico e HW (trattamento con acido peracetico riscaldato a 40°C) mostra una maggiore riduzione dei marciumi nelle varietà di pesca 'Mountain Gold' e 'Rome Star' inoculate con *M. fructicola*, rispetto al trattamento con HW e acido peracetico applicati singolarmente (Sisquella et al., 2013). L'applicazione del bicarbonato di sodio aumenta l'efficacia del lievito antagonista *Cryptococcus laurentii* contro i marciumi su ciliegie. Allo stesso modo, la combinazione di un trattamento con chitosano in campo seguito da un trattamento ipobarico ha avuto un effetto sinergico nel controllo del marciume bruno e della muffa grigia su ciliegie (Romanazzi et al., 2003). L'efficacia del trattamento combinato tra UV-C e lieviti è dovuto probabilmente alla capacità dei raggi UV-C di controllare le infezioni, come quelle latenti, mentre i lieviti controllano le infezioni superficiali originatesi da ferite recenti. Inoltre, il controllo delle infezioni latenti con UV-C è causato da un'induzione di produzione di sostanze fungitossiche nei tessuti di pesca trattati (Wilson et al., 1994). I trattamenti con il calore hanno ridotto effettivamente le infezioni di *M. fructicola* che si erano instaurate in campo, ma non hanno una validità per le future infezioni dopo il trattamento, prima della frigoconservazione. Invece, la combinazione con *B. subtilis* ha mostrato il miglior controllo del marciume causato da *M. fructicola* nelle varietà di pesca 'Baby Gold' e 'Andros', inizialmente poste a 50° per 2 ore, poi trattate con BCAs (Casals et al., 2012).

1.7.5 Trattamenti con biopesticidi

Il controllo biologico prevede l'impiego di microrganismi al posto dei fungicidi convenzionali, o come loro complemento, al fine di ridurre la quantità di sostanze chimiche utilizzate in agricoltura. La maggior parte delle ricerche sull'uso di funghi, batteri e lieviti antagonisti è stata eseguita negli ultimi vent'anni. Diversi agenti di controllo biologico sono stati sviluppati con successo e alcuni di essi sono già registrati per l'uso nella produzione di frutta (Hrustic et al., 2012). Lo scopo dell'applicazione in preraccolta della coltura antagonista è di pre-colonizzare la superficie del frutto immediatamente prima della raccolta in modo che eventuali ferite inflitte durante la raccolta possano essere colonizzate dall'antagonista prima del patogeno. È stato dimostrato che anche l'applicazione in postraccolta degli antagonisti è un metodo utile ed efficace per controllare le malattie (Sharma et al., 2009). Essi agiscono producendo composti antimicrobici che hanno un effetto antagonista contro i funghi patogeni. Gli antagonisti possiedono la capacità di aumentare rapidamente la loro popolazione dopo aver colonizzato la superficie del frutto in modo tale da superare la popolazione di specie patogene e produrre tossine che ne inibiscono lo sviluppo. Un primo microrganismo utilizzato è *Bacillus subtilis*, un batterio noto da tempo per la sua attività antimicrobica, è un principio attivo di diversi prodotti registrati in tutto il mondo (Tomlin, 2009), tra cui Serenade, un formulato commerciale ad azione fungicida e battericida. Anche l'uso di funghi antagonisti si è rivelato efficace nel controllo di *Monilinia* spp. Studi precedenti hanno evidenziato che cinque specie tra cui *Aspergillus flavus*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* e *Penicillium purpurogenum* inibiscono la crescita ifale e la germinazione conidica di *Monilinia* spp. (Melgarejo et al., 1985). Trattamenti postraccolta su prugne con conidi di *P. frequentans* hanno ridotto l'incidenza e il diametro delle lesioni del marciume bruno causato da *M. laxa* (De Cal et al., 2002; Larena et al., 2004). Applicazioni preraccolta di *E. nigrum*, da solo o in combinazione con fungicidi, su pesche (Larena et al., 2005) e trattamenti postraccolta (Mari et al., 2007) su nettarine sono state efficaci nel ridurre l'incidenza del marciume bruno. *Aureobasidium pullulans* applicato in preraccolta su ciliegie, è in grado di ridurre il marciume da *M. laxa* in postraccolta, poiché riesce a sopravvivere in campo ed a riprodursi durante la conservazione in cella frigo. Altri isolati di questa specie sono

risultati efficaci nel ridurre il marciume bruno causato da *M. laxa* su pesche e prugne (Zhang et al., 2010). Per quanto riguarda i composti naturali, ci sono piante medicinali e aromatiche che sono note per essere una importante fonte di sostanze con attività antimicrobica. Studi precedenti hanno dimostrato che la fase volatile di alcuni oli essenziali, di timo, origano e agrumi, è altamente tossica per gli agenti patogeni della frutta in postraccolta (Tanović et al., 2009, 2010; Hrustić et al., 2011; Sivakumar e Romanazzi, 2019). Estratti vegetali provenienti da infestanti perenni del bacino del Mediterraneo, *Dittrichia viscosa* e *Ferula communis*, sono efficaci nel ridurre la germinazione dei conidi e la crescita del micelio di molti funghi postraccolta, tra cui *M. laxa* e *M. fructigena* (Mamoci et al., 2011). Oli essenziali di diverse piante, incluso quello di alloro, sono risultati efficaci nel ridurre il marciume bruno causato da diverse specie di *Monilinia* (De Corato et al., 2010; Lopez-Reyes et al., 2013). Un olio essenziale usato per numerose colture, in commercio con il nome di Prev-Am, è l'olio essenziale di arancio dolce, ottenuto da un processo di spremitura a freddo dei frutti e delle bucce. Il principio attivo, appartenente al gruppo chimico dei terpeni, è caratterizzato da velocità d'azione e determina l'assenza di residui nelle derrate. Infatti, ha un intervallo di sicurezza di soli tre giorni su tutte le colture. Quest'olio ha attività insetticida e fungicida, agendo per contatto diretto, disidratando e disseccando le parti molli degli insetti e degli organi esterni dei funghi (miceli, conidi, cleistoteci, ecc.), riducendo il potenziale di inoculo delle malattie già presenti sui vegetali. Su pesco è registrato per il controllo dell'oidio.

1. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Le drupacee rappresentano la principale produzione frutticola della Regione Marche. Tuttavia, sono affette da una seria fitopatia, il marciume bruno, o moniliosi. Questa malattia è causata da funghi appartenenti al genere *Monilinia* che generano rilevanti perdite economiche in preraccolta e durante la fase di postraccolta in molte zone di coltivazione nel mondo. La scarsa conoscenza a disposizione delle aziende frutticole sulla gestione della moniliosi rappresenta un limite alla produzione sia dal punto di vista quantitativo, sia qualitativo. Attualmente, i trattamenti chimici con triazoli (soprattutto tebuconazolo), l'idrossianilide fenexamide ed inibitori del succinato deidrogenasi (SDHI) non sono sufficienti per controllare il marciume bruno nel frutteto, mentre non sono ammessi fungicidi chimici per il trattamento postraccolta delle drupacee, eccezion fatta per il fludioxonil. La resistenza ai fungicidi, la mancanza di nuovi fungicidi efficaci, le infezioni latenti e la capacità di crescere a basse temperature sono tra i fattori che sfidano la gestione della malattia. Inoltre, le crescenti richieste dei consumatori di alimentarsi con prodotti freschi senza residui di pesticidi al fine di salvaguardare la salute e prevenire la contaminazione ambientale, hanno accelerato la ricerca di metodi di controllo alternativi ecosostenibili.

L'obiettivo generale di questo lavoro di tesi è stato quello di contribuire ad incrementare le conoscenze utili a migliorare le pratiche di gestione del marciume bruno nelle fasi di preraccolta e in postraccolta. Con questa finalità una prima indagine ha riguardato la valutazione dell'efficacia di alcuni prodotti ecosostenibili nel controllo del marciume bruno in postraccolta su pesche. Un'altra ricerca, prendendo una azienda produttiva come modello, ha riguardato la identificazione, mediante tecniche molecolari, delle specie fungine appartenenti al genere *Monilinia*, associate alla malattia, diffuse nel frutteto. Le pesche oggetto di questo studio provenivano dalle aziende marchigiane 'Acciarri Società Agricola S.R.L.' (FM) e 'Agri Baronciani S.R.L.', (PU), partner nel progetto PSR "Prevenzione delle malattie postraccolta delle drupacee per la riduzione degli sprechi di ortofruttili freschi - ZeroSprechi" (www.zerosprechi.info), promosso dalla Regione Marche, 'Misura 16.1 sull'Innovazione', nell'ambito del quale è stata svolta questa ricerca. Il progetto ha come obiettivi l'ottimizzazione delle strategie di difesa e la potenziale introduzione di sostanze alternative per il controllo della moniliosi in postraccolta,

ed è finalizzato a migliorare la salute del consumatore e degli operatori del settore, la salvaguardia dell'ambiente e la riduzione degli sprechi di prodotti ortofrutticoli, spesso legati all'infezione da malattie postraccolta.

2 MATERIALI E METODI

3.1 PROVA SPERIMENTALE 1: STUDIO DELL'EFFICACIA DI COMPOSTI ECOSOSTENIBILI IN POSTRACCOLTA NEL CONTENIMENTO DELLA MONILIOSI

3.1.1 Caratteristiche dei frutteti oggetto di indagine

Le pesche utilizzate in questo studio provenivano da due aziende, la prima 'Agri Baronciani S.R.L.' situata in località Villa Ceccolini (PU) (Figura 9a), a conduzione biologica; la seconda 'Acciarri Società Agricola S.R.L' (Figura 9b), situata in località Ortezzano (FM), che opera in regime di agricoltura integrata.



Figura 9 - Pescheto dell'azienda 'Baronciani' (PU) (a); Pescheto dell'azienda 'Acciarri' (FM) (b).

Per ciascun frutteto sono state riportate le principali caratteristiche stazionali (Tabella 1 e Tabella 2).

Tabella 1 - Principali caratteristiche del frutteto ‘Baronciani’

Ubicazione frutteto	Villa Ceccolini
Provincia	Pesaro Urbino
Proprietà	Agri Baronciani S. R. L.
Latitudine	43°52'03.9"N
Longitudine	12°50'03.3"E
Altitudine	39 m s.l.m.
Specie	Pesca
Cultivar	+5 Tardibelle

Tabella 2 - Principali caratteristiche del frutteto ‘Acciarri’

Ubicazione frutteto	Ortezzano
Provincia	Fermo
Proprietà	Acciarri Società Agricola s.r.l.
Latitudine	43°01'18.45"N
Longitudine	13°36'36.16"E
Altitudine	206 m s.l.m.
Specie	nettarine
Cultivar	16-20

3.1.2 Trattamenti in postraccolta

La sperimentazione è stata effettuata nel settembre 2019 in relazione a due cultivar: +5 Tardibelle, proveniente dall'azienda ‘Baronciani’ e la cultivar 16-20 proveniente dalla azienda ‘Acciarri’. Queste cultivar sono particolarmente suscettibili a *Monilinia* spp. Il test ha previsto la valutazione dell'efficacia di sei prodotti fitosanitari alternativi ai fungicidi di sintesi nel controllo del marciume bruno rispetto a un fungicida di sintesi ed a due testimoni non trattati. Sono stati prelevati campioni di frutti sani da entrambi i frutteti e trasportati presso lo stabilimento di Cesena dell'impresa cooperativa ‘Apofruit’, dove si è svolta la prova (Figura 10).



Figura 10 - Stabilimento 'Apofruit' di Cesena.

I trattamenti effettuati sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3 - Formulazioni sintetiche e alternative con relativi principi attivi e dosaggi.

PRODOTTO	PRINCIPIO ATTIVO	DOSAGGIO
CHITOSANO CLORIDRATO	CHITOSANO (100%)	300 L/HA
3LOGY	EUGENOLO (3,2%), GERANIOLO (6,4%), TIMOLO (6,4%)	4 L/HA
SERENADE ASO	<i>Bacillus subtilis</i> CEPPPO 713 (1,34%)	4 L/HA
IBISCO	COS-OGA (12,5%)	2 L/HA
BONI PROTECT	<i>Aureobasidium pullulans</i> CEPPI DSM 14940 E 14941	1 KG/HA
LIMOCIDE	OLIO ESSENZIALE DI ARANCIO DOLCE (6%)	1000 L/HA
SCHOLAR	FLUDIOXONIL (20,4%)	200 ml/L
	TESTIMONE NON TRATTATO	

Per effettuare i trattamenti è stato utilizzato un contenitore di plastica che conteneva il prodotto da testare (Figura 11). Per ogni tesi sono stati trattati 200 frutti divisi in 4 repliche. I frutti di ogni replica sono stati immersi nella vasca contenente il trattamento per 30 secondi e, successivamente, sono stati posti ad asciugare

(Figura 12). Una volta asciugati completamente, i campioni sono stati trasferiti in cella frigorifera per la conservazione a 4°C.



Figura 11 - Trattamento delle pesche '+5 Tardibelle' con 'Limocide'.



Figura 12 – Pesche trattate in fase di asciugatura.

3.1.3 Valutazione delle infezioni latenti

La valutazione delle infezioni latenti è stata effettuata valutando la presenza di *Monilinia* spp. dopo 7 giorni di frigo conservazione ed a 3 giorni ed 8 giorni di shelf life. I rilievi sono stati effettuati in una cella a temperatura ambiente e, una volta individuate le pesche sintomatiche venivano contate e successivamente eliminate. Per tutti i rilievi effettuati è stata calcolata la diffusione (D) per ciascuna tesi presa in analisi. La diffusione (D) esprime la percentuale di frutti infetti sul totale dei frutti presenti sulle piante per quanto riguarda i rilievi in campo e sul totale dei frutti presenti nelle cassette per ciascuna tesi per quanto riguarda i rilievi in postraccolta. Tale parametro è stato calcolato con la formula:

$$D=n*100/N$$

dove: n: numero di frutti infetti

N: numero totale di frutti esaminati.

I dati così raccolti sono stati elaborati statisticamente calcolando le medie e la deviazione standard per ciascuna tesi considerata e per ciascun rilievo svolto. In seguito, è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) per verificare l'influenza dei trattamenti sui valori di diffusione. La significatività è stata valutata con il test di Tukey secondo il livello di probabilità $P < 0,05$.

3.2 PROVA SPERIMENTALE 2: IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DELLE SPECIE DI *MONILINIA* SPP. PRESENTI ALL'INTERNO DEL FRUTTETO

3.2.1 Raccolta campioni

Nel settembre 2019 sono stati prelevati dei campioni di pesche sane della varietà +5 Tardibelle dall'azienda a conduzione biologica 'Baroncini'. Il frutteto è stato trattato in preraccolta con i prodotti alternativi elencati in Tabella 4 utilizzando un'irroratrice a spalla modello Honda GX 25, 25cc, con motore a 4 tempi e potenza di kW 0,81 (CW 1,1). La pressione massima è di 25 bar (2,5 Mpa) e la sua regolazione avviene tramite comando manuale con 5 posizioni impostate a da 5 a 25 bar. In dettaglio 10 piante contigue sullo stesso filare sono state trattate con i 4

formulati testati, due piante per ogni trattamento e 2 piante sono state non trattate e utilizzate come controllo.

Tabella 4 - Formulati commerciali, percentuali dei principi attivi e dosi utilizzate

FORMULATO COMMERCIALE	PRINCIPIO ATTIVO (%)	DOSE (KG-L/HA)
PREV-AM PLUS	OLIO ESSENZIALE DI ARANCIO DOLCE (5,88)	6 (l/ha)
CHITOSANO	CHITOSANO (100)	1 (kg/ha)
SERENADE ASO	<i>BACILLUS SUBTILIS</i> , CEPPO QST 713 (15,67)	4 (kg/ha)
3LOGY	EUGENOLO PURO (3,2), GERANILO PURO (6,4), TIMOLO PURO (6,4)	4 (l/ha)

A 7 giorni dal trattamento sono stati campionati frutti asintomatici, n°105, per ogni tesi e portati in laboratorio. Le pesche sono state poste in cassette coperte con sacchetti di plastica nera ed incubate a temperatura ambiente allo scopo di far sviluppare l'inoculo di *Monilinia* spp. da infezioni latenti. Durante l'incubazione, i frutti sono stati monitorati e quelli con sintomi di marciume bruno sono stati prelevati e utilizzati per l'isolamento del patogeno. Sono stati isolati 88 campioni tra quelli che mostravano i sintomi della malattia.

3.2.2 Isolamento e caratterizzazione delle specie di *Monilinia*

La frutta infetta è stata sterilizzata con una soluzione di ipoclorito di sodio 1:10, corrispondente alla concentrazione di cloro attivo 0,5%. Di seguito è effettuato l'isolamento prelevando del tessuto sintomatico di circa 5 mm, utilizzando un bisturi sterile, e ponendolo in una capsula Petri (90 mm) contenente il terreno di coltura PDA reso selettivo dall'aggiunta di due antibiotici (ampicillina 100 mg/l e streptomicina solfato 100 mg/l). Tutte le operazioni sono state effettuate in condizioni di sterilità utilizzando una cappa a flusso laminare. Ogni capsula Petri è stata sigillata con parafilm e messa in incubazione a 23°C per alcuni giorni. Dopo alcuni giorni, è stata osservata la crescita delle colonie. Successivamente sono state effettuate diverse sub-colture del micelio al fine di ottenere una coltura pura.

3.2.3 Estrazione del DNA

Da ognuna delle colture pure è stato prelevato del micelio per effettuare l'estrazione del DNA totale secondo il metodo CTAB (cetiltrimetil ammonio bromuro) (Doyle e Doyle, 1990) modificato da Landi et al. (2019). In breve, il micelio di ogni campione è stato polverizzato meccanicamente con l'ausilio dell'azoto liquido. La polvere, 200 mg circa, è stata posta in un tubo da 2 ml. Ad ogni tubo è stato aggiunto 20 mg di metabisolfito di sodio ed 1 ml del tampone di estrazione costituito da: acqua; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 3% [w / v] CTAB [10%]; 2% [v / v] β -mercaptoetanololo; 1,4 M NaCl e 2 % [p / v] di PVP-40. Il tampone di estrazione con il micelio è stato posto in un bagnetto termostato a 65°C per 30 minuti. Trascorso il tempo di incubazione i tubi sono stati trasferiti in centrifuga per 10 minuti, a 4500g con lo scopo di eliminare i detriti più grossolani. Il sopranatante ricavato dopo la centrifugazione, 1 ml, è stato trasferito in un nuovo tubo a cui è stato aggiunto 1 ml di una soluzione di cloroformio/alcool isoamilico (24:1). La soluzione è stata centrifugata a 10.000g per 5 minuti a 4°C. Il sopranatante ottenuto è stato posto in un nuovo tubo e sottoposto a un ulteriore lavaggio con la soluzione cloroformio/alcool isoamilico (24:1). Il sopranatante ottenuto è stato posto in un nuovo tubo al quale è stata aggiunta 0,8 % di una soluzione di 2-propanolo. Dopo aver mescolato per 5 minuti a temperatura ambiente la soluzione, il DNA è stato fatto precipitare con l'ausilio della centrifuga per 20 minuti a 12.000g. Il pellet ottenuto è stato lavato aggiungendo 500 μ l di etanolo al 70%. Il pellet essiccato è stato risospeso in 50 μ l di acqua distillata. L'integrità e la qualità del DNA è stata verificata sulla base di un rapporto di assorbanza da 1,80 a 1,90 a 260/280 nm, utilizzando BioPhotometer plus (Eppendorf Inc., Westbury, NY, USA) e da 1,8 a 2,0 a 230/260 nm.

3.2.4 Amplificazione del DNA tramite PCR Multiplex

Dopo l'estrazione e la quantificazione del DNA è stata svolta una Multiplex PCR secondo il protocollo sviluppato da Cotê et al. (2004). Sono stati utilizzati tre primer forward specifici e un primer reverse (Tabella 5). L'amplificazione è stata eseguita con il termociclatore iCycler (Bio-Rad, USA). È stato preparato un mix di reazione contenente 0,8 μ L di ciascun primer alla concentrazione 0,5 mM, 1 μ l di DNA estratto (20-40 ng/ μ l), 5,8 μ l di acqua e 10 μ l Mastermix per un volume totale di 20

µl. I campioni sono stati inseriti all'interno del termociclatore ed è stato avviato il seguente programma di amplificazione: denaturazione iniziale 2 min a 95°C, seguita da 35 cicli di 15 s a 95°C, 15s a 60°C e 1 min a 72°C con un ultimo step di 5 min a 72°C.

Tabella 5 - Primers usati per l'amplificazione di *Monilinia* spp. con relative sequenze e numeri di pb.

SPECIE	PRIMER	SEQUENZA (F, Forward; R, Reverse)	AMPLICONE (pb)
<i>M. fructigena</i> <i>M. fructicola</i> <i>M. laxa</i>	MO 368-5	(R)5'GCAAGGTGTCAAAC TT CCA-3'	-
<i>M. fructigena</i>	MO 368-8R	(F) 5'- AGATCAAACATCGTCCAT CT-3'	402
<i>M. fructicola</i>	MO368- 10R	(F) 5'- AAGATTGTCACCATGGTT GA-3'	535
<i>M. laxa</i>	Laxa-R2	(F) 5'- TGCACATCATATCCCTCG AC-3'	351

3.2.5 Elettroforesi con gel di agarosio

I campioni, una volta amplificati, sono stati caricati su un gel di agarosio all'1,5%. Il gel è stato preparato sciogliendo agarosio all'interno di 100 ml di soluzione tampone (TAE 1%) ed aggiungendo 5 µl di colorante per acido nucleico fluorescente (Gelred, Biotinum). Per ogni campione sono stati caricati 5 µl e, per determinare la loro posizione, sono stati usati come standard tre campioni positivi,

uno per ogni specie, ed il DNA Ladder (100 pb) che identifica 13 bande di dimensioni da 100 a 2000 pb). La corsa è avvenuta ad una velocità di 100 V. Infine, abbiamo utilizzato il transilluminatore Gel Doc 1000 per visualizzare le diverse posizioni delle bande presenti sul gel dovute al diverso peso molecolare dei vari amplificati.

3 RISULTATI

4.1 PROVA SPERIMENTALE 1: STUDIO DELL'EFFICACIA DI COMPOSTI ECOSOSTENIBILI IN POSTRACCOLTA NEL CONTENIMENTO DELLA *MONILIOSI*

4.1.1 Diffusione marciume bruno su pesche in postraccolta: azienda 'Baronciani'

I rilievi in postraccolta hanno evidenziato una differente efficacia dei formulati testati nel contenimento della moniliosi. Dopo 3 giorni di shelf life la tesi trattata con il fungicida sintetico 'Scholar' ha evidenziato una diffusione della malattia significativamente più bassa rispetto al testimone e a tutti gli altri trattamenti testati. In particolare, se il trattamento con 'Scholar' ha mostrato una diffusione del 7,2%, gli altri trattamenti hanno mostrato una diffusione media variabile da 52,8% per le pesche trattate con 'Limocide', a base di oli essenziali di arancia dolce e 28,1% per le pesche trattate con 'Serenade Aso' a base di *B. subtilis* (Figura 13).

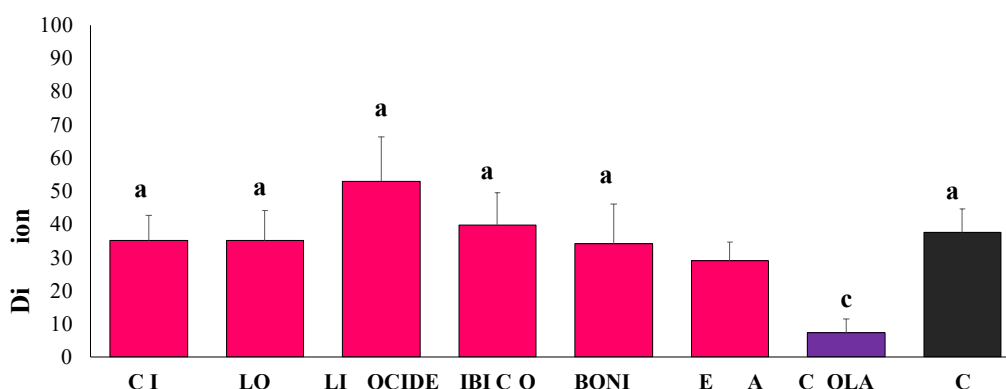


Figura 13 – Diffusione di marciume bruno dopo 3 giorni di shelf-life osservato su pesca, cultivar +5Tardibelle raccolte presso l'azienda 'Baronciani'. Il grafico rappresenta la media + SD di 4 ripetizioni, 50 pesche per ogni ripetizione (n = 4). Lettere differenti sopra alle colonne indicano dati statisticamente differenti (test di intervallo multipli, Tukey $P \leq 0.05$). CHI = 'Chitosano cloridrato'; BONI P. = 'Boni Protect'; SER. A.= 'Serenade Aso'; C = controllo non trattato.

Dopo 8 giorni di shelf life si sono osservate differenze tra i trattamenti alternativi al fungicida di sintesi, ‘Scholar’, risultato anche in questo caso il più efficace, ma non significativamente differenti al trattamento controllo. In dettaglio è emerso che la tesi trattata con ‘chitosano cloridrato’ ha mostrato una diffusione media pari a 60,9%, significativamente inferiore alle pesche tratte con ‘3Logy’, un mix di oli essenziali, ‘Limocide’, ‘Ibisco’, una miscela di chito-oligosaccaridi, e ‘Boni Protect’ a base di *A. pullulans*, che hanno mostrato una diffusione media superiore al 79,2%. Valori intermedi sono stati osservati per le pesche trattate con ‘Serenade Aso’ (Figura 14).

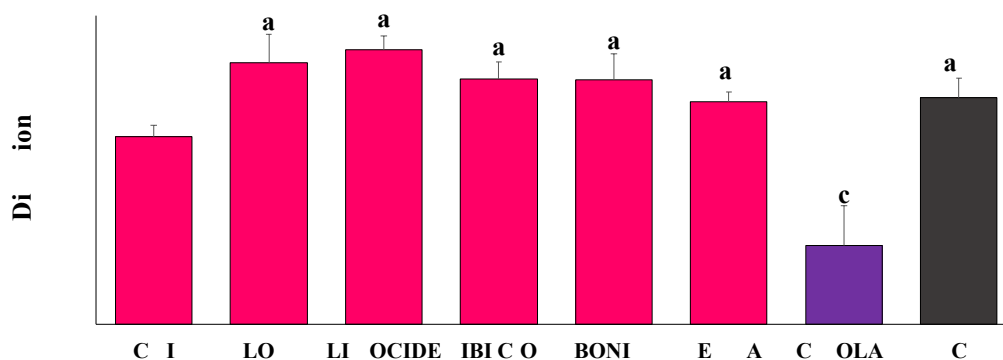


Figura 14 – Diffusione di marciume bruno dopo 8 giorni di shelf-life osservato su pesca, cultivar +5Tardibelle raccolte presso l’azienda ‘Baroncini’. Il grafico rappresenta la media + SD di 4 ripetizioni, 50 pesche per ogni ripetizione (n = 4). Lettere differenti sopra alle colonne indicano dati statisticamente differenti (test di intervallo multipli, Tukey $P \leq 0.05$). CHI = ‘Chitosano cloridrato’; BONI P. = ‘Boni Protect’; SER. A.= ‘Serenade Aso’; C = controllo non trattato.

4.1.2 Diffusione marciume bruno su pesche in postraccolta: azienda ‘Acciarri’

Durante i rilievi in postraccolta, per verificare l’efficacia di trattamenti alternativi ai fungicidi, sui campioni provenienti dall’azienda Acciarri la diffusione di marciume bruno su pesche non è stata differente tra i diversi trattamenti testati. Dopo 3 giorni di shelf-life non sono state trovate differenze significative tra i composti alternativi testati, mentre le pesche trattate con ‘Scholar’ non hanno mostrato presenza di malattia. Risultati simili si sono evidenziati nelle pesche osservate dopo 8 giorni di shelf life (Figura 15).

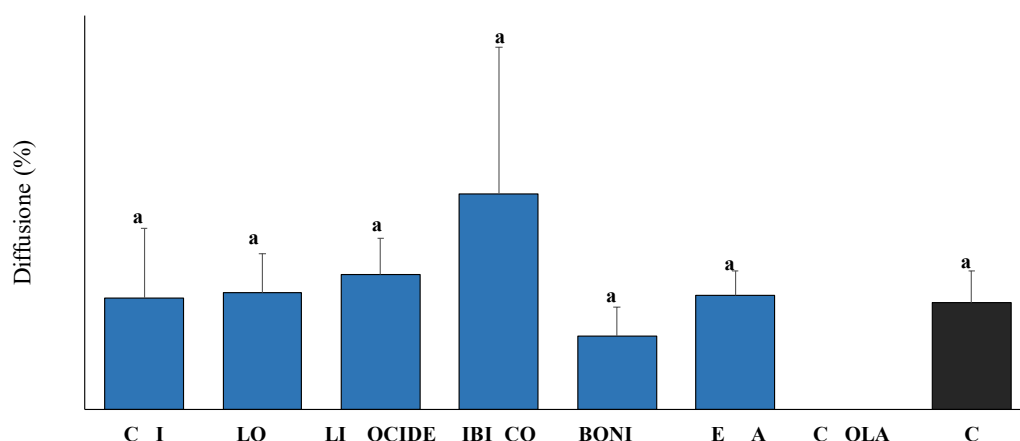


Figura 15 – Diffusione di marciume bruno dopo 8 giorni di shelf-life osservato su nettarina, cultivar 16/20 raccolte presso l’azienda ‘Acciarri’. Il grafico rappresenta la media + SD di 4 ripetizioni, 50 pesche per ogni ripetizione (n = 4). Lettere differenti sopra alle colonne indicano dati statisticamente differenti (test di intervallo multipli, Tukey $P \leq 0.05$). CHI = ‘Chitosano cloridrato’; BONI P. = ‘Boni Protect’; SER. A.= ‘Serenade Aso’; C = controllo non trattato.

4.2 PROVA SPERIMENTALE 2: IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DELLE SPECIE DI *MONILINIA* SPP. PRESENTI ALL’INTERNO DEL FRUTTETO

4.2.1 Isolamento dei patogeni fungini

Dalle pesche sane raccolte in campo e mantenute per giorni a temperatura ambiente sono stati selezionati 88 isolati fungini che, allevati *in vitro*, mostravano caratteristiche ascrivibili alle specie di *Monilinia*. L’identificazione molecolare è stata effettuata su 62 isolati.

4.2.2 Identificazione molecolare

L’indagine molecolare ha identificato la presenza delle tre specie principali agenti di moniliosi, *M. fructicola*, *M. fructigena*, e *M. laxa*, correlabili ad isolati con caratteristiche morfologiche precedentemente descritte. L’analisi PCR ha evidenziato per 44 isolati (70,9% del totale), un frammento di 535 pb relativo alla specie di *M. fructicola*, per 5 isolati (8,1%), un frammento di 402 pb relativo alla specie di *M. fructigena* e 13 isolati (20,9%) hanno amplificato per un frammento di 351 pb relativo alla specie di *M. laxa* (Figura 16; Tabella 6).

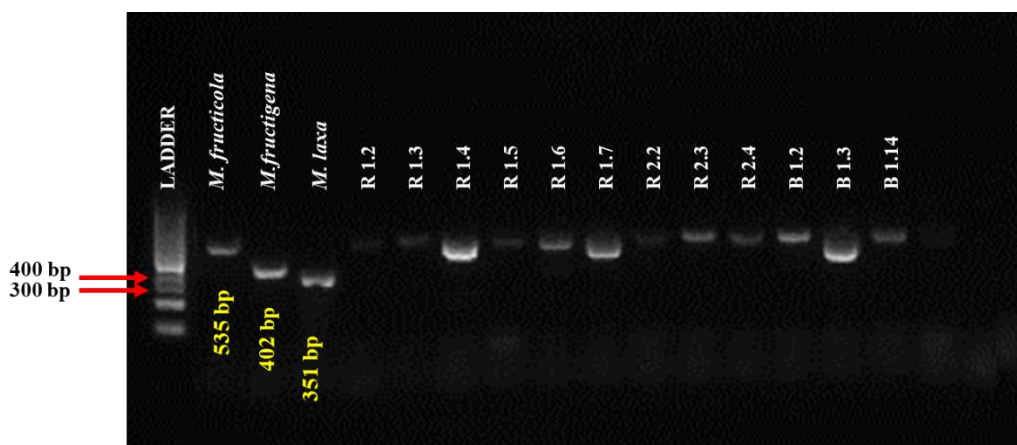


Figura 16 – Elettroforesi su gel di agarosio relativa all’amplificazione del DNA di alcuni isolati con PCR Multiplex e primers specifici alle specie *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa*. Ladder: 100 bp Plus Opti-DNA Marker.

Tabella 6 – Identificazione degli isolati di *Monilinia* spp. mediante analisi molecolare.

N.	ISOLATO	<i>M. fructicola</i>	<i>M. fructigena</i>	<i>M. laxa</i>
1	N. 1.1	-	+	-
2	N. 1.2	+	-	-
3	N. 1.3	-	-	+
4	N. 1.4	+	-	-
5	N. 1.5	+	-	-
6	N. 1.6	+	-	-
7	N. 1.7	+	-	-
8	N. 1.8	+	-	-
9	N. 1.9	+	-	-
10	N. 1.10	+	-	-
11	N. 1.11	+	-	-
12	N. 1.12	-	-	+
13	N. 1.13	+	-	-
14	N. 1.14	+	-	-
15	N. 2.1	+	-	-
16	N. 2.2	+	-	-
17	N. 2.3	+	-	-
18	N. 2.4	+	-	-
19	N. 2.5	+	-	-
20	R. 1.1	+	-	-
21	R. 1.2	+	-	-
22	R. 1.3	+	-	-
23	R. 1.4	+	-	-
24	R. 1.5	+	-	-

25	R. 1.6	+	-	-
26	R. 1.7	+	-	-
27	R. 2.1	-	-	+
28	R. 2.2	+	-	-
29	R. 2.3	+	-	-
30	R. 2.4	+	-	-
31	R. 2.5	+	-	-
32	B. 1.1	-	-	+
33	B. 1.2	+	-	-
34	B. 1.3	+	-	-
35	B. 1.5	-	-	+
36	B. 1.6	-	-	+
37	B. 1.7	-	-	+
38	B. 1.8	-	-	+
39	B. 1.9	+	-	-
40	B. 1.10	-	-	+
41	B. 1.11	+	-	-
42	B. 1.12	-	-	+
43	B. 1.13	-	-	+
44	B. 1.14	+	-	-
45	B. 1.15	+	-	-
46	B. 2.1	+	-	-
47	B. 2.2	+	-	-
48	B. 2.4	-	+	-
49	B. 2.5	-	-	+
50	B. 2.6	+	-	-
51	G. 1.2	-	-	+
52	G. 1.5	+	-	-
53	G. 1.6	+	-	-
54	G. 1.8	+	-	-
55	G. 2.1	+	-	-
56	G. 2.2	+	-	-
57	G. 2.3	-	+	-
58	V. 1.1	+	-	-
59	V. 1.4	+	-	-
60	V. 1.5	-	+	-
61	V. 1.6	-	+	-
62	V. 2.1	-+	-	-

NOTE: N= isolati provenienti da pesche trattate con ‘3logy’. R= isolati provenienti da pesche trattate con ‘Serenade Aso’. B= isolati provenienti da pesche trattate con ‘Prev-Am plus’. G= isolati provenienti da pesche trattate con ‘Chitosano’. V= isolati provenienti da pesche non trattate.

Sulla base dell'analisi molecolare effettuata, in relazione alla morfologia osservata, le colonie di *M. fructicola* presentavano margini interi e scarsa sporulazione (Figura 17), mentre quelle di *M. fructigena* presentavano degli anelli concentrici con margini interi (Figura 18).

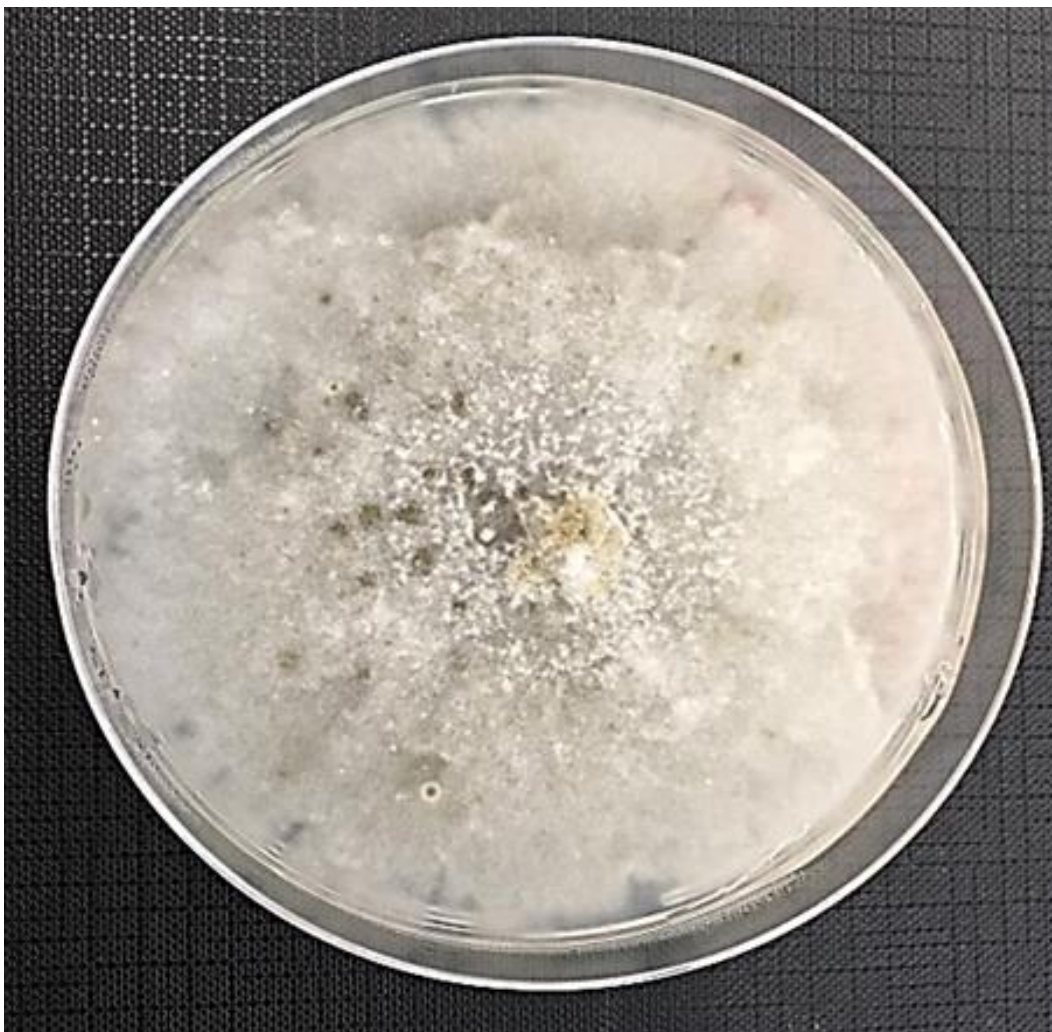


Figura 17 – Isolato 'G1.5' di *Monilinia fructicola* allevata su PDA a 25°C per 10 giorni.



Figura 18 – Isolato ‘B2.4’ di *Monilinia fructigena* allevata su PDA a 25°C per 10 giorni.

Gli isolati di *M. laxa* presentavano caratteristici margini lobati caratteristici della specie (Figura 19).

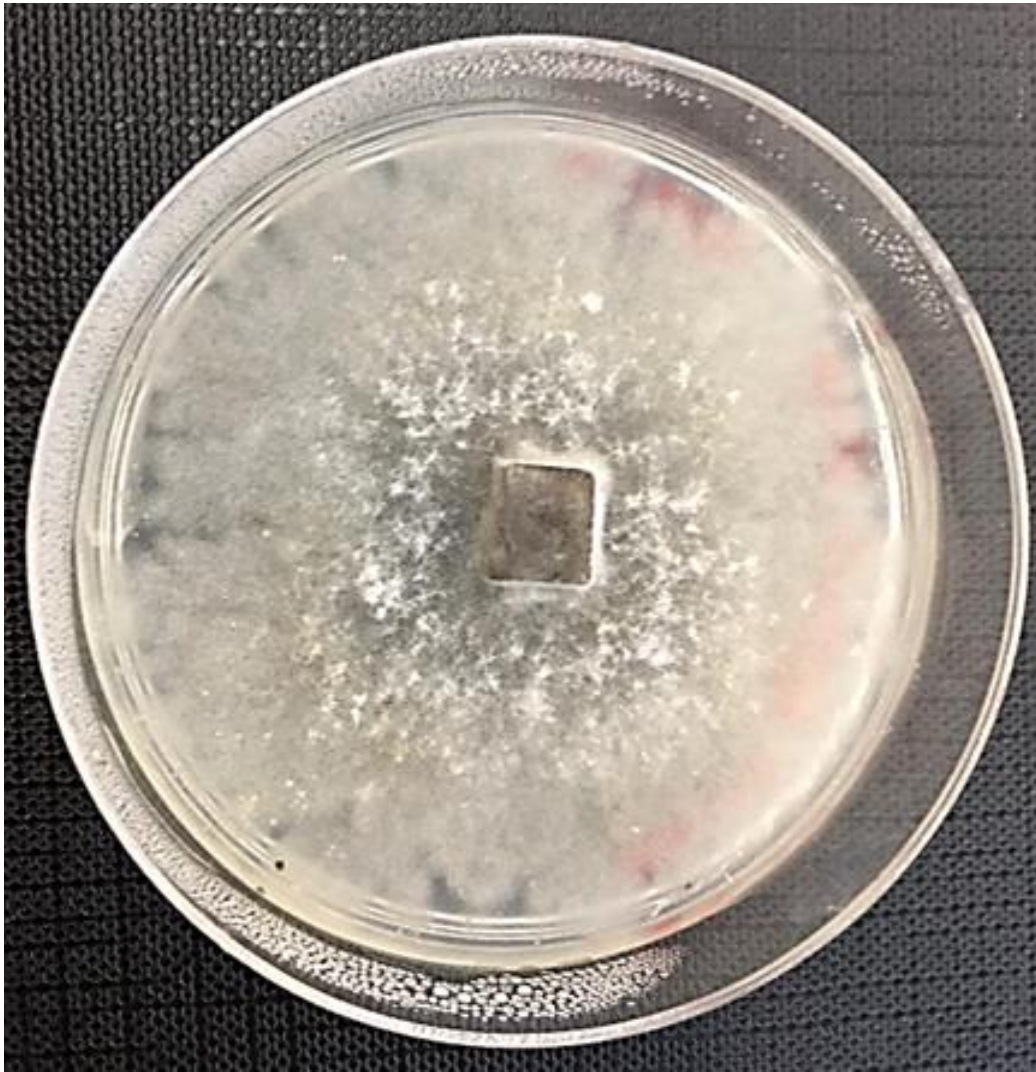


Figura 19 – Isolato ‘B2.5’ di *Monilinia laxa* allevata su PDA a 25°C per 10 giorni.

In merito alle specie di *Monilinia* identificate in relazione ai trattamenti effettuati, nelle pesche da piante trattate con ‘3Logy’, ‘Serenade Aso’ e ‘Chito-Plant’ la specie predominante è stata *M. fructicola* (70-90% degli isolati identificati), nelle pesche da piante trattate con ‘Prev-Am Plus’ si è rilevata una presenza importante di *M. laxa* al pari di *M. fructicola* (per entrambi il 47,3% degli isolati). La presenza di *M. fructigena* è ridotta o assente in relazione a tutti i trattamenti effettuati (Figura 20).

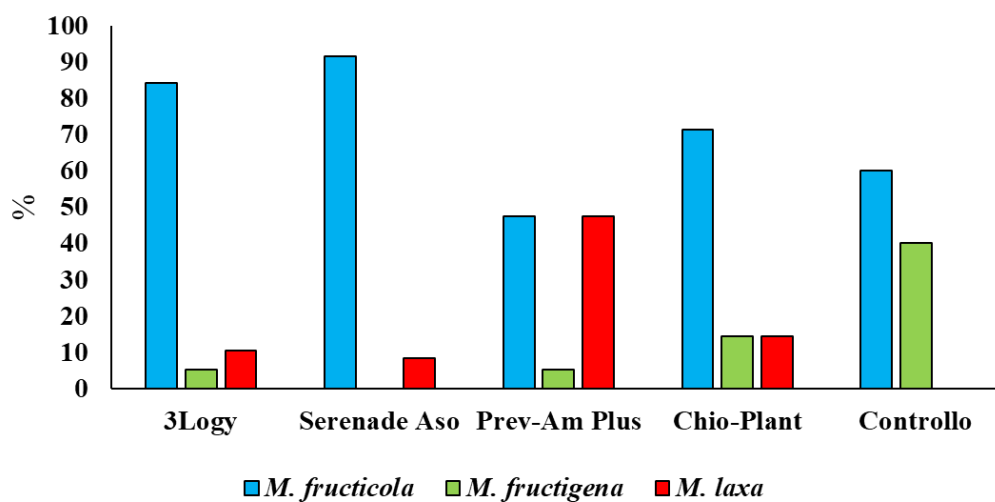


Figura 20 – Percentuale degli isolati di *Monilinia* spp. sviluppati e identificati mediante analisi molecolare, in relazione ai trattamenti effettuati in preraccolta.

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le perdite postraccolta interessano, a livello mondiale, più della metà della produzione di frutta e ortaggi. Il recupero di una porzione di queste potrebbe contribuire a limitare le crescenti richieste di cibo e gli sprechi di prodotti ortofrutticoli. Il marciume bruno, causato da *Monilinia* spp., ha importanza a livello mondiale e rappresenta la malattia più dannosa per le drupacee e le pomacee, causando significative perdite di produzione, sia in preraccolta e soprattutto in postraccolta. In campo questa malattia si è rivelata particolarmente grave tanto che in alcuni casi non si è proceduto neanche con la raccolta dei frutti (Holmes et al., 2011). Tre sono le specie di *Monilinia* più diffuse in tutto il mondo agenti principali di moniliosi, *M. laxa*, *M. fructicola* e *M. fructigena*. A queste si aggiunge *M. polystroma*, che attualmente interessa principalmente i paesi asiatici (Petróczy et al., 2012; Rungjindamai et al., 2014; Abate et al., 2018). Tutte queste causano sintomi di marciume bruno simili tipici sia sulle drupacee che sulle pomacee. Le diverse specie di *Monilinia* possono infettare i fiori con successiva cascola di boccioli e fiori, causare cancri nei tessuti legnosi e marciumi sui frutti. *M. fructigena* può infettare i frutti solo in presenza di lesioni, a differenza delle altre specie che possono provocare marciumi anche sui frutti sani, risultando meno aggressiva e provocando di conseguenza minori perdite di produzione (Rungjindamai et al., 2014). Attualmente non sono noti metodi di lotta efficaci per contrastare la malattia. Inoltre, il quasi completo divieto di utilizzo di fungicidi di sintesi in postraccolta ed una sempre più crescente sensibilità da parte dei consumatori nei confronti delle produzioni biologiche hanno spinto a ricercare delle alternative ai fungicidi di sintesi per una gestione sostenibile di questa malattia. A tale proposito, risultati incoraggianti relativi all'efficacia di prodotti alternativi nel contenimento delle fitopatie sono stati osservati sia in preraccolta che in postraccolta su un numero considerevole di specie (Shao et al., 2015; Feliziani et al 2015; Hosseini et al., 2020; Palou e Smilanick, 2020). Solo per fare qualche esempio, su arancio (Coqueiro et al., 2015), fragola (Landi et al., 2017) e papaya (Landi et al., 2021) sono stati ipotizzati indicazioni importanti in merito ai meccanismi che ne determinano l'efficacia. Questo lavoro di tesi, sviluppato nell'ambito del progetto PSR della Regione Marche "Prevenzione delle malattie postraccolta

delle drupacee per la riduzione degli sprechi di ortofrutticoli freschi (ZeroSprechi)”, i cui dettagli sono disponibili alla pagina www.zerosprechi.info, si è proposto di valutare l’efficacia di una serie di composti alternativi, mettendoli a confronto con un fungicida di sintesi, nel controllo di *Monilinia* spp. in postraccolta. Strategie basate sull’uso di sostanze di base approvati a livello comunitario come il chitosano (Rajestary et al., 2021) su organismi antagonisti od estratti come gli oli essenziali (Sivakumar e Bautista-Baños, 2014; Sivakumar e Romanazzi, 2019), possono rappresentare un valido mezzo per il controllo del marciume bruno e per il prolungamento della shelf life.

Questo lavoro di tesi si è sviluppato seguendo due tematiche che hanno coinvolto pesche e nettarine, le drupacee maggiormente coltivate nella regione marche. In una prima prova sperimentale abbiamo effettuato un’indagine atta a verificare lo sviluppo del marciume bruno causato da *Monilinia* spp. in postraccolta in seguito a trattamenti effettuati in pesche e nettarine in due aziende differenti, una delle quali a conduzione biologica, l’altra con sistemi di lotta integrata. I risultati osservati su pesco, cultivar +5 Tardibelle proveniente dall’azienda ‘Baronciani’ a conduzione biologica, pur non evidenziando una significativa e costante riduzione della malattia, esercitata dai formulati testati in postraccolta, rispetto al controllo o al fungicida di sintesi, tuttavia ha mostrato differenze di efficacia significative tra i diversi prodotti utilizzati. Una differenza significativa è stata osservata tra la tesi trattata con olio essenziale di arancio (Limocide) e quella con *B. subtilis* (Serenade Aso) suggerendo una maggiore efficacia di quest’ultimo sul controllo della malattia. Le altre tesi mostrano una efficacia intermedia non significativa. Dopo 8 giorni di shelf life, il formulato a base di chitosano ha evidenziato una maggiore efficacia rispetto agli altri formulati testati. La prova in postraccolta effettuata su nettarine della cultivar 16/20 allevate in regime di lotta integrata presso l’azienda ‘Acciarri’ non ha evidenziato riduzioni della malattia in relazione ai trattamenti alternativi testati. Mediamente la percentuale di frutti infetti individuati durante i rilievi è stata più elevata nella prova effettuata con i frutti prelevati dall’azienda ‘Baronciani’. Questo dato potrebbe suggerire una quantità di inoculo iniziale maggiore rispetto alla seconda prova, probabilmente associata alla tipologia di conduzione

dell'azienda che, essendo in regime di agricoltura biologica, non utilizza prodotti chimici per il controllo delle malattie.

Un aspetto che può contribuire alla gestione differenziale della produzione è rappresentato dalle infezioni latenti. Per controllare le infezioni da marciume bruno in postraccolta, è auspicabile una bassa dose di inoculo al momento della raccolta e questa può avvenire attraverso una buona gestione del frutteto che prevedano pratiche colturali che non causino stress alla pianta, non creino situazioni di ristagno idrico ed effettuando trattamenti fitosanitari se si sono venute a creare condizioni favorevoli per lo sviluppo del patogeno. L'applicazione di trattamenti con prodotti alternativi ai fungicidi di sintesi richiede un'attenta valutazione della migliore strategia e dose di applicazione, non potendo semplicemente sostituire un prodotto chimico di sintesi con uno alternativo. Inoltre, alcune fra le alternative a basso impatto ambientale come il chitosano, non hanno intervallo di sicurezza e limite massimo di residuo; quindi, si potrebbero applicare anche in quantità maggiori e variando la presenza di coformulanti che influenzano l'efficacia delle sostanze attive.

Di fondamentale importanza è la conoscenza della presenza della popolazione fungina presente in campo che può manifestarsi in postraccolta. Identificarne le specie potrebbe permettere di sviluppare una efficace strategia difensiva e migliorare l'efficacia dei metodi di lotta applicati, andando ad intervenire in maniera più mirata nel frutteto.

In questo contesto si è sviluppata la seconda prova sperimentale che ha riguardato l'identificazione delle specie di *Monilinia* sviluppate in postraccolta da pesche sane raccolte presso l'azienda 'Baronciani'. L'indagine ha evidenziato una maggiore diffusione della specie *M. fructicola* rispetto a *M. laxa* e *M. fructigena*. Questo risultato è in accordo con quanto osservato in altre regioni Italiane ed Europee che evidenziano una importante diffusione di *M. fructicola*, la cui presenza nei frutteti della regione marche era stata segnalata negli ultimi anni (Landi et al., 2016), ma che ora sta prendendo il sopravvento rispetto a *M. laxa*, quest'ultima per decenni la specie più diffusa in Europa. La diffusione di *M. fructicola* potrebbe essere associata a diversi fattori principalmente ambientali, come la maggior fitness in climi caldi e secchi, che potrebbero aver dato un vantaggio a questa specie negli ultimi anni dove abbiamo assistito ad un

progressivo aumento delle temperature e ad estati particolarmente calde e secche. Chiaramente questo potrebbe aver trovato impreparato l'ospite che ha dovuto fare i conti con una specie fungina a lui ignota. A supporto l'osservazione di una maggiore sporulazione e virulenza di *M. fructicola* potrebbe trovare una spiegazione della maggiore diffusione sulle drupacee (Abate et al., 2018). Inoltre, *M. fructicola* ha un periodo di incubazione e latenza più basso sui frutti in postraccolta e, in condizioni favorevoli, questo agente patogeno può causare perdite fino al 90% (Villarino et al., 2016). Come era da attendersi, *M. fructigena* è presente in quantità più basse in quanto colpisce prevalentemente le pomacee, mentre *M. laxa* è stata rilevata come specie a presenza intermedia. A cinque anni dalla sua introduzione, in Spagna *M. fructicola* coesiste con *M. laxa* ed ha sopraffatto *M. fructigena*. Un cambiamento di specie in una determinata area può causare un cambiamento nel comportamento della malattia (Angeli et al., 2017), e pertanto necessita di un cambiamento delle strategie fitosanitarie per controllare efficacemente la minaccia.

Le conclusioni di questo lavoro sottolineano che è necessaria una più stretta collaborazione tra gli agricoltori e gli enti che si occupano di diagnostica e di ricerca in campo fitopatologico per poter sviluppare efficaci e specifiche strategie di difesa basate sull'identificazione di specie in campo. Le nuove ricerche che hanno portato all'individuazione delle caratteristiche genomiche delle principali specie di *Monilinia* quali *M. fructigena* (Landi et al., 2018), *M. fructicola* (De Miccolis Angelini et al., 2019) e *M. laxa* (Landi et al., 2019) non potranno che fornire ulteriori elementi per l'individuazione di strategie innovative per il controllo delle infezioni latenti suggerendo strategie di lotta sostenibili ed efficaci. Si contribuirà in questo modo ad una gestione accurata e sostenibile del marciume bruno in preraccolta e postraccolta, con benefici per i frutticoltori e la riduzione di sprechi di prodotti alimentari.

5 BIBLIOGRAFIA

- Abate, D., Pastore, C., Gerin, D., De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Pollastro, S., Faretra, F. 2018. Characterization of *Monilinia* spp. on stone fruit in South Italy. *Plant Disease* 102:1708-1717.
- Adaskaveg, J., Förster, H., Gubler, W., Teviotdale, B. Thompson, D. 2005. Reduced-risk fungicides help manage brown rot and other fungal diseases of stone fruit. *California Agriculture* 59:109-114.
- Adaskaveg, J. E., Förster, H. Thompson, D. F. 2000. Identification and etiology of visible quiescent infections of *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea* in sweet cherry fruit. *Plant Disease* 84:328-333.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant pathology*. Academic Press 1-952.
- Amiri, A., Scherm, H., Brannen, P. M., Schnabel, G. 2008. Laboratory evaluation of three rapid, agar-based assays to assess fungicide sensitivity in *Monilinia fructicola*. *Plant Disease* 92: 415-420.
- Angeli, S. S., Mio, L. L. M. D., Amorim, L. 2017. Comparative analysis of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolates from Brazil: monocyclic components of peach brown rot. *Ciência Rural* 47, e20160300.
- Anonimo 2004. *Monilinia fructigena* (brown rot). *Crop protection compendium*. CAB International, Wallingford, UK.
- Balaž, J. 2000. *Monilia* spp. kao parazit voćaka. *Biljni Lekar* 2-3:155-162.
- Biggs, A. R. Northover, J. 1988. Influence of temperature and wetness duration on infection of peach and sweet cherry fruits by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* 78:1352-1356.
- Byrde, R. J. W., Willetts, H. J. 1977. *The brown rot fungi of fruit. Their biology and control*. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Casals, C., Elmer, P. A. G., Vinas, I., Teixido, N., Sisquella, M., Usall, J. 2012. The combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 to control brown rot on infections caused by *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biology and Technology* 64:126-132.
- Casals, C., Teixido N., Vinas, I., Lamarca, N., Usall, J. 2010. Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *European Journal of Plant Pathology* 128:51-63.

- Coqueiro, D. S., De Souza, A. A., Takita, M. A., Rodrigues, C. M., Kishi, L. T., Machado, M. A. 2015. Transcriptional profile of sweet orange in response to chitosan and salicylic acid. *BMC Genomics* 16:288.
- Corbin, J. B., Cruickshank, I. A. M. 1963. Environment and sporulation in phytopathogenic fungi. V. *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey: Effect of water relations on regeneration of spores in vivo. *Australian Journal of Biological Sciences* 16:99-110.
- Côté, M., Tardif, F., Meldrum, A. 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease* 88:1219-1225.
- Cox, K. D., Villani, S. M., Poniatowska, A., Schnabel, G., Holb, I., Fajardo, J. 2018. Recovery plan for *Monilinia polystroma* causing Asiatic brown rot of stone fruit. *Plant Health Progress* 19:107-124.
- De Cal, A., Larena, I., Guijarro, B., Melgarejo, P. 2002. Mass production of conidia of *Penicillium frequentans*, a biocontrol agent against brown rot of stone fruits. *Biocontrol Science and Technology* 12:715–725.
- De Cal, A., Melgarejo, P. 1999. Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. *Plant Disease* 83:62-65.
- De Corato, U., Maccioni, O., Trupo, M., Di Sanzo, G. 2010. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against postharvest spoilage fungi. *Crop Protection* 29:142–147.
- De Miccolis, Angelini, R. M., Romanazzi, G., Pollastro, S., Rotolo, C., Faretra, F., Landi, L. 2019. New high-quality draft genome of the brown rot fungal pathogen *Monilinia fructicola*. *Genome Biology and Evolution* 11:2850-2855.
- Di Francesco, A., Mari, M. 2018. *Monilinia* species of fruit decay: a comparison between biological and epidemiological data. *Italian Journal of Mycology* 47:13-23.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH) 2011. Pest risk assessment of *Monilinia fructicola* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal* 9:155.

- Elmer, P. A. G., Spiers, T. M., Wood, P. N. 2007. Effects of preharvest foliar calcium sprays on fruit calcium levels and brown rot of peaches. *Crop Protection* 26:11-18.
- Emery, K. M., Michailides, T. J. Scherm, H. 2000. Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia. *Plant Disease* 84:853-857.
- Feliziani, E., Santini, M., Landi, L., Romanazzi, G. 2013. Pre and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology* 78:133–138.
- Feliziani, E., Landi, L., Romanazzi, G. 2015. Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. *Carbohydrate Polymers* 132:111– 117.
- Gregori, R., Borsetti, F., Neri, F., Mari, M., Bertolini, P. 2008. Effects of potassium sorbate on postharvest brown rot of stone fruit. *Journal of Food Protection* 71:1626-1631.
- Helmerhorst, E. J., Robert, F. Troxler, Frank, G. O. 2001. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *PNAS* 98:14637-14642.
- Holb, I. J. 2005. Effect of fungicide treatments and sanitation practices on brown rot blossom blight incidence, phytotoxicity, and yield for organic sour cherry production. *Plant Disease* 11:1164-1170.
- Holb, I. J. 2006. Possibilities of brown rot management in organic stone fruit production in Hungary. *International Journal of Horticultural Science* 12:87-91.
- Holb, I. J. 2008a. Brown rot blossom blight of pome and stone fruits: symptom, disease cycle, host resistance, and biological control. *International Journal of Horticultural Science* 14:15-21.
- Holb, I. J. 2008b. Monitoring conidial density of *Monilinia fructigena* in the air in relation to brown rot development in integrated and organic apple orchards. *European Journal of Plant Pathology* 120:397-408.
- Holmes, R., Kreidl, S., Villalta, O., Gouk, C. 2011. Through chain approach for managing brown rot in summerfruit and canning fruit. Project code MT08039. Biosciences Research Division, Department of Primary Industries, Victoria, Australia 1:76.

- Hong, C., Holtz, B. A., Morgan, D. P., Michailides, T. J. 1997. Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. *Plant Disease* 81:519-524.
- Hossain, M. S., Hossain, M. A., Williams, D. G. Chandra, S. 2013. Management of *Carpophilus* spp. beetles (Nitidulidae) in stone fruit orchards by reducing the number of attract-and-kill traps in neighbouring areas. *International Journal of Pest Management* 59:135-140.
- Hosseini, S., Amini, J., Saba, M. K., Karimi, K. Pertot, I. 2020. Preharvest and postharvest application of garlic and rosemary essential oils for controlling anthracnose and quality assessment of strawberry fruit during cold storage. *Frontiers in Microbiology* 11:1855.
- Hrustić, J., Mihajlović, M., Grahovac, M., Delibašić, G., Bulajić, A., Krstić, B., Tanović, B. 2012. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species. *Pesticidi i Fitomedicina* 27:283-297.
- Hrustić, J., Tanović, B., Grahovac, M., Mihajlović, M., Delibašić, G., Vukša, P. 2011. *In vitro in vivo* efekat etarskog ulja timijana na *Monilinia fructigena*. *Zbornik rezimea radova XI savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibo* 36:37.
- Kalbasi, A.A. 2004. Effects of postharvest pre-cooling processes and cyclical heat treatment on the physicochemical properties of "Red haven" peaches and "Shahmiveh" pears during cold storage. *Agricultural Engineering International, Manuscript FP 04 003*.
- Keane, P., Kerr, A. 1997. Factors affecting disease development. In: *Plant Pathogens and Plant Diseases* 287:298.
- Kišpatić J., Maceljčki M. 1989. *Zaštita voćaka od bolesti, štetnika i korova*. Zagreb: Znanje.
- Lack, K.J. 1989. The spread of apple brown rot (*Monilinia fructigena*) by insects. *Annals of Applied Biology* 115:221-227.
- Landi, L., Feliziani, E., Romanazzi, G. 2016. Surveys for *Monilinia* spp. on stone fruit in central-eastern Italy. *Acta Horticulturae* 1144:225-230.
- Landi, L., De Miccolis, Angelini, R. M., Pollastro, S., Feliziani, E., Faretra, F., Romanazzi G. 2017. Global transcriptome analysis and identification of differentially expressed genes in strawberry after preharvest application of benzothiadiazole and chitosan. *Frontiers in Plant Science* 02/2017, 8:235-1658.

- Landi, L., De Miccolis, Angelini, R. M., Pollastro, S., Abate, D., Faretra, F., Romanazzi G. 2018. Genome sequence of the brown rot fungal pathogen *Monilinia fructigena*. BMC Research Notes 11:758.
- Landi, L., Pollastro, S., Rotolo, C., Romanazzi, G., Faretra, F., De Miccolis Angelini, R. M. 2020. Draft genomic resources for the brown rot fungal pathogen *Monilinia laxa*. Molecular Plant-Microbe Interactions 33:145-148.
- Landi, L., Peralta-Ruiz, Y., Chaves-López, C., Romanazzi, G. 2021. Chitosan coating enriched with *Ruta graveolens* L. essential oil reduces postharvest anthracnose of papaya (*Carica papaya* L.) and modulates defense-related gene expression. Frontiers in Plant Science 12:765806.
- Larena, I., De Cal, A., Melgarejo, P. 2004. Solid substrate production of *Epicoccum nigrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits. International Journal of Food Microbiology 94:161–167.
- Larena, I., Torres, R., Cal, D. A., Linan, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J. F., Lichou, J., Ochoa de Eribe, X., Usall, J. 2005. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. Biological Control 32:305– 310.
- Liberato, J.R., Miles, A.K. 2006. Brown rot of stone fruit (*Monilinia* spp.).
- Lopez-Reyes, J. G., Spadaro, D., Prella, A., Garibaldi, A., Gullino, M. L. 2013. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. Journal of Food Protection 76:631–639.
- Luo, Y., Morgan, D. P., Michailides, T. J. 2001. Risk analysis of brown rot blossom blight of prune caused by *Monilinia fructicola*. Phytopathology 91:759-768.
- Ma, Z., Yang, L., Yan, H., Kennedy, J. F., Meng, X. 2013. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. Carbohydrate Polymers 94:272-277.
- Mamoci, E., Cavoski, I., Simeone, V., Mondelli, D., Al-Bitar, L., Caboni, P. 2011. Chemical composition and in vitro activity of plant extracts from *Ferula communis* and *Dittrichia viscosa* against postharvest fungi. Molecules 16:2609–2625.
- Margosan, D. A., Smilanick, J. L., Simmons, G. F., Hedson, D. J. 1997. Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. Plant Disease 81:1405-1409.

- Mari, M., Cembali, T., Baraldi, E., Casalini L. 1999. Peracetic acid and chlorine dioxide for postharvest control of *Monilinia laxa* in stone fruits. *Plant Disease* 83:773-776.
- Mari, M., Torres, R., Casalini, L., Lamarca, N., Mandrin, J. F., Lichou, J., Larena, I., De Cal, M. A., Melgarejo, P., Usall, J. 2007. Control of postharvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1271–1277.
- Marquenie, D., Michiels, C. W., Geeraerd, A. H., Schenk, A., Soontjen, C., Van Impe, J. F., Nicolai, B. M. 2002. Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *International Journal of Food Microbiology* 73:187-196.
- Martini, C., Lantos, A., Di Francesco, A., Guidarelli, M., D'Aquino, S., Baraldi, E. 2014. First report of Asiatic brown rot caused by *Monilinia polystroma* on peach in Italy. *Plant Disease* 98:1585.
- Martini, C., Mari M. 2016. *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (*Monilinia* Rot, Brown Rot). CRIOF, DipSA, University of Bologna 233:257.
- Martini, C., Mari, M. 2014. *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (*Monilinia* rot, brown rot). In: Bautista-Baños S (Ed.), *Postharvest Decay*. Academic Press 233:265.
- Martini, C., Spadoni, A., Mari, M. 2013. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on apple in Italy. *Plant Disease* 97:689.
- Melgarejo, P., Carrillo, R., M-Sagasta, E. 1985. Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. *Transaction for the British Mycological Society* 85:313-317.
- Norton, J. B. S., Ezekiel, W. N., Jehle, R. A. 1923. Fruit-rotting Sclerotinias I. Apothecia of the brown-rot fungus. *Maryland Agricultural Experimental Station Bulletin* 256:1-32.
- Obi, V., Barriuso, J., Gogorcena, Y. 2018. Peach brown rot: still in search of an ideal management option. *Agriculture* 8:125.
- Ogawa J. M., English H. 1991. *Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources Pub. 3345.

- Palou, L., Crisosto, C. H., Smilanick, J. L. 2012. Evaluation of food additives and low toxicity compounds as nonpolluting means to control the main postharvest diseases of California peaches. *Acta Horticulturae* 962:539-548.
- Pellegrino, C., Gullino, M. L., Garibaldi, A., Spadaro, D. 2009. First report of brown rot of stone fruit caused by *Monilinia fructicola* in Italy. *Plant Disease* 93:668.
- Petróczy, M., Szigethy, A., Palkovics L. 2012. *Monilinia* species in Hungary: morphology, culture characteristics, and molecular analysis. *Trees* 26:153-164.
- Poniatowska, A., Michalecka, M. 2013. Characteristics of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology* 135:855–865.
- Poniatowska, A., Michalecka, M., Puławska, J. 2016. Genetic diversity and pathogenicity of *Monilinia polystroma* - The new pathogen of cherries. *Plant Pathology* 65:723-733.
- Psota, V., Bagar, M., Ackermann, P. Veselovský, M. 2013. Control of brown rot blossom blight (*Monilinia laxa*) on apricot in organic agriculture. *IOBC-WPRS Bulletin* 91:357-360.
- Rajestary, R., Landi, L., Romanazzi, G. 2021. Chitosan and postharvest decay of fresh fruit: meta-analysis of disease control and antimicrobial and eliciting activities. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety* 20:563–582
- Ritchie, D. F. 2000. Brown rot of stone fruits. *The Plant Health Instructor*.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A. 2003. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology* 29:73-80.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Sivakumar D. 2018. Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Frontiers in Microbiology* 9:2745.
- Rungjindamai, N., Jeffries, P., Xu, X. M. 2014. Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*. *European Journal of Plant Pathology* 140:1-17.
- Schnabel, G., Bryson, P. K., Bridges, W. C., Brannen, P. M. 2004. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole in Georgia and implications for disease management. *Plant Disease* 88:1000-1004.

- Shao, X., Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D., Wang, H. 2015. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest Biology and Technology*, 99:37–43.
- 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.
- Sisquella, M., Casals, C., Picouetc, P., Vinas, I., Torres, R., Usall, J. 2013. Immersion of fruit water to improve radio frequency treatment to control brown rot in stone fruit. *Postharvest Biology and Technology* 80:31-36.
- Sivakumar, D., Bautista-Baños, S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection* 64:27–37.
- Sivakumar, D., Romanazzi, G. 2019. Essential oils improve postharvest quality and control postharvest decay of tropical, subtropical and temperate fruits. In: Palou L., Smilanick J. L., Eds, *Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce*. CRC PRESS, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, us 659:676.
- Smilanick, J. L., Margosan D. M., Mlikota Gabler F. 2002. Impact of ozonated water on the quality and shelf-life of fresh citrus fruit, stone fruit, and table grapes. *Ozone: Science and Engineering* 24:343-356.
- Spadoni, A., Neri, F., Bertolini, P., Mari, M. 2013. Control of *Monilinia* rots on fruit naturally infected by hot water treatment in commercial trials. *Postharvest Biology and Technology* 86:280-284.
- Tanović, B., Delibašić, G., Hrustić, J. 2009. In vitro effect of essential oils from some aromatic and medicinal plants on apple fruit pathogens. *Book of Abstracts VI Congress of Plant Protection with Symposium about Biological Control of Invasive Species, Zlatibor* 1:37.
- Tanović, B., Hrustić, J., Delibašić, G. 2010. Toxicity of volatile phase of essential oils from aromatic and medicinal plants to apple fruit pathogens in vitro. *Book of Abstracts of 28th International Horticultural Congress, Lisboa, Portugal* 17.
- Tomlin C. 2009. *The Pesticide manual*. British Crop Protection Council, Farnham.
- Trkulja, V. 1996. Vrste roda *Monilia* – Paraziti breskve i mogućnosti njihovog suzbijanja. *Biljni lekar* 3:531-539.

- Van Leeuwen, G. C. M., Baayen, R. P., Holb, I. J., Jeger, M. J. 2002. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycological Research* 106:444-451.
- Van Leeuwen, G.C.M., van Kesteren, H.A. 1998. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Canadian Journal of Botany* 76:2042-2050.
- Villarino, M., Melgarejo, P., De Cal, A. 2016. Growth and aggressiveness factors affecting *Monilinia* spp. survival peaches. *International Journal of Food Microbiology* 227:6-12.
- Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., De Cal, A. 2010. Primary inoculum sources of *Monilinia* spp. in Spanish peach orchards and their relative importance in brown rot. *Plant Disease* 94:1048-1054.
- Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., Lamarca, N., De Cal, A. 2012. Secondary inoculum dynamics of *Monilinia* spp. and relationship to the incidence of postharvest brown rot in peaches and the weather conditions during the growing season. *European Journal of Plant Pathology* 133:585-598.
- Willetts, H. J., Bullock, S. 1993. Cytology, histology and histochemistry of fruit infection by *Monilinia* species. In A. R. Biggs (Ed.), *Handbook of cytology, histology and histochemistry of fruit tree diseases*, pp. 113:136. Boca Raton: CRC.
- Willetts, H. J. Harada, Y. 1984. A review of apothecial production by *Monilinia* fungi in Japan. *Mycologia* 76:314-325.
- Wilson, C. L., El Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Y Lu, J., Khan, V., Arul, J. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease* 78:837-844.
- Wilson, E. E., Ogawa, J. M. 1979. *Fungal, bacterial and certain non-parasitic diseases of fruit and nut crops in California*. Californian Agricultural Science Publications, Berkeley, California, USA.
- Xu, X. M., Guerin, L., Robinson, J. D. 2001. Effects of temperature and relative humidity on conidial germination and viability, colonization and sporulation of *Monilinia fructigena*. *Plant Pathology* 50:569-578.

- Yang, L. Y., Zhang, J. L., Bassett, C. L., Meng, X. H. 2012. Difference between chitosan and oligochitosan in growth of *Monilinia fructicola* and control of brown rot in peach fruit. *LWT – Food Science and Technology* 46:254–259.
- Zehr, E. I., Luszcz, L. A., Olien, W. C., Newall, W. C., Toler, J. E. 1999. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole following prolonged exposure in peach orchards. *Plant Disease* 83:913-916.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M. L. 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control* 54:172–180.