



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

**ESPRESSIONE DI GENI LEGATI AI MECCANISMI  
DI RESISTENZA IN PESCHE SOTTOPOSTE A  
TRATTAMENTI CON OZONO PER IL  
CONTENIMENTO DELLA MONILIOSI IN  
POSTRACCOLTA**

**GENE EXPRESSION RELATED TO RESISTANCE  
MECHANISMS IN PEACHES TREATED WITH OZONE TO  
CONTAIN POSTHARVEST BROWN ROT**

TIPO TESI: sperimentale

Studente:  
SIMONE PIANCATELLI

Relatore:  
PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

Correlatore:  
DOTT. SSA LUCIA LANDI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

## *Indice*

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 IL PESCO</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1.1 I frutti e la filiera postraccolta</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.2 Principali avversità dei frutti</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 LA MONILIOSI DELLE DRUPACEE</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2.1 Sintomatologia</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.2 Ciclo biologico ed epidemiologia</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3 I MEZZI DI CONTROLLO FISICI IN POSTRACCOLTA</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 L’OZONO</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4.1 Meccanismi d’azione</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4.2 Possibili applicazioni in postraccolta</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5 LA PCR REAL TIME: LA TECNOLOGIA SYBR GREEN</b> .....	<b>24</b>
<b>2 OBIETTIVI DELLA RICERCA</b> .....	<b>27</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 MATERIALE VEGETALE</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2 TRATTAMENTO DEI FRUTTI DOPO LA RACCOLTA</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3 ANALISI DELL’ESPRESSIONE GENICA</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4 ESTRAZIONE DELL’RNA</b> .....	<b>31</b>
<b>3.5 GENERAZIONE DEL CDNA MEDIANTE TRASCRIPTASI INVERSA</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6 PCR QUANTITATIVA REAL TIME</b> .....	<b>32</b>
<b>3.7 VALIDAZIONE DEI GENI REFERENTI</b> .....	<b>33</b>
<b>3.8 ANALISI DEI DATI</b> .....	<b>33</b>
<b>4 RISULTATI</b> .....	<b>34</b>

<b>4.1 VALIDAZIONE DEI PRIMERS .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 VALIDAZIONE DEI GENI REFERENTI.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 ESPRESSIONE GENICA.....</b>	<b>38</b>
<b>5 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI .....</b>	<b>49</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>55</b>
<b>7 RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>70</b>

## RIASSUNTO

Le perdite della frutta in postraccolta sono dovute principalmente alle infezioni fungine, generalmente controllate utilizzando mezzi chimici. La ricerca di nuove tecnologie che garantiscano sicurezza e qualità dei prodotti è una sfida sempre crescente. In questo contesto, l'ozono presenta una serie di caratteristiche che lo rendono adatto ai trattamenti sugli alimenti, ma i meccanismi molecolari che attiva su frutti in postraccolta non sono ancora del tutto noti. In questa tesi, sviluppata nell'ambito del progetto PSR ZeroSprechi, è stato messo a punto un protocollo per l'analisi di espressione genica su pesco, cultivar "Extreme 486". Da pesche sottoposte ad ozonoterapia per 25 giorni a 0°C e dai controlli non trattati è stato estratto ed analizzato l'RNA dopo 0, 24, 48, 72, 96, e 168 ore di shelf life, utilizzando la tecnologia PCR quantitativa Real Time (RT-qPCR) e un metodo di analisi comparativa  $-\Delta\Delta Cq$ . Sono stati testati 10 geni target coinvolti sia nella maturazione e senescenza dei frutti che nei meccanismi di difesa della pianta. Dopo un periodo iniziale (24-96 ore dal trattamento) di riduzione dell'espressione dei geni codificanti per la *poligalatturonasi* e per il recettore *ETR1* dell'etilene, a 168 ore l'espressione di questi geni aumenta rispetto al controllo. A 168 ore altri geni incrementano la loro espressione come il *glutathione S-transferasi*, il gene *Heat Shock Protein 90* e il gene allergene *Pru av 1*. Altri geni, coinvolti nei meccanismi di difesa della pianta come i geni *binding 2* per l'acido salicilico e l'*antocianidina 3-O-glucosiltransferasi (3'GT)*, sono sovraespressi a 0 - 48 ore dal trattamento, mentre il recettore *FLS2 - LRR serina/treonina-chinasi* e *taumatina (PR-5)*, non sono influenzati dall'ozono. Questo studio rappresenta un primo approccio utile per comprendere i meccanismi d'azione dell'ozono, il cui ruolo nel contenimento dei marciumi in postraccolta può diventare importante nel prossimo futuro.

## ABSTRACT

### *Gene expression related to resistance mechanisms in peaches treated with ozone to contain postharvest brown rot*

Postharvest losses of fruit and vegetables are mainly due to fungal diseases that can occur during storage and at consumer's home. The search for new technologies that assure safety and quality of the products is an ever-growing challenge. In this context, ozone has emerged, presenting a set of characteristics that makes it highly suitable for treatments on food. However new studies are required to understand the molecular mechanisms involved on postharvest ozone treatment. This study, developed within the PSR project "ZeroSprechi", is focused on ozone applications with the development of a protocol to analyze gene expression with quantitative PCR technology (RT-qPCR), using a comparative method ( $-\Delta\Delta Cq$ ). The trial was carried out on peaches (cultivar Extreme 486) comparing RNA of fruits refrigerated and exposed to ozone with RNA of fruits only refrigerated. After 25 days of storage in these two conditions, samples were collected after 0, 24, 48, 72, 96 and 168 hours shelf life. Ten target genes involved in ripening or in plant defense mechanisms were evaluated. After 24-96 hours from treatment, reduction in gene expression for *polygalacturonase* and for *ETR1* receptor of ethylene was observed, while after 168 hours the expression of these genes increase compared to the control. After the same time other genes were up-regulated, such as *Heat Shock Protein* (HSP), *glutathione S-transferase* and a gene related to the allergen *Pru av 1*. Furthermore, genes related to plant defense mechanisms were also analyzed in this work. This study represents a first useful approach to understanding the mechanisms of action of ozone in affecting fruit physiology and reducing postharvest decay of peaches.

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 IL PESCO

Il pesco comune, *Prunus persica* L. appartiene alla famiglia delle rosacee, sottofamiglia prunoidee ed è fra le principali colture delle zone temperate; grazie al suo elevato valore nutrizionale e alle sue caratteristiche organolettiche, il frutto del pesco, nelle svariate forme in cui lo si può trovare, rientra sicuramente fra i più importanti e più apprezzati frutti a livello mondiale (Lauxmann et al., 2012). La zona d'origine sembra essere la Cina (Vavilov), areale nel quale è ancora possibile trovarlo allo stato selvatico e dove crescono anche la maggior parte di specie del genere *Prunus*. Il processo di diffusione nel mondo iniziò con i persiani, sotto il dominio di Carlo Magno, per arrivare poi fino in Australia nel 1800, grazie agli inglesi. Il pesco è oggi diffuso in quasi tutte le aree a clima temperato e continentale del mondo e viene coltivato in entrambi gli emisferi, dal 30° al 45° parallelo. Nelle zone caratterizzate da climi tropicali o subtropicali, la coltivazione avviene ad altitudini più elevate.

Il frutto è una drupa, caratterizzata da un epicarpo sottile e membranoso, un mesocarpo carnoso ed infine un endocarpo che risulta legnoso, costituito da uno o più noccioli, di solito con un solo seme. Questa tipologia di frutto è tipica di un'intera sottofamiglia delle *Rosacee*, le *Prunoidee*, denominate appunto anche *Drupacee*, comprendenti diverse specie di interesse alimentare come pesco, albicocco, mandorlo, ciliegio, susino, prugnolo. Ci sono specie che presentano un "frutto a drupa" anche in altre famiglie botaniche; alcuni esempi sono riconducibili ai frutti del noce, dell'olivo, dell'alloro, del corniolo, del pistacchio, del lentisco, del terebinto e del bagolaro.

In linea di massima è possibile affermare che le condizioni climatiche italiane e degli altri paesi mediterranei, sono ideali per la coltivazione del pesco, che può sopportare limiti di temperature assai ampi, da minime invernali di -15° -18°C fino ad ambienti subtropicali dove il riposo invernale è alquanto limitato. La peschicoltura è una delle produzioni frutticole primarie per il nostro paese; negli ultimi anni c'è stato un aumento delle produzioni nell'area meridionale rispetto alle aree centro-settentrionali. La capacità del pesco di adattarsi a svariate condizioni ambientali, ne permette la coltivazione lungo tutta la penisola con un vasto assortimento varietale e un ampio calendario di maturazione (6-8 mesi). Al Sud si producono le pesche precocissime e precoci e la quasi totalità delle percoche per l'industria, mentre al nord sono presenti le cultivar a maturazione intermedia e tardiva, con prevalenza di nettarine.

### **1.1.1 I frutti e la filiera postraccolta**

Le cultivar di pesco possono essere classificate, oltre che in base alla conservabilità e alla produttività, anche in base a diversi parametri, quali la buccia (tomentosa nelle pesche comuni, glabra nelle pesche noci o nettarine); la polpa che può essere gialla o bianca; il tipo di polpa, melting, non melting e tipologia *stony hard* destinata principalmente per l'industria; l'epoca di maturazione, che varia da molto precoci, precoci, intermedie, tardive e molto tardive; il contenuto in acidi, il quale influenza il gusto, variabile tra acido, equilibrato e subacido.

Una volta stabilito il momento ideale, viene effettuata la raccolta, generalmente più volte in una stagione, tranne che per le percoche qualora si pratici la raccolta meccanica. La produttività degli impianti peschicoli può variare notevolmente:

risulta minore per le cultivar precoci mentre tende ad aumentare per quelle tardive e nelle cultivar più produttive può perfino superare le 40 t/ha.

Dalle aziende le pesche passano, normalmente, ai magazzini di lavorazione dove si provvede alla cernita, alla pulizia e al confezionamento. Generalmente, le varietà intermedie o tardive sono quelle che vengono destinate anche alla conservazione, e quindi stoccate per periodi più o meno lunghi in apposite celle, che devono avere la funzione di preservare la qualità ostacolando lo sviluppo di agenti di marciumi sui frutti per tutto il periodo di permanenza in cella.

La pesca oltre che essere destinata al consumo fresco, è anche largamente utilizzata nella trasformazione agroalimentare per la produzione di marmellate, succhi, pesche sciroppate, pesche essiccate, canditi, frutti al brandy, alcool. In questo settore, l'Italia occupa un posto di rilievo sia in ambito Europeo che nel resto del mondo, essendo uno dei principali paesi trasformati.

Ad oggi, il principale sistema di conservazione per la maggior parte delle derrate ortofrutticole è rappresentato dalla conservazione in atmosfera controllata, tecnica che prevede, per tutto il periodo di permanenza dei prodotti in cella, il mantenimento di basse temperature, dell'umidità e la sottrazione di ossigeno. Negli ultimi periodi, si sta valutando la possibilità di abbinare ai metodi di conservazione convenzionale anche la sostituzione dell'aria con una miscela di gas, tecnica nota come atmosfera modificata. L'obiettivo è quindi quello di conservare per un tempo il più lungo possibile i prodotti, mantenendo invariate le caratteristiche organolettiche, frenando lo sviluppo di microrganismi agenti di malattie dei frutti.

Tuttavia, l'esposizione alle basse temperature rappresenta uno stress per il frutto, il quale, essendo composto da cellule vive, reagisce attivando l'espressione dei geni coinvolti con i meccanismi di difesa o di risposta agli stress con lo scopo di tollerare



e di adattarsi a basse temperature (comunque superiori al punto di congelamento); processo noto come acclimatemento (Tanou et al., 2017). Se l'acclimatemento non avviene in modo ottimale (questo può accadere sia a seguito di errori umani, che a causa di fattori intrinseci al prodotto stesso), il frutto può andare incontro a danni da freddo e quindi subire deterioramenti qualitativi. Le drupe in generale, incluso il pesco, sono molto sensibili ai danni provocati dalle basse temperature in fase di conservazione (Tanou et al., 2017); questa suscettibilità dipende, oltre che dalle caratteristiche genetiche, anche dal grado di maturazione e dalle condizioni di coltivazione che i frutti hanno avuto in campo (Lurie e Crisosto, 2005).

È stato dimostrato a livello sperimentale che i danni da freddo su cultivar di pesco e nettarine sensibili, si sviluppano più rapidamente e in maniera più intensa quando i frutti vengono conservati a temperature comprese fra 2,2° e 7,6° C (Lurie e Crisosto, 2005). Altri studi hanno evidenziato come i sintomi spesso si manifestino con il progredire della maturazione, al termine del periodo di conservazione a bassa temperatura; inoltre, generalmente questi non interessano la superficie del frutto, se non marginalmente, ma la polpa (Lurie, 1992; Lurie e Crisosto, 2005; Puig et al., 2015).

La modificazione di altri parametri, come ad esempio la composizione dei gas, può limitare l'incidenza dei danni da basse temperature, ad esempio rallentando l'attività metabolica del frutto, o permettendo il mantenimento di temperature più alte per l'effetto combinato della miscela dei gas e della temperatura nei confronti delle avversità (Sanhueza et al., 2015). Questi autori condussero un'analisi sul trascrittoma di nettarine della cultivar "Red Pearl" sottoposte a sei diverse condizioni di stoccaggio utilizzando la tecnica dell'RNA-Seq, dimostrando di fatto

che l'integrazione fra i due mezzi fisici di conservazione (basse temperature più atmosfera modificata) può indurre la risposta immunitaria nei tessuti vegetali.

Sempre più spesso si ricorre al pre-condizionamento subito dopo la raccolta, strategia che consente di evitare o limitare la perdita di umidità e di eliminare il cosiddetto "calore di campo", con l'obiettivo di mantenere elevata la turgidità delle cellule e la compattezza dei frutti, prolungandone la conservabilità. Su pesco il metodo di pre-condizionamento più diffuso è l'hydrocooling, che consiste nell'irrorare acqua refrigerata sulla superficie dei frutti; durante questo processo il calcio presente normalmente nelle lamelle mediane delle cellule vegetali, si infiltra negli strati più profondi delle pareti cellulari, aumentando la stabilità e la resistenza a ferite e sollecitazioni meccaniche (Kalbasi-Ashtari, 2004).

### **1.1.2 Principali avversità dei frutti**

In generale, numerose sono le perdite quantitative e qualitative che possono sopraggiungere durante la fase di conservazione dei frutti, che si vanno a sommare alle perdite di prodotto avvenute in campo prima della raccolta (Holb, 2006). Spesso le cause sono riconducibili all'azione trofica di alcuni carposfagi o all'azione patogenetica di alcuni microrganismi.

Si stima che circa la metà dei prodotti ortofrutticoli raccolti vanno incontro a deterioramenti qualitativi o sono totalmente persi nelle fasi successive alla raccolta.

Per una corretta conservazione dei frutti in postraccolta, è di fondamentale importanza che questi arrivino sul luogo di conservazione nelle migliori condizioni possibili, senza perciò subire traumi, ferite e sbalzi termici che possono rendere questi frutti più suscettibili all'attacco di microrganismi. Inoltre, è importante anche curare la difesa fitosanitaria in campo per poi destinare i frutti alla conservazione,

in quanto diverse specie di funghi possono rimanere quiescenti per periodi più o meno lunghi per poi dare inizio al processo infettivo quando le condizioni sono più favorevoli, cioè quando il frutto è più maturo e/o più suscettibile (Emery et al., 2000).

## 1.2 LA MONILIOSI DELLE DRUPACEE

Fra le avversità parassitarie che possono arrecare danni e perdite alle produzioni di pesche nella fase successiva alla raccolta, hanno un ruolo fondamentale le specie del genere *Monilinia* Honey (principalmente *M. laxa*, *M. fructicola* e *M. fructigena*), agenti causale del marciume bruno delle drupacee. Il genere *Monilinia* appartiene alla famiglia delle *Sclerotinaceae*, classe *Ascomycetes*. Queste specie sono distribuite in maniera differente in tutto il mondo. Furono isolate contemporaneamente per la prima volta in Asia centrale ed orientale, centri di origine dei principali generi appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae* ospiti del patogeno: generi *Malus* Mill., *Pyrus* L. e *Prunus* L (Mari et al., 2012; Rungjindamai et al., 2014; Landi et al., 2018; De Miccolis Angelini et al., 2019; Landi et al., 2020). In accordo con quanto riportato da Ritchie (2005), il marciume bruno è la malattia più grave che affligge le drupacee nei climi caldi e umidi e la principale causa dei trattamenti fungicidi su queste piante. *Monilinia* spp. riesce ad infettare un elevato numero di ospiti, anche se questi presentano diverse caratteristiche, come lo spessore della parete cellulare e delle cuticole (Adaskaveg et al., 1991).

Fra le tre sottospecie principali del genere *Monilinia*, *M. fructicola* è considerata la più virulenta, nonché resistente a importanti fungicidi come i benzimidazolici e in grado quindi di infliggere importanti perdite, sia qualitative che quantitative, sulle drupacee di tutto il mondo (Landi et al., 2016) tanto che l'European and

Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) l'ha inserita nell'elenco degli organismi nocivi raccomandati per la regolamentazione come organismi nocivi da quarantena ([https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A2\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list); ultimo accesso Ottobre 2019). Negli ultimi anni la specie *M. fructicola* si sta diffondendo ed in alcuni casi sta sostituendo la specie di *M. laxa*, che tuttavia rimane tra le più diffuse in Italia (Abate et al., 2018; De Miccolis Angelini et al., 2019).

### **1.2.1 Sintomatologia**

La malattia si sviluppa a carico di vari organi epigei della pianta ospite, con quadri sintomatologici variabili a seconda della tipologia di tessuto interessata; ad esempio, se viene attaccata una porzione legnosa, i sintomi sono riconducibili alla formazione di lesioni cancerose, mentre i boccioli fiorali interessati dalla malattia presentano delle rugginosità. Ma è soprattutto a carico dei frutti che si manifestano i sintomi tipici della malattia (Figura 1); si hanno generalmente dei marciumi concentrici di colore bruno più o meno scuro, sui quali, in condizioni di umidità relativa elevata, si evidenzia il tipico micelio grigio-brunastro. A seguito del processo di marcescenza e successiva disidratazione, i frutti colpiti assumono una consistenza legnosa e prendono il nome di “mummie” (spesso visibili nei frutteti a fine stagione, qualora non vengano rimosse). Condizioni di umidità elevata e prolungata, possono permettere la comparsa del micelio e la formazione dei conidi anche sulla superficie dei fiori e dei germogli colpiti dalla malattia che in risposta al processo infettivo, dai cancri producono una sostanza gommosa. La presenza di conidi è un segno utilizzato in chiave diagnostica che permette la distinzione della moniliosi dagli altri marciumi delle drupacee causati da batteri o funghi (Ritchie, 2005).

Sebbene da una semplice analisi visiva dei sintomi sui frutti, si possa facilmente riconoscere la moniliosi dalle altre fitopatologie, risulta molto più difficile risalire a quale specie di monilia abbia causato l'infezione (per poterla identificare con certezza sono necessarie delle analisi molecolari).



**Figura 1.** Frutto di pesco prossimo alla raccolta con gravi sintomi di marciume bruno a seguito dell'infezione di *Monilinia* spp.

### 1.2.2 Ciclo biologico ed epidemiologia

*Monilinia laxa*, ampiamente diffusa a livello mondiale (Balaž, 2000), è ritenuta la specie responsabile soprattutto degli attacchi ai fiori e ai germogli (Martini e Mari, 2014), mentre *Monilinia fructigena* e *Monilinia fructicola* attaccano soprattutto i frutti (Villarino et al., 2013). *M. fructicola* fu rinvenuta in Europa all'inizio del millennio; In Italia, la sua presenza è stata riscontrata di recente in Piemonte (Pellegrino et al., 2009) e successivamente in Emilia-Romagna, Lazio (Martini et al., 2013) e Marche (Landi et al., 2016), mentre *M. fructigena* e *M. laxa* erano già presenti da tempo sul territorio nazionale.

Il patogeno ha due possibilità di svernamento, come micelio o sottoforma di pseudosclerozi, sia sui cancri originati dall'attacco ai giovani germogli, sia sui frutti mummificati. Pertanto è buona pratica agronomica asportarli ed eliminarli dal frutteto, riducendo il potenziale di inoculo per la stagione successiva, in un'ottica di prevenzione della malattia.

In primavera, il micelio svernante inizia a propagarsi producendo i conidi, come a formare delle piccole catene; parallelamente, gli pseudosclerozi, che generalmente si trovano nelle mummie cadute a terra, formano gli apotecii, sui quali poi si differenziano gli aschi portanti le ascospore. I conidi vengono trasportati dal vento o spostati da insetti e schizzi di pioggia per arrivare sui tessuti sani; le ascospore sono rilasciate dagli aschi e formano una nuvola biancastra osservabile al di sopra dell'apotecio. Entrambe le situazioni sopra descritte possono portare all'insorgenza dell'infezione primaria sui fiori, il quale successo è anche fortemente influenzato dal decorso meteorologico del periodo.

Il patogeno è policiclico e se le condizioni agro-climatiche gli sono favorevoli può compiere un elevato numero di cicli infettivi durante la stagione, grazie anche

alla sua capacità di colonizzare rapidamente i tessuti vegetali e di produrre un'abbondante sporulazione.

I tessuti fiorali infettati assumono una colorazione marrone scura e il micelio produce su queste aree infette degli ammassi conidici; alcuni fiori colpiti dalla malattia cadono precocemente a terra, mentre altri rimangono attaccati alla pianta per tempi più lunghi, favorendo l'infezione di tessuti sani vicini. A questo punto, col progredire della malattia, vengono interessati anche i piccioli fiorali e i giovani germogli in crescita portanti i frutticini (Van Leeuwen e Van Kesteren, 1998; Hong e Michailides, 1999; Holtz et al., 1998; Michailides et al., 2000; Ceredi e Mari, 2011). Le catene conidiche rappresentano il sistema di propagazione del fungo nel frutteto e la possibilità di infettare più volte durante la stagione.

Rare sono le infezioni a carico di frutti non maturi che, in caso, si presentano con delle aree più scure. La presenza di abbondante fruttificazione (magari con frutti che si toccano l'un l'altro) e di frutti lesionati (sia da fattori biotici che abiotici), sono condizioni predisponenti alla comparsa dei primi marciumi. Se i frutti sono sufficientemente maturi e l'umidità è elevata, la superficie del frutto infetto può essere interamente coperta dalle fruttificazioni del patogeno, mentre, in condizioni di bassa umidità e con drupe poco mature, generalmente non si assiste né alla comparsa del micelio né alla formazione di conidi (Michailides et al., 2000).

Sui germogli, iniziano a comparire delle rugginosità, che poi evolvono in lesioni cancerose; nei primi stadi della formazione del cancro, il tessuto vascolare più esterno delle zone infette è condotto a morte, mentre le porzioni sottostanti si incurvano e scoloriscono fino a formare una ferita, in corrispondenza della quale la pianta emette degli essudati gommosi. Se le condizioni ambientali sono favorevoli alla sporulazione, dal micelio presente nei cancri possono essere prodotti altri

conidi, i quali rappresentano la fonte di inoculo che causerà l'infezione tardiva sui frutti, in prossimità della maturazione. In casi eccezionali, se le ferite dei cancri non vengono curate e su cultivar particolarmente sensibili, nel giro di qualche anno la pianta può essere condotta a morte o comunque la produttività di intere branche può essere debilitata (Byrde e Willets, 2013).

In genere i conidi penetrano passivamente gli esocarpi dei frutti, sfruttando ferite o aperture naturali ((PLH), 2011). Inizialmente il micelio ha un accrescimento intercellulare poi, grazie all'azione di enzimi specifici, causa la lisi delle pareti cellulari, delle lamelle mediane e quindi il tipico rammollimento dei tessuti colonizzati. Nelle due o tre settimane che precedono la raccolta, il contenuto zuccherino dei frutti aumenta sensibilmente e questa fase coincide con il periodo in cui i frutti diventano più suscettibili agli agenti di marciume bruno (Ritchie, 2005); inoltre, le specie del genere *Monilinia* possono innescare subito il processo infettivo, originando la malattia del frutto quando questo si trova ancora attaccato alla pianta, oppure, con lo scopo di aggirare le difese dell'ospite, possono rimanere latenti, per periodi più o meno lunghi, e infettare i frutti una volta che saranno più maturi, staccati dalla pianta e quindi più suscettibili (Emery et al., 2000). Questa seconda possibilità è il motivo per cui questa malattia è ritenuta una vera e propria minaccia nel post raccolta; è possibile infatti che frutti apparentemente sani, portino invece sulla loro superficie dei propaguli del patogeno in uno stato quiescente, con la possibilità che questi originino la malattia da un momento all'altro, coinvolgendo anche frutti sani e causando quindi ingenti perdite economiche (fino a interi lotti) nella fase di conservazione dei frutti (in cui sono spesso tenuti ammassati o molto vicini).



Diversi processi fisiologici, non ancora del tutto chiari sono coinvolti con il fenomeno della quiescenza. Il fatto che la suscettibilità dei frutti alla malattia aumenti con il processo di maturazione, rappresenta il motivo principale e la spiegazione più logica del comportamento dell'agente eziologico, che aspetta le condizioni migliori per infettare (Mari et al., 2003). Sono state proposte diverse ipotesi per spiegare la correlazione positiva tra aumento della suscettibilità dei frutti agli agenti di malattia e grado di maturazione; la risposta potrebbe essere l'insieme di più ipotesi, quali ad esempio: una maggiore resistenza meccanica dei tessuti meno maturi, una diversa risposta biochimica all'infezione a livello cellulare e la presenza di sostanze inibitrici nei tessuti immaturi.

Le infezioni latenti di *Monilinia spp.* furono documentate per la prima volta nel 1971 su pesco da Kable; successivamente in California furono descritte, sempre su pesco, infezioni latenti causate da *M. fructicola* (Michailides et al., 2000). Nel corso degli anni, altri autori hanno riportato infezioni latenti di *Monilinia spp.* su diverse specie ospiti di elevato interesse alimentare, come albicocco, ciliegio e susino (Northover e Cerkauskas, 2009; Witting et al., 1997; Förster e Adaskaveg, 2000).

Ad ogni modo, le mummie rimaste nel frutteto alla fine della stagione e i residui delle porzioni vegetali attaccate rappresentano i siti di svernamento per il micelio e per gli pseudosclerozi.

### **1.3 I MEZZI DI CONTROLLO FISICI IN POSTRACCOLTA**

In questi ultimi decenni l'agricoltura ha subito profondi cambiamenti per adeguarsi alla rapida evoluzione dell'economia e del mercato e alle mutate esigenze del consumatore. La concentrazione di specifiche produzioni in particolari aree e in particolari momenti dell'anno determina pericolosi fenomeni di sovrapproduzione

con difficoltà di collocazione sul mercato e prezzi non remunerativi; d'altra parte la rete di trasporti nazionali e internazionali consente di raggiungere mercati molto distanti, venendo incontro alle richieste del consumatore, che sempre di più preferisce prodotti freschi. Per poter differire nel tempo e nello spazio tali produzioni è necessario sottoporle a un periodo più o meno lungo di conservazione in relazione alle caratteristiche del prodotto e alle richieste del mercato (Prusky, 2011). Durante la conservazione i frutti, ricchi di acqua ed elementi nutritivi, rappresentano un substrato ideale per lo sviluppo dei patogeni che, instaurando processi di marcescenza, provocano la non commerciabilità dei frutti infetti e la conseguente perdita di prodotto (Romanazzi et al., 2016). I consumatori ben conoscono questo problema, quando frutti freschi appena comprati ammuffiscono nell'arco di pochi giorni. Il 30-40% dei prodotti ortofrutticoli raccolti viene perso o scartato (Salami et al., 2010). Le maggiori perdite si hanno durante la vendita al dettaglio o appena prima del consumo (Hailu e Derbew, 2015) e si stima che le perdite in questa fase vanno da un minimo del 5-35% nei paesi a tecnologia avanzata, a oltre il 50% nei paesi in via di sviluppo (Hailu e Derbew, 2015; Kader, 2002).

Anche nella difesa dei prodotti ortofrutticoli in postraccolta da malattie, le strategie di lotta basate sull'utilizzo di sostanze attive di natura chimica hanno sempre giocato un ruolo chiave (Do Kim et al., 2019; Zuccolo et al., 2019).

Negli ultimi anni però, l'interesse verso l'adozione di sistemi di protezione più sostenibili si è fatto sempre più importante. Uno degli obiettivi principali che l'agricoltura oggi si pone è proprio quello di riuscire a ridurre il più possibile l'uso di sistemi a base di sostanze chimiche, per limitare l'impatto negativo sull'ambiente e la salute umana.

In un'ottica di produzione integrata, infatti, il mezzo chimico deve rappresentare solo l'ultima possibilità di lotta ad un'avversità, al quale si ricorre solo se l'integrazione di tutti gli altri strumenti di lotta non ha portato ad un controllo soddisfacente delle problematiche in questione.

Fra i vari mezzi terapeutici o preventivi alternativi al mezzo chimico, spiccano le strategie di tipo fisico. I mezzi di lotta fisici consistono nell'eliminazione o nella modificazione del comportamento degli agenti di malattia attraverso l'applicazione di diverse forme di energia. Possono essere attuati sia in campo, sulla pianta, soprattutto attraverso l'impiego delle alte temperature (termoterapia, solarizzazione, disinfezione con vapore), e sia nelle fasi successive alla raccolta dove rientrano in diverse strategie di conservazione della qualità e di protezione dalle avversità (Casals et al., 2010; Spadoni et al., 2013). Alcuni mezzi fisici in postraccolta sono già validati e ampiamente utilizzati, come ad esempio l'applicazione di basse temperature e l'impiego di celle con atmosfera controllata o modificata. Altri invece, come l'utilizzo di radiazioni, i trattamenti con ozono e le variazioni di pressione (trattamenti sia iperbarici che ipobarici) sono ancora in fase di sperimentazione, per testarne l'efficacia ed eventuali rischi correlati alla loro applicazione (Cal e Melgarejo, 1999; Marquenie et al., 2002; Martini e Mari, 2014).

In alcune circostanze e in determinate situazioni, il ricorso a sistemi di protezione innovativi, come l'utilizzo di antagonisti naturali o dei mezzi fisici, può garantire risultati superiori alle tradizionali strategie di difesa basate sull'utilizzo dei prodotti chimici. Nella maggioranza dei casi però, le nuove strategie di protezione dei vegetali o dei prodotti ortofrutticoli non hanno un'efficacia paragonabile agli agrofarmaci, soprattutto se utilizzati individualmente; pertanto, per contrastare gli agenti di marciumi in postraccolta, spesso si ricorre all'integrazione di più mezzi

di lotta perché ognuno rappresenta un ostacolo allo sviluppo del patogeno oppure perché la combinazione può avere un'efficacia sinergica: ad esempio può essere possibile abbinare ad un trattamento fisico, l'applicazione di un antagonista naturale o di una molecola naturale con attività antimicrobica (Wilson et al., 1994; Margosan et al., 1997; Romanazzi et al., 2003; Casals et al., 2012; Sisquella et al., 2013; Romanazzi e Feliziani, 2014; Romanazzi et al., 2016).

#### 1.4 L'OZONO

Tra le strategie più innovative per contrastare l'insorgenza di infezioni in postraccolta, risultano le applicazioni di ozono (Aslam et al., 2020) e di acqua elettrolizzata (EO). L'efficacia in postraccolta è nota da diversi anni (Palou et al., 2001); secondo Smilanick et al. (Smilanick et al., 2002), è sufficiente immergere dei grappoli di uva per un minuto in acqua ozonata, per ridurre del 25% l'incidenza di marcumi causati da *Botrytis cinerea* e, con lo stesso tempo di immersione, si può anche ridurre l'incidenza del marciume bruno su pesche, causato da *Monilinia fructicola*, dal 10,9 al 5,4 %.

L'ozono è una forma allotropica e reattiva dell'ossigeno, costituita da tre atomi dell'elemento ( $O_3$ ). La sua struttura chimica può essere ricondotta ad un ibrido di risonanza fra due forme limite possibili, definite dalla posizione del doppio legame e quindi dal punto dove viene esposta la carica negativa. Questa particolare struttura chimica, ne influenza le proprietà, rendendola una molecola altamente instabile e reattiva, che quindi non può essere conservata tal quale, ma deve essere prodotta al momento del suo utilizzo.

Alla temperatura di 20°C si presenta come un gas dal caratteristico odore pungente e può avere proprietà esplosive allo stato liquido. Si forma da molecole di ossigeno, a seguito di un trasferimento di energia dall'ambiente circostante al

sistema (reazione endoergonica). In natura questo può avvenire in corrispondenza di temporali dai quali si può liberare energia, mentre artificialmente può essere prodotto tramite degli appositi macchinari, chiamati appunto ozonizzatori, che convertono l'ossigeno atmosferico in ozono attraverso scariche elettriche.

L'ozono può essere presente in diversi strati dell'atmosfera, ma si concentra nell'ozonosfera a circa 25 chilometri di altezza dalla superficie terrestre. Pur essendo essenziale per la vita sulla terra, in quanto schermo la radiazione ultravioletta diretta dal Sole verso la Terra, risulta altamente velenoso per gli esseri viventi, data la sua elevata capacità ossidante.

#### **1.4.1 Meccanismi d'azione**

L'ozono è stato definito come la più efficiente tra le sostanze disinfettanti, con una rapida, forte e ad ampio spettro efficacia biocida nei confronti dei vari tipi di microrganismi (White et al., 1999). Questa specie reattiva dell'ossigeno è in grado di ossidare svariati substrati organici, in particolare quelli che presentano delle insaturazioni o dei sostituenti fenolici (Razumovskii e Zaikov, 1984; McKenzie et al., 1997). La sua decomposizione è strettamente legata ad una serie di reazioni a catena che portano alla liberazione di alcuni radicali, ad altissima reattività e di vita breve, come ad esempio: perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), radicale ossidrilico ( $\cdot OH$ ) e anione superossido ( $O_2^-$ ).

La tossicità dell'ozono è generalmente dovuta alla generazione o all'attivazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Tzortzakis e Chrysargyris, 2017). Oltre all'azione ossidante, l'ozono è in grado di disarticolare e forare la membrana citoplasmatica dei microrganismi (soprattutto batterici), alterandone di fatto la permeabilità e conducendo a morte le cellule microbiche per lisi cellulare (Kim et

al., 1999). Secondo quanto riportato da Khadre et al. (2001), l'ozono attacca la cellula microbica distruggendo i doppi legami dei grassi poliinsaturi presenti sulle membrane cellulari, provocando la rottura dei gruppi sulfidrilici e degli enzimi legati alla membrana, nella specie batterica *Escherichia coli*. Inoltre, sempre su *E. coli*, è stata riportata una inibizione dell'espressione genica codificano per le catalasi e le superossido desmutasi (Whiteside e Hassan, 1987). Diversi sono i fattori che possono influenzare l'attività antimicrobica dell'ozono, a partire dalla temperatura (Langlais et al., 1991; Liew e Prange, 1994; Khadre et al., 2001), dal pH (Hoigné, 1998; Kim et al., 1999; Von Gunten, 2003) e dalla presenza di specie chimiche in grado di inattivarlo (Hill, 1982 ; Langlais et al., 1991; Khadre et al., 2001). Questi fattori agiscono sulle proprietà fisico-chimiche della molecola quali solubilità, reattività e stabilità.

#### **1.4.2 Possibili applicazioni in postraccolta**

Considerando il suo potere ossidante e la sua capacità, essendo molto instabile, di degradarsi velocemente a ossigeno senza lasciare residui pericolosi, odori o sapori anomali, questa molecola ha suscitato l'interesse sia della comunità scientifica che delle aziende produttive, per una sua possibile applicazione nell'industria della conservazione dei prodotti alimentari e come possibile alternativa ai mezzi chimici nella protezione postraccolta di prodotti ortofrutticoli da microrganismi (Aslam et al., 2020).

L'ozono viene già impiegato per trattamenti disinfettanti in diversi ambiti, come ad esempio: acque pubbliche, industriali, di scarto, di piscine o da imbottigliare; effluenti di industrie lattiero-casearie e stalle; torri di raffreddamento; impianti idrici ed equipaggiamenti ospedalieri; acquari e impianti di acquacoltura; parchi

acquatici; spazi pubblici e privati di vario genere (Suslow, 1998). Nel 2001 fu approvato come additivo alimentare con proprietà antimicrobiche e ricevette il riconoscimento GRAS (Generally Recognised As Safe) dall'US Food and Drug Administration (Tzortzakis e Chrysargyris, 2017; Goffi et al., 2019). Considerando le caratteristiche di ecletticità della molecola, il suo utilizzo potrebbe trovare impiego nei trattamenti preliminari alla conservazione, attraverso applicazioni con acqua o con aria, oppure essere somministrato, in modo continuo o ad intermittenza, durante il periodo di conservazione dei frutti. Tuttavia, nonostante l'interesse che l'ozono ha riscosso per un suo potenziale utilizzo in questo senso, in letteratura ci sono diverse contraddizioni circa la sua efficacia (Tzortzakis e Chrysargyris, 2017). Per quanto riguarda l'applicazione con acqua, bisogna considerare che nel mezzo liquido sono attive e reagiscono con i composti organici sia la forma molecolare ( $O_3$ ) che gli idrossiradicali ( $\cdot OH$ ) e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) che si formano a seguito della decomposizione della molecola (Staehelin e Hoigne, 1985; Pi et al., 2005); inoltre, l'acqua utilizzata per i trattamenti con ozono può essere facilmente riciclata senza sprechi (OSHA, 2019).

L'ozono è in grado di ridurre la carica microbica presente sulla superficie dei frutti, come visto su datteri (Habibi Najafi e Haddad Khodaparast, 2009). Prove sperimentali condotte su frutti carnosi di kiwi, hanno mostrato come il trattamento con ozono abbia provocato un ritardo nella comparsa dei sintomi della senescenza, con un meccanismo che ancora oggi non è del tutto chiaro ma che ha coinvolto l'ossidazione dell'etilene, sostanza principalmente responsabile del processo di maturazione e senescenza dei frutti. Inoltre sempre su kiwi è stata osservata l'induzione di una risposta antiradicalica e antiossidante nei frutti di actinidia trattati (Minas et al., 2012). In un'altra recente prova sperimentale condotta su actinidia,

(Goffi et al., 2019), si è osservata un'efficacia dell'ozono a 300 ppb nel contenimento delle fitopatie in postraccolta combinato con la conservazione a freddo a 2° C. Tuttavia i meccanismi molecolari attivati dal trattamento in postraccolta con l'ozono sono ancora conosciuti solo parzialmente.

### **1.5 LA PCR REAL TIME: LA TECNOLOGIA SYBR GREEN**

Una delle tecnologie innovative più in uso per lo studio dell'espressione genica è quella che utilizza la tecnologia molecolare Quantificazione in Tempo Reale della Reazione a Catena della Polimerasi (RT qPCR) (Deepak et al., 2007) (Landi et al., 2014).

La RT qPCR si basa sulla tecnologia PCR in grado di amplificare gli acidi nucleici *in vitro*. L'amplificazione permette una sintesi esponenziale di un segmento di DNA o cDNA, chiamato stampo, utilizzando l'enzima Taq polimerasi, il quale è in grado di operare anche ad elevate temperature (Williams et al., 1990). La tecnica PCR è nata come tecnologia qualitativa in quanto utilizza come metodo di analisi dei risultati, l'elettroforesi su gel di agarosio, che si effettua alla fine della reazione. Ciò tuttavia rende impossibile quantificare la presenza del gene di interesse in quanto non è possibile controllare la dinamica della reazione durante i cicli di PCR (fasi esponenziale, latente e plateau della reazione di sintesi). Nel corso degli anni è stata fondamentale un'evoluzione della tecnica PCR che, utilizzando traccianti della reazione di sintesi come delle molecole fluorescenti, consente di monitorare le dinamiche interne della PCR, rendendola idonea per la quantificazione.

La qPCR (PCR quantitativa), consente di quantificare la sintesi del prodotto di PCR ad ogni ciclo di amplificazione in tempo reale. Questo permette di effettuare



un'analisi quantitativa della quantità di DNA stampo iniziale. Il segnale che viene quantificato è rappresentato dalla fluorescenza emessa da fluorofori, cioè molecole fluorescenti in grado di legarsi alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione. I fluorofori possono intercalarsi al DNA in maniera aspecifica, oppure fungere da marcatori di sonde oligonucleotidiche complementari a specifiche sequenze. Le informazioni che si ottengono con questa tecnica sono quindi maggiori rispetto a quelle di una classica PCR. La qPCR è spesso utilizzata in combinazione con la reazione di retro-trascrizione (RT), per quantificare i livelli di espressione di specifici geni di interesse.

Per valutare in tempo reale la quantità di DNA a doppio filamento presente dopo ogni ciclo di sintesi, nella miscela di reazione può essere utilizzato il SYBR Green, un composto fluorescente intercalante del DNA. Il SYBR® Green I fa parte dei coloranti aspecifici sviluppati per le reazioni di PCR Real-Time. Si tratta di un colorante fluorescente, simile all'etidio bromuro, che intercalandosi nel solco minore del DNA a doppia elica (Zipper et al., 2004), incrementa di circa cento volte la sua fluorescenza, generando un segnale visibile proporzionale al numero di copie presenti. Il SYBR GREEN è una cianina asimmetrica la cui fluorescenza aumenta significativamente quando essa si trova complessata con il DNA a doppia elica: la molecola assorbe luce blu ( $\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$ ) ed emette luce verde ( $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ ). La lettura della fluorescenza avviene al termine di ogni ciclo di amplificazione.

L'uso di molecole fluorescenti intercalanti è un metodo efficace e relativamente economico, tuttavia questo sistema non è in grado di discriminare tra i prodotti specifici di amplificazione e altri prodotti aspecifici, come dimeri di primer. Infatti, questo modo di legare il DNA rende questo intercalante un reporter generalmente aspecifico, che permette di monitorare l'andamento della reazione, ma non consente

di riconoscere a priori il prodotto amplificato che determina la comparsa del segnale di fluorescenza. Basandosi solamente sul grafico di amplificazione non è possibile sapere se la fluorescenza è data dal target atteso o da un prodotto aspecifico. Tuttavia, è possibile riconoscere i vari prodotti in base all'analisi delle curve di melting. Per Temperatura di melting ( $T_m$ ) si intende la temperatura alla quale un DNA a doppio filamento si trova denaturato al 50% (Hernández et al., 2003). I processi di denaturazione dipendono da diversi fattori, fra cui la lunghezza della molecola di DNA e la sua sequenza (ordine delle basi e percentuale di CG), ed è quindi caratteristica di ciascun frammento. Basandosi su questo principio, è stato dimostrato che è possibile discriminare anche mutazioni a singolo nucleotide (SNP) (Landi et al., 2019).

L'analisi della curva di dissociazione viene fatta dal termociclatore al termine della reazione di amplificazione e consiste in un ciclo costituito da un graduale innalzamento della temperatura, di 0,2 o 0,5 °C, a partire da una temperatura prefissata (ad esempio 65°C) fino ad arrivare a circa 90-95°C. Lo strumento rileva il segnale di fluorescenza per tutta la durata dell'analisi. All'aumentare della temperatura il SYBR® Green si separa lentamente dalle molecole di DNA, ma al momento della denaturazione dei due filamenti si ha un drastico calo della fluorescenza. Un software apposito trasforma i dati, relativi alla curva di melting, nella derivata prima negativa della funzione descritta dal segnale: ne risulta un grafico che mostrerà un picco nel punto di massima pendenza della curva di melting; tale picco sarà in corrispondenza della temperatura di melting di quello specifico amplicone.

## **2 OBIETTIVI DELLA RICERCA**

La qualità sensoriale e nutrizionale di un frutto è il risultato della combinazione di diversi fattori, non tutti riconducibili alla produzione in campo; infatti alcuni dipendono in maniera rilevante dalla gestione del postraccolta fino alla tavola del consumatore. In questo contesto la scelta dei composti e/o delle tecnologie per la conservazione e riduzione dei marciumi in postraccolta sono di importanza cruciale. Negli ultimi anni diversi studi sono stati condotti con successo per selezionare sistemi alternativi all'uso dei classici fungicidi con la finalità di ottenere un protocollo adatto al contenimento delle malattie, riducendo nel contempo l'impatto ambientale e i rischi annessi alla salute umana. Ora la sfida principale è quella di preservare in postraccolta anche le qualità organolettiche e sensoriali delle produzioni ortofrutticole fino al loro arrivo nelle tavole dei consumatori. Un ruolo importante viene sicuramente svolto dall'utilizzo in postraccolta dell'ozono, il quale negli ultimi anni si è dimostrato in grado di tenere sotto controllo, in determinate condizioni e/o specie di frutta, le contaminazioni microbiologiche agendo come molecola in grado di sanificare.

L'ozono, noto anche come ossigeno triatomico ( $O_3$ ), agisce sotto forma di ossigeno altamente reattivo, penetrando le membrane delle cellule dei patogeni che vengono eliminati per lisi cellulare. Grazie alla sua instabilità molecolare, si degrada velocemente e concentra tutta la sua azione nel periodo di produzione ed utilizzo, non lasciando residui sugli alimenti. Recentemente è stato suggerito che l'applicazione dell'ozono in postraccolta agisca sia inibendo l'insorgenza dei sintomi di senescenza sui frutti carnosì che attivando i meccanismi di difesa della pianta, tuttavia la specifica modalità di azione di questa molecola non è ancora del tutto chiara. Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un sistema

in RT-qPCR per lo studio dell'espressione genica in postraccolta su pesche sottoposte all'azione dell'ozono e prelevate durante il periodo di shelf life a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 ore dalla fine trattamento. In totale dieci geni pilota coinvolti sia nella maturazione e senescenza dei frutti che nei meccanismi di difesa della pianta sono stati analizzati. In particolare, geni codificanti per la *poligalatturonasi*, e per il *recettore ETR1* dell'etilene, geni che codificano per proteine associate agli shock termici, *Heat Shock Protein (HSP)* e *Cold Shock Protein (CSP)*. Le sequenze geniche più strettamente coinvolte nella risposta di difesa della pianta sono relative ad un gene codificante per il *recettore FLS2 - LRR serina/treonina-chinasi* e uno per la proteina *binding 2* per l'acido salicilico, entrambi svolgono un ruolo cruciale nel funzionamento del sistema immunitario innato della pianta. Inoltre è stata osservata l'espressione genica di proteine coinvolte nella patogenesi (*PR protein*) come la *taumatina (PR-5)*, e l'allergene *Pru av 1 (PR-10)*. A questi si aggiungono il gene per il *glutathione S-transferasi* con un ruolo importante nella detossificazione cellulare, e infine il gene codificante *l'antocianidina 3-O-glucosiltransferasi (3'GT)*, coinvolto nella via metabolica dei fenilpropanoidi.

### **3 MATERIALI E METODI**

#### **3.1 MATERIALE VEGETALE**

I frutti di pesco utilizzati per la prova appartengono alla cultivar ‘Extreme 486’, a maturazione molto tardiva, con elevata produzione ed epoca di fioritura medio-tardiva. La pianta presenta buon vigore. Il frutto si presenta di grosso calibro, simmetrico e con una buccia vellutata molto scura su quasi tutta la superficie del frutto. La polpa è gialla, soda e presenta sapore sub-acido.

I frutti sono stati prelevati presso un frutteto della Società Agricola Acciarri s.r.l., ubicato a Ortezzano, in provincia di Fermo, nelle Marche (latitudine: 43°01'18.45"N; longitudine: 13°36'36.16"E; altitudine 206m s.l.m.). La raccolta è avvenuta prima della completa maturazione del frutto, in accordo con le tempistiche standard per il conferimento alla grande distribuzione organizzata (GDO).

#### **3.2 TRATTAMENTO DEI FRUTTI DOPO LA RACCOLTA**

Successivamente alla raccolta, avvenuta il 12/09/2019, i frutti sono stati destinati alla conservazione per un periodo di 25 giorni secondo due diverse modalità: metà della frutta è stata posta in una cella frigorifera e conservata alla temperatura di 0°C  $\pm$  0,5°C, mentre l'altra metà, oltre al trattamento termico ha subito anche l'ozonoterapia, con iniezioni a flusso continuo di ozono gassoso. I livelli di ozono nella cella sono stati mantenuti in un range variabile da 45 ppb a 124 ppb, grazie a dei sensori che permettono l'accensione dell'ozonizzatore.

Una volta terminato il periodo di permanenza in cella di conservazione, per entrambe le tesi si è simulata la shelf life dei frutti, mantenendoli in condizioni di buio, ad umidità costante e in condizioni omogenee con l'ausilio di film plastici opachi. Durante questa simulazione, sono state prelevate 10 pesche sane, 5 per ogni

replica a diversi intervalli: a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 ore dalla fine del trattamento. Le pesche sono state poste immediatamente a -80°C per conservarle correttamente fino alla estrazione dell'RNA.

### 3.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

L'analisi dell'espressione genica sui frutti di pesco è stata eseguita in RT-qPCR, utilizzando la tecnologia SYBR, attenendosi alle linee guida espresse nel MIQE (Linee guida per gli esperimenti PCR quantitativa Real Time) (Bustin et al., 2010). Per la quantificazione genica è stato adottato il metodo comparativo  $-\Delta\Delta C_t$  proposto da Livak e Schmittgen (2001), che valuta la quantità di gene espresso per geni target in ogni campione analizzato, rapportandolo all'espressione genica osservata in un campione scelto come controllo (pesche non trattate al tempo 0). L'espressione dei geni target è normalizzata utilizzando controlli endogeni, previa validazione, selezionati per essere utilizzati come referenti secondo l'equazione:

$$\frac{E(\text{target})^{\Delta Cq \text{ trattato} - \Delta Cq \text{ controllo}}}{E(\text{referente})^{\Delta Cq \text{ trattato} - \Delta Cq \text{ controllo}}}$$

Dove  $\Delta Cq$  rappresenta la variazione ( $\Delta$ ) del

punto in cui ogni amplificato interseca il ciclo soglia ( $Cq$ ) (Livak e Schmittgen, 2001). I geni analizzati in questo studio sono stati selezionati dalla banca genomica National Center for Biotechnology Information (NCBI) in relazione al genoma della specie *Prunus persica*, GenBank Project PRJNA31227. In dettaglio sono stati selezionati come geni referenti sequenze relative ai geni: *isotone H1*,  *$\beta$ -tubulina* e *actina*. Come geni target sono state selezionate sequenze relative ai geni: *poligalatturonasi*, *recettore ETR1* dell'etilene, *Heat Shock Protein 90 (HSP90)*, *Cold Shock Protein (CSP)*, *recettore FLS2 - LRR serina/treonina-chinasi*, proteina *binding 2* per l'acido salicilico, *taumatina* (PR-5), l'allergene *Pru av 1* (PR-10), *glutazione S-transferasi* e *antocianidina 3-O-glucosiltransferasi (3'GT)*.

### 3.4 ESTRAZIONE DELL'RNA

Prima di procedere all'estrazione del RNA totale, tutti i reagenti e il materiale plastico sono stati trattati con una soluzione allo 0,1% in DEPC (Diethyl pirocarbonato) in grado di degradare gli enzimi RNAsi.

L'RNA totale di alta qualità è stato estratto dal frutto di pesco secondo il protocollo messo a punto da Landi et al., (2014). In breve, per ogni ripetizione la polpa e la buccia di 5 frutti sono stati frantumati meccanicamente avendo cura di mantenere il materiale congelato con l'ausilio dell'azoto liquido. Frammenti ottenuti dalla scissione meccanica corrispondenti a circa 10 g di materiale sono stati posti immediatamente in un mortaio e polverizzati con azoto liquido. Dalla polvere sono stati collezionati 200 mg di materiale che sono stati posti in due tubi da 2 mL. Ad ogni tubo è stato aggiunto 1,5 mL del tampone di estrazione costituito da: 1 mL; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA, pH 8,0; 2% [w / v] CTAB [Sigma]; 2% [v / v]  $\beta$ -mercaptoetanolo; 2,5 M NaCl e 2 % [p / v] di PVP-40. Il tampone di reazione è stato fatto reagire 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 4°C, a 4500g con lo scopo di eliminare i detriti più grossolani. Il soprannatante 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 soprannatante ottenuto è stato posto in un nuovo tubo al quale è stata aggiunta 0,25 % di una soluzione di LiCl 10M. L'RNA è stato fatto precipitare a 4°C per tutta la notte. La mattina successiva i campioni sono stati centrifugati per 30 minuti a 14000g a 4°C. Il pellet ottenuto è stato lavato aggiungendo 500 mL di etanolo al 70%. Il pellet essiccato è stato risospeso in 50  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidistillata. L'integrità e la

qualità dell'RNA 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.

### **3.5 GENERAZIONE DEL cDNA MEDIANTE TRASCRIPTASI INVERSA**

Per la trascrizione del cDNA dall'RNA è stato utilizzato il kit iScript™ di sintesi del cDNA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La sintesi del cDNA è stata effettuata secondo le istruzioni contenute nel kit. In un volume di 20 µL sono stati inclusi 40-50 ng di RNA, 1 µL di random primers e 4 µL di mix di reazione 5×. La reazione è stata fatta avvenire nel termociclature secondo i seguenti parametri: 5 minuti a 25 °C, 20 minuti a 46 °C e 1 minuto a 95°C.

### **3.6 PCR QUANTITATIVA REAL TIME**

Le reazioni RT-qPCR sono state eseguite in Piastre PCR trasparenti a 96 pozzetti (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizzando il termociclature CFX Connect Real Time Detection System (Bio-Rad Laboratories). Per ogni campione l'amplificazione della PCR è stata effettuata in un volume totale di 12 µL, contenente 5,6 µL di cDNA diluito (1:20), 0,1 µM di ciascun primer precedentemente disegnato utilizzando sequenze geniche specifiche per il pesco, selezionate dalla banca genomica NCBI e 6 µL di SsoFast (EvaGreen Supermix 2×, (Bio-Rad Laboratories). Tutti i saggi sono stati effettuati in duplicato inclusi controlli no-RT e no-templato, per discriminare l'amplificazione non specifica.

Per determinare la specificità dei primers, è stata eseguita l'analisi della curva di fusione nell'intervallo da 55 a 98°C con un gradiente di 0,05°C/sec. L'efficienza (E) qPCR di ciascuna coppia di primer è stata determinata secondo le curve standard generate dal mix del cDNA di tutti i campioni diluiti 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000.



### **3.7 VALIDAZIONE DEI GENI REFERENTI**

La stabilità dell'espressione genica (M) e il coefficiente di variazione (CV) dei geni di riferimento è stata analizzata utilizzando il software qBaseC della piattaforma Biogazelle, integrato nel sistema di rilevamento PCR Real-Time CFX Connect (Bio-Rad Laboratories). Il software utilizza il metodo geNorm messo a punto da Vandesompele et al. nel 2002. Quest'ultimo è un algoritmo sviluppato per determinare la stabilità dell'espressione di geni target di riferimento (geni referenti) selezionati. Può essere utilizzato negli studi pilota per identificare l'insieme ottimale di geni di riferimento da utilizzare negli studi di espressione genica o in seguito per verificare la stabilità di espressione degli obiettivi di riferimento selezionati. In questo lavoro è stato sviluppato per la prima volta su pesco valutando il CV e il valore di M. I valori di stabilità raccomandati sono per dati omogenei pari a valori di  $CV < 0,25$  e  $M < 0,5$ ; mentre per dati eterogenei si considerano valori di  $CV < 0,5$  e  $M < 1$ .

### **3.8 ANALISI DEI DATI**

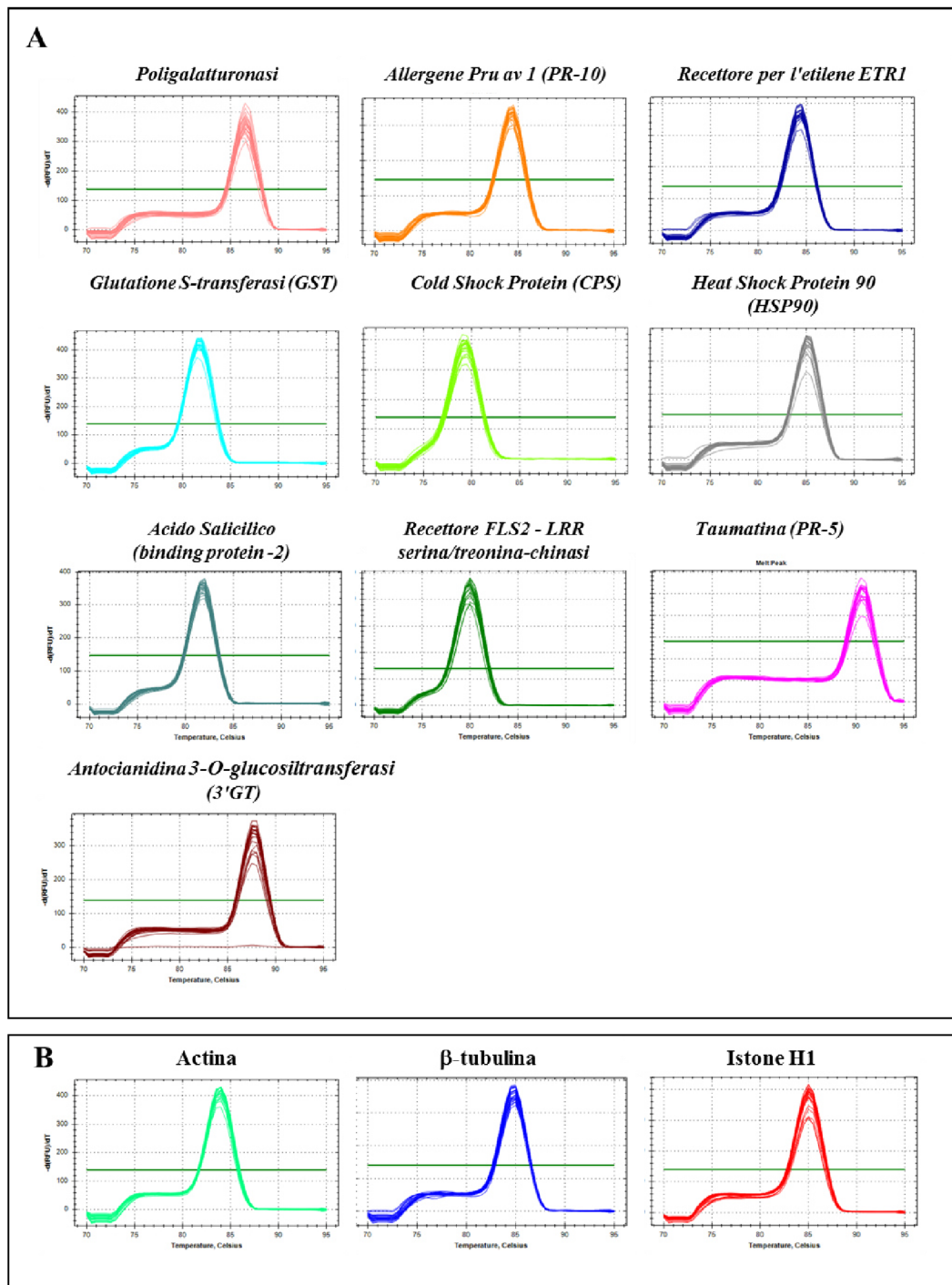
Lo studio di espressione genica è stato eseguito utilizzando il metodo  $-\Delta\Delta Ct$ . Secondo questo metodo, l'espressione dei geni target è stata valutata come cambiamento medio nell'espressione genica, normalizzata a un gene di riferimento endogeno, e rispetto ai controlli non trattati. Per ogni singolo campione, sono state analizzate due repliche biologiche. Per ogni replica biologica sono state effettuate due repliche tecniche. Ogni replicato sperimentale è stato determinato da due replicati tecnici ( $n = 4$ ). I dati di espressione di ciascun campione sono mostrati come  $media \pm SD$  e sono stati statisticamente valutati utilizzando il metodo ANOVA, seguito dal test a intervallo multiplo di Duncan, a  $p \leq 0,05$ .

## **4 RISULTATI**

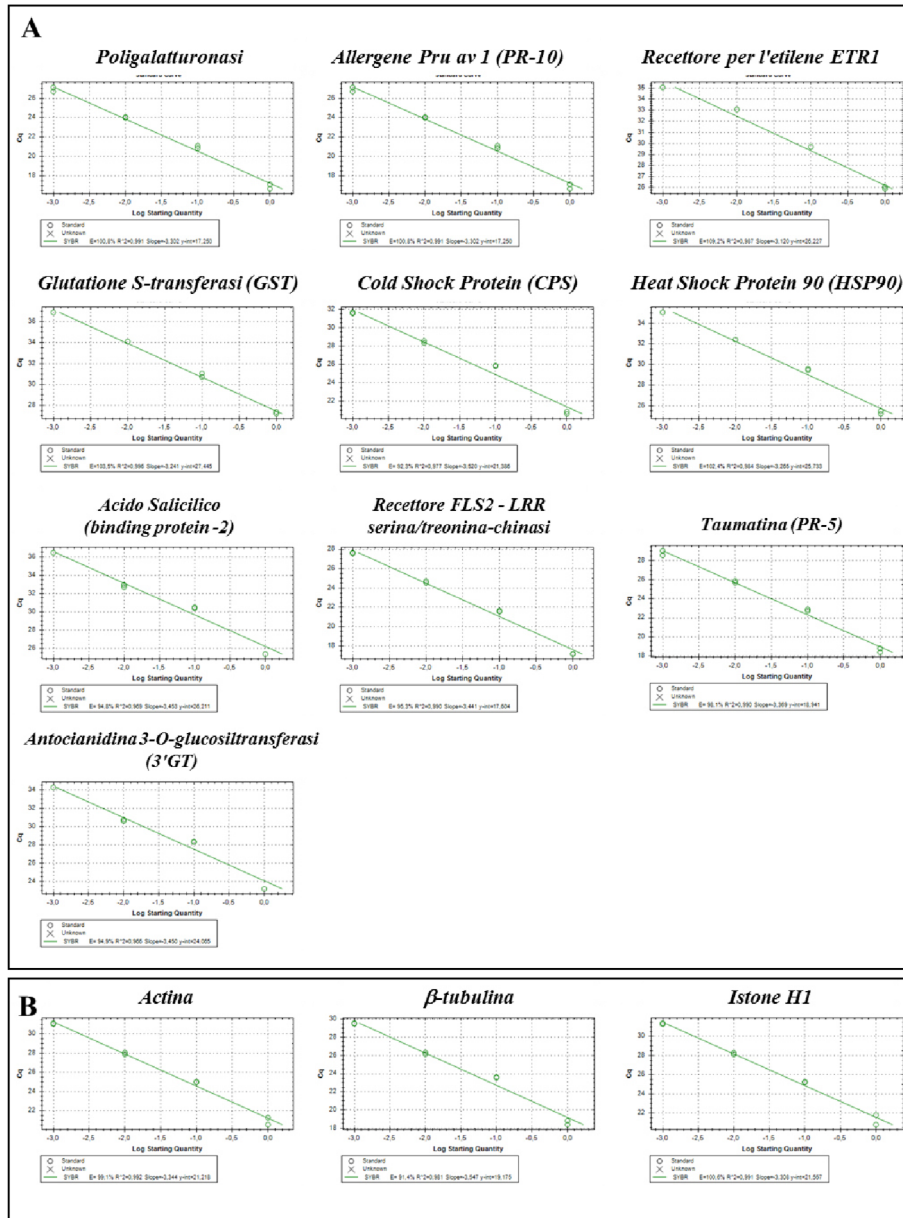
### **4.1 VALIDAZIONE DEI PRIMERS**

I primers selezionati per lo studio in RT-qPCR hanno evidenziato curve di fusione a singolo picco riconducibili agli ampliconi selezionati. Ciò ha confermato l'omogeneità e la specificità dei primers selezionati sia per i geni target che per i geni referenti (Figura 2A e B). Nessuna amplificazione è stata osservata in uno qualsiasi dei test di controllo. Ciò ha confermato che i campioni erano privi di contaminazione da DNA genomico o RNA (dati non mostrati).

Le curve standard di riferimento hanno evidenziato un'efficienza di amplificazione (E) variabile dal 91,4% al 109,2%, secondo l'analisi della curva standard in RT-qPCR di ciascuna coppia di primer specifici per il gene (Figura 3 A e B). Tale variazione è stata considerata ottimale e inclusa nel range stabilito dal protocollo MIQE di 90-110% (Bustin et al., 2010).



**Figura 2.** Curve di dissociazione relative all'amplificazione in RT-qPCR dei geni target (A) e referenti (B). La specificità dei primers utilizzati è evidenziata dalla presenza di un unico picco caratteristico per ognuno dei geni analizzati. La foto rappresenta l'amplificazione contemporanea dei campioni di ogni trattamento.



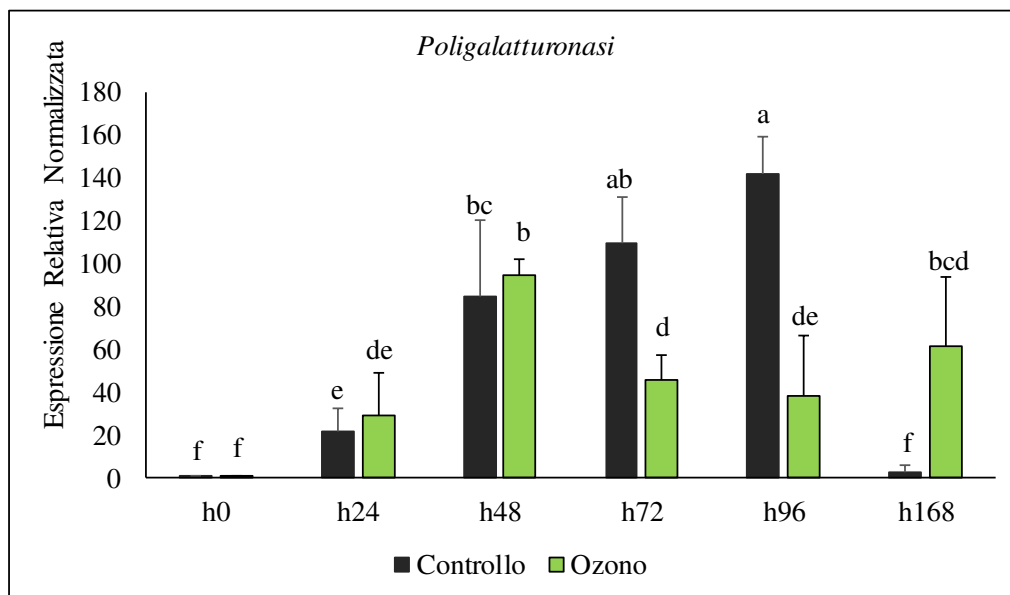
**Figura 3.** Curva standard di amplificati in RT-qPCR relativa ai geni target (A) e ai geni referenti (B). Ogni curva è stata ottenuta dall'amplificazione contemporanea di un pool di cDNA dei campioni diluito 1:10, da 1 a 10<sup>-3</sup>. Ogni curva standard mostra il ciclo soglia di quantificazione (Cq) sull'asse y, e la quantità di cDNA sull'asse x. La slope, i valori di efficienza (E), l'intercetta-y e i valori dei coefficienti di correlazione, vengono visualizzati per fornire informazioni sull'esecuzione della reazione. Ogni punto della curva è la risultante di due repliche tecniche. L'efficienza (E) delle curve varia da 91.5% a 109 %.

## 4.2 VALIDAZIONE DEI GENI REFERENTI

La convalida dei tre geni referenti, actina, istone H1 e  $\beta$ -tubulina secondo il metodo geNorm, non ha mostrato differenze all'interno dei trattamenti. L'uso contemporaneo dei tre geni ha evidenziato valori di coefficiente di variazione (CV) pari a 0,3608 e di stabilità, (M) pari a 0,9024. In questo contesto il gene meno stabile è risultato essere l'istone H1 con valori di CV di 0,5412 e valori di M di 1,0577. L'eliminazione del gene istone H1 ha mostrato valori medi di CV di 0,2033 e quelli di M di 0,523. Quindi il gene più stabile è risultato essere la  $\beta$ -tubulina, con valori di CV = 0,182 e di M = 0,4916. Per l'indagine su pesche trattate con ozono, la  $\beta$ -tubulina è risultato essere il gene più stabile.

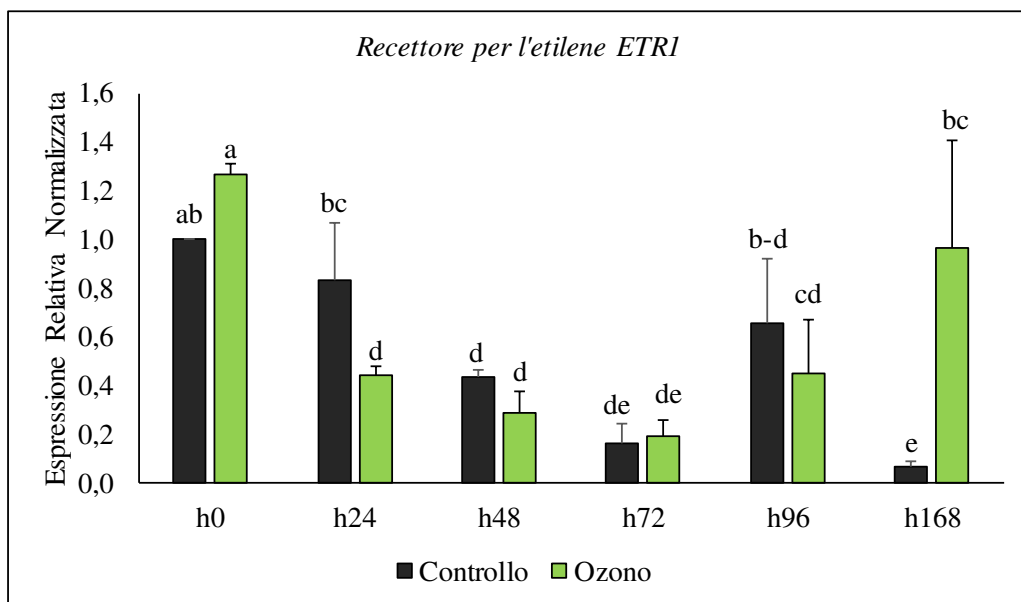
### 4.3 ESPRESSIONE GENICA

***Poligalatturonasi*** – I valori di espressione genica relativi alla *poligalatturonasi* sono invariati ai tempi, (h = ore), h0, h24 e h48 dalla fine del trattamento con l’ozono quando confrontati con il controllo ai medesimi tempi. Variazione di espressione significativi si sono osservati ai tempi h72 e h96 dal trattamento. Relativamente a questi due tempi l’espressione della poligalatturonasi diminuisce in modo significativo rispettivamente di 2,37 e 3,6 volte nelle pesche trattate rispetto ai controlli. Al tempo 168 h dalla fine del trattamento con l’ozono si osserva un significativo cambio di tendenza con incremento significativo di 16,3 volte nei campioni trattati rispetto ai controlli (Figura 4).



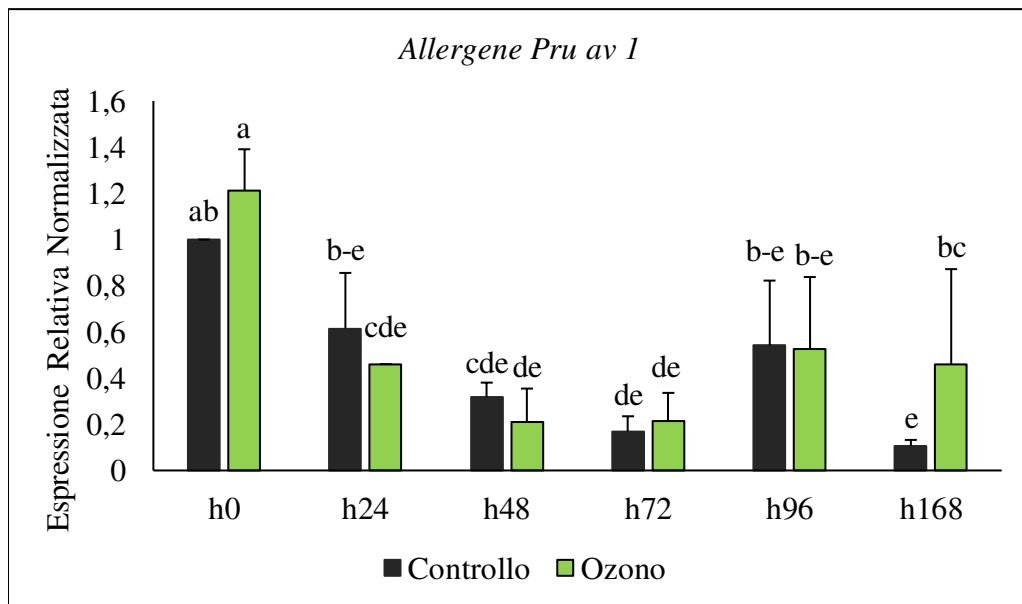
**Figura 4.** Espressione genica relativa del gene *poligalatturonasi*, osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatura ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan’s  $P \leq 0.05$ ).

**Recettore per l'etilene *ETR1*** - I valori di espressione del gene recettore dell'etilene *ETR1* mostrano dei cambiamenti significativi al tempo h24 dopo il trattamento con ozono. In questo caso il valore di espressione nelle pesche trattate si riduce significativamente di 1,86 volte rispetto al controllo. Al tempo h168 si è osservato un cambio di tendenza e l'espressione del gene codificante per il recettore *ETR 1* incrementa di 14,7 volte rispetto al controllo (Figura 5).



**Figura 5.** Espressione genica relativa del gene codificante per il *recettore per l'etilene ETR1*, osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatura ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's  $P \leq 0.05$ ).

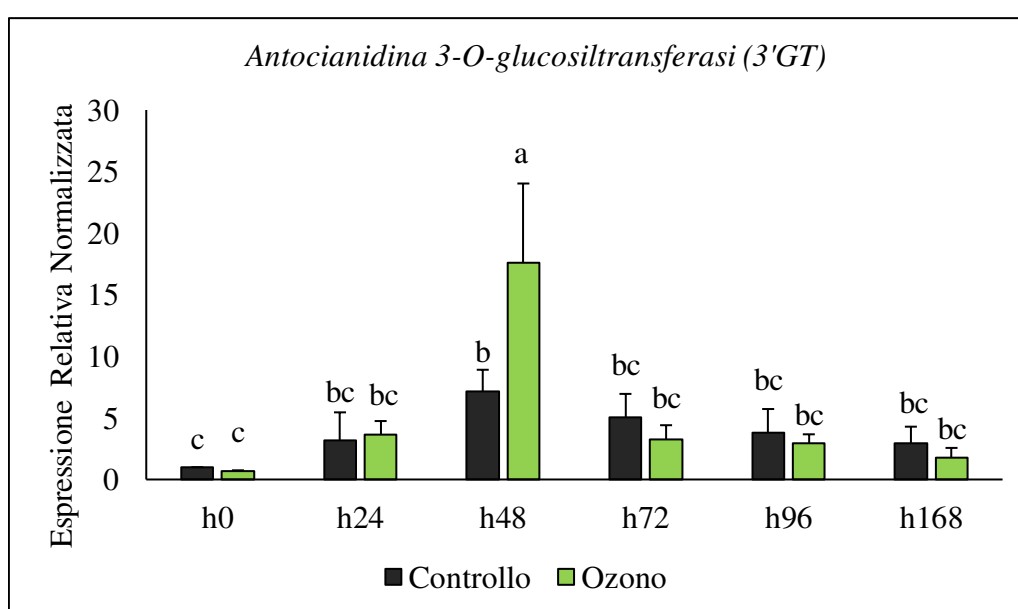
*Allergene pru av1* - I valori di espressione del gene *allergene Pru av 1*, codificante per una proteina associata alla patogenesi nella classe PR-10, non sono significativamente differenti tra pesche sottoposte al trattamento con ozono e le pesche non trattate, fino al tempo h168 dopo l'inizio della simulazione della shelf life. Le pesche trattate a questo tempo, mostrano livelli di espressione del gene 4,3 volte superiori rispetto ai controlli (Figura 6).



**Figura 6.** Espressione genica relativa del gene *Pru av 1*, osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatura ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's  $P \leq 0.05$ ).

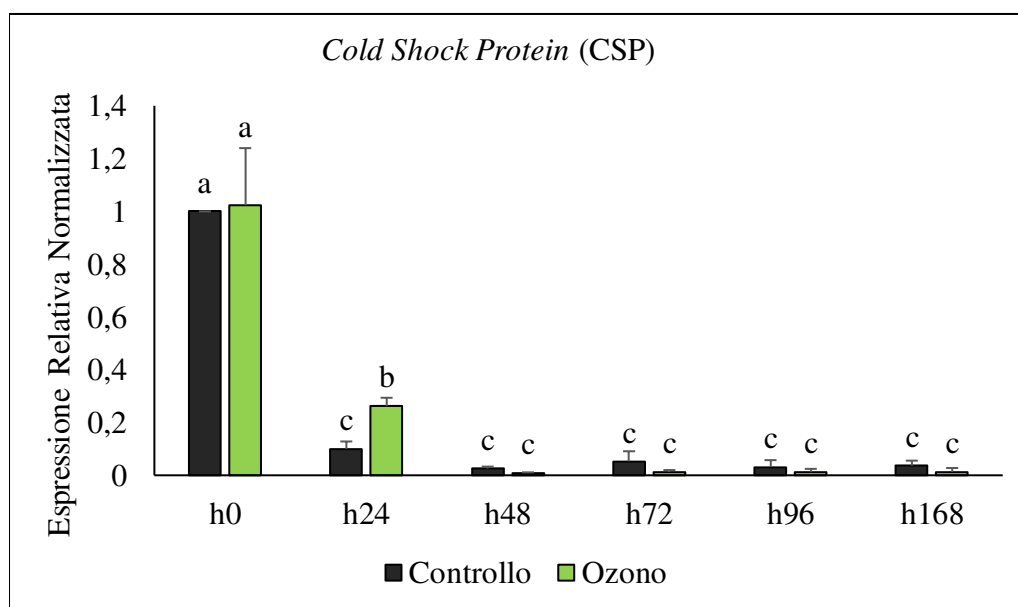


*Antocianidina 3-O-glucosiltransferasi (3'GT)* - I valori di espressione del gene *3'GT* coinvolto nella via dei fenilpropanoidi si presentano significativamente differenti in pesche sottoposte al trattamento con ozono, rispetto a quelli non trattati, soltanto due giorni dopo l'inizio della simulazione della shelf life, al tempo h48, per poi tornare ad avere livelli di espressione statisticamente non dissimili, in entrambe le tesi. In particolare, al tempo h48, i frutti trattati con ozono hanno un livello di espressione del gene 2,45 volte maggiore rispetto ai controlli (Figura 7).



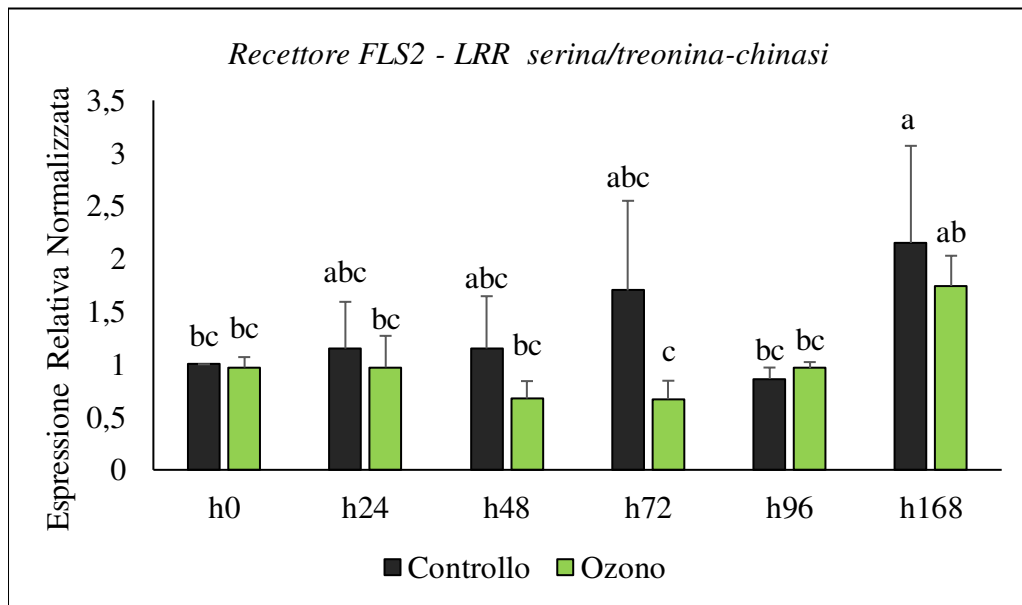
**Figura 7.** Espressione genica relativa del gene *antocianidina 3-O-glucosiltransferasi (3'GT)*, osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatura ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's  $P \leq 0.05$ ).

**Cold Shock Protein (CSP)** – Il gene *cold shock protein (CSP)* coinvolto nella risposta cellulare agli stress da freddo mostra un incremento dell'espressione genica associata al trattamento con ozono al tempo h24, dopo un giorno di shelf life, di 2,6 volte superiore rispetto ai controlli (Figura 8).



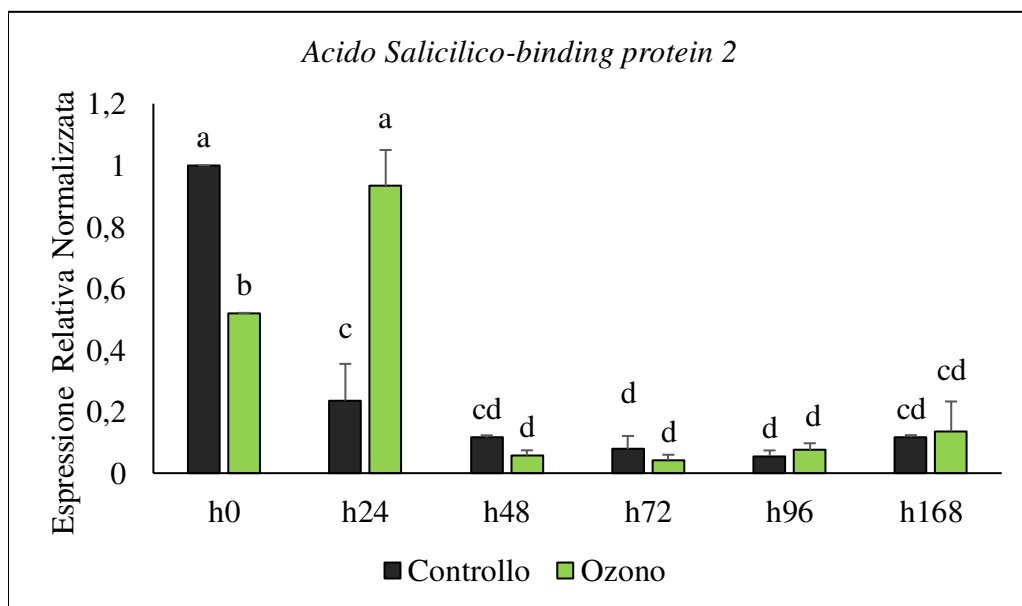
**Figura 8.** Espressione genica relativa del gene *cold shock protein (CSP)*, osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatura ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's  $P \leq 0.05$ ).

**Recettore *FLS2* - *LRR serina/treonina-chinasi*** – Relativamente ai dati di espressione del recettore *FLS2* - *LRR serina/treonina-chinasi* non si evidenziano delle differenze significative rispetto ai controlli in nessuno dei tempi analizzati durante la simulazione della shelf life (Figura 9).



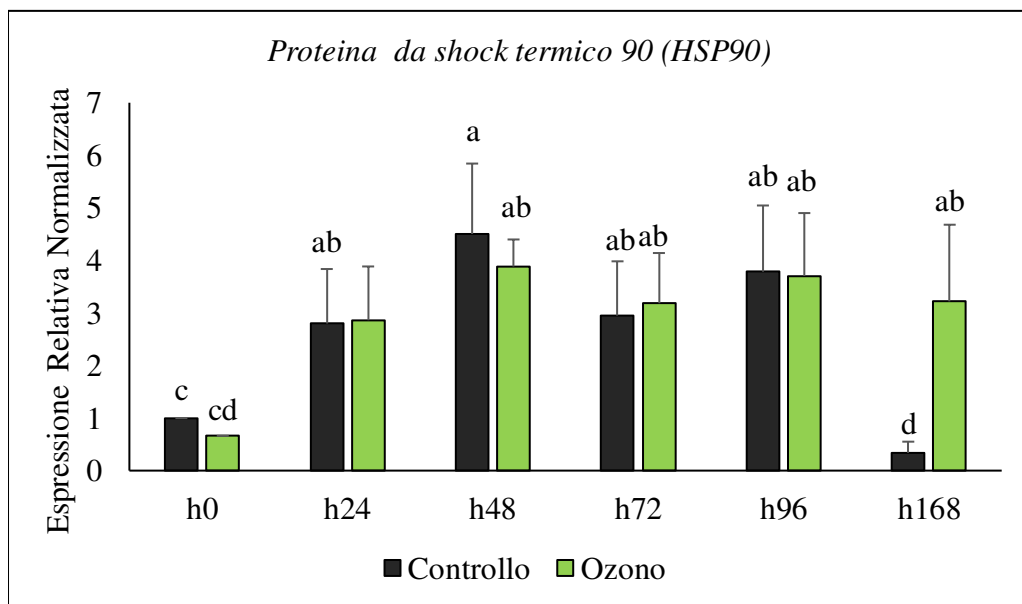
**Figura 9.** Espressione genica relativa del gene codificante per la proteina relativa al recettore *FLS2* - *LRR serina/treonina-chinasi*, osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatura ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's  $P \leq 0.05$ ).

**Acido salicilico – *binding protein 2*** – Per quanto riguarda il gene *binding protein 2* coinvolto nella sintesi dell'acido salicilico, si evidenzia un livello di espressione quasi doppio nel controllo, rispetto al trattato con ozono, al tempo h0; mentre a distanza di 24 ore, si osserva un'inversione di tendenza perché il livello di espressione del gene risulta essere 4 volte superiore nei frutti trattati, rispetto ai non trattati. Nei prelievi successivi, a h48, h72, h96 e h168 dal trattamento, i valori di espressione delle pesche sottoposte al trattamento con ozono non si differenziano rispetto ai controlli non trattati (Figura 10).



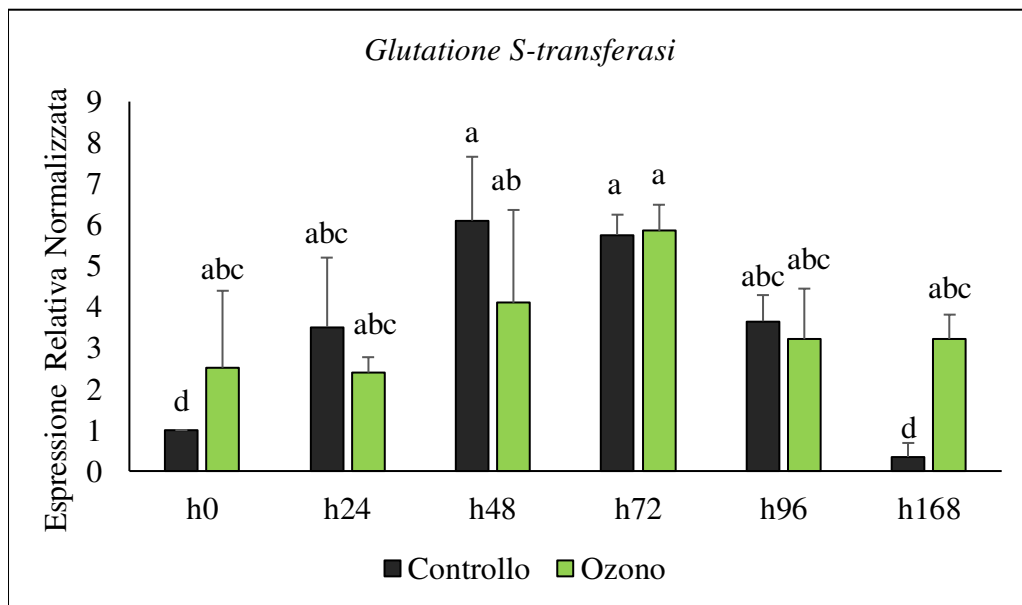
**Figura 10.** Espressione genica relativa del gene codificante per la proteina relativa all'acido Salicilico (*binding protein -2*), osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatura ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's  $P \leq 0.05$ )

**Heat Shock Protein 90 (HSP90)**– Il valore di espressione genica relativo al gene *HSP90*, coinvolta negli stress termici, si differenzia nelle pesche trattate con ozono rispetto ai controlli solo dopo una settimana dal trattamento, al tempo h168, con valori di espressione di 9,7 volte più elevati rispetto al controllo non trattato. L’ozonoterapia mantengono elevata l’espressione del gene, mentre negli altri questo valore scende notevolmente (fino a un decimo del trattato) (Figura 11).



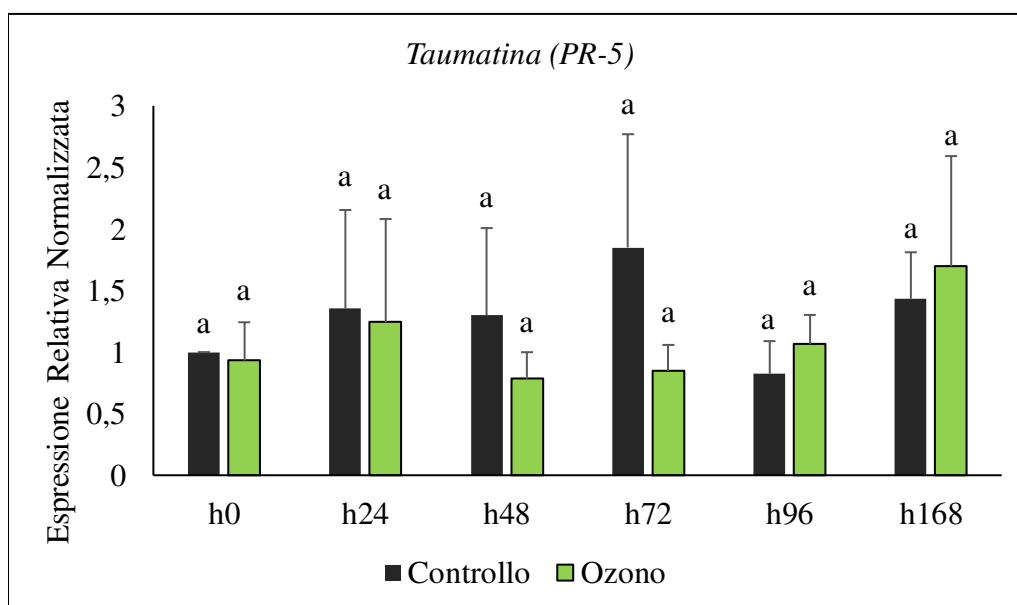
**Figura 11.** Espressione genica relativa del gene *HSP90*, osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatura ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan’s  $P \leq 0.05$ ).

**Glutatione S-transferasi** – Per quanto concerne il gene *glutatione S-transferasi*, si evidenzia una differenza significativa, in termini di espressione genica, nelle pesche trattate ai tempi h0 e h168. Nei due tempi, i frutti trattati con ozono hanno un livello di espressione che incrementa rispettivamente di 2,52 e 9,47 (Figura 12).



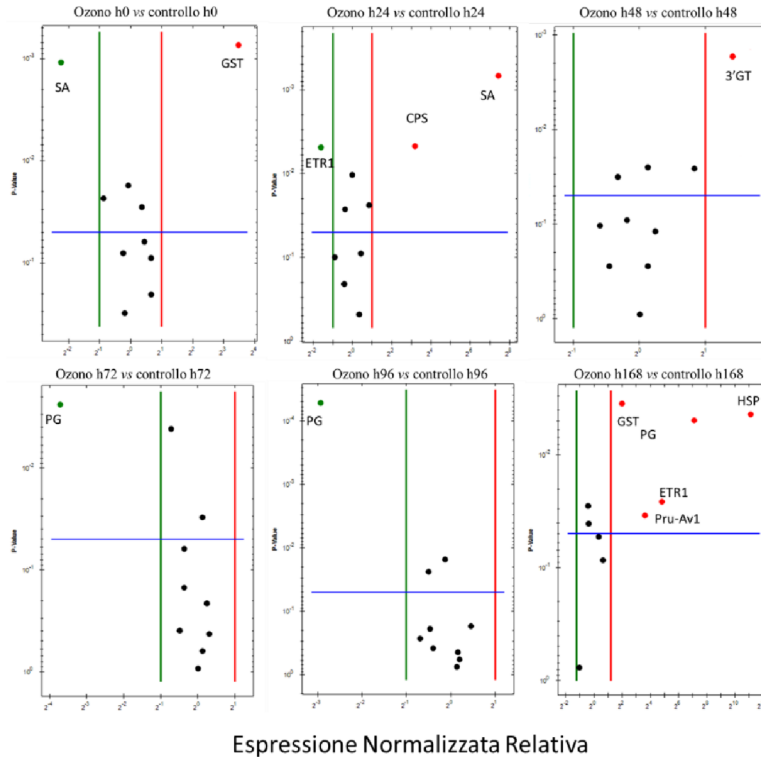
**Figura 12.** spressione genica relativa del gene *glutatione S-transferasi*, osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatutra ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's  $P \leq 0.05$ ).

**Taumatina (PR-5)** – L'espressione genica del gene *taumatina*, coinvolta come proteina associata alla patogenesi nella classe PR-5, non sembra essere influenzata dalle applicazioni di ozono. Non viene mai riscontrata una differenza significativa durante la simulazione della shelf life fra le pesche sottoposte ad ozonoterapia e quelle conservate in cella refrigerata (Figura 13).



**Figura 13.** Espressione genica relativa del gene *taumatina* (PR-5), osservata in pesche trattate con ozono per 25 giorni, successivamente poste a temperatura ambiente e prelevate a 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h (ore) dalla fine del trattamento. Il grafico rappresenta la media + SD di due repliche biologiche e 2 repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's  $P \leq 0.05$ ).

L'analisi effettuata con il software Volcano Plot, conferma che l'espressione genica relativa dei geni sottoespressi e sovraespressi nelle pesche trattate con ozono confrontati con i controlli hanno un valore di P value > a 0.005 (Figura 14).



**Figura 14.** Rappresentazione volcano plot dei geni differenzialmente espressi nelle pesche trattate con ozono rispetto ai controlli ai diversi tempi analizzati. Asse x:  $\log_2FC$ , fold change = 2; asse y:  $-\log_{10}$  del valore  $P \geq 0,005$ , che mostra valori significativamente statistici sopra la linea blu. Ogni punto corrisponde a un gene, in verde i geni sottoespressi, in rosso quelli sovraespressi rispetto al controllo. I punti neri inclusi tra le linee verdi e rosse non sono differenzialmente espressi rispetto al controllo. I rossi sovraespressi, i verdi sottoespressi. (PG = poligalatturonasi; ETR1 = recettore ETR1 dell'etilene, HSP = Heat Shock Protein 90; CSP = Cold Shock Protein; SA = proteina binding 2 per l'acido salicilico; Pru av 1 = e l'allergene Pru av 1; GST = glutatione S-transferasi; 3'GT = l'antocianidina 3-O-glucosiltransferasi (3'GT).



## **5 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI**

Le infezioni fungine rappresentano la principale causa di deterioramento di frutta in postraccolta (Romanazzi et al., 2013; Feliziani et al., 2015). Sebbene la difesa chimica abbia ancora un ruolo di rilievo nella protezione dei marciumi in postraccolta, da anni la sperimentazione è orientata verso la messa a punto di sistemi di difesa alternativi a quelli chimici. In particolare, in questo momento storico c'è la necessità di progettare un'agricoltura che sia sostenibile, rispondente alla crescente attenzione dei consumatori nei riguardi della sicurezza e della qualità degli alimenti e che si avvalga dell'utilizzo di sistemi in grado di sanificare i prodotti alimentari senza incorrere in problematiche tecniche, legate ad esempio allo sviluppo di ceppi di patogeni resistenti.

Tra i sistemi innovativi, l'utilizzo di ozono, molecola segnalata come adatta alla sanificazione di superfici alimentari, può rappresentare una alternativa importante ai mezzi chimici. L'ozono infatti è in grado di svolgere una duplice azione nel controllo delle patologie in postraccolta: un'azione disinfettante diretta, dovuta soprattutto all'interazione con la membrana cellulare dei microrganismi e una indiretta data la sua capacità di ossidare molecole organiche come l'etilene, il quale è coinvolto nei processi fisiologici di maturazione e senescenza dei frutti, rendendo di fatto i frutti meno suscettibili all'attacco di agenti di marciumi. L'ozono gassoso è stato applicato con successo per la conservazione di frutti come mele, papaie, agrumi, pere e fragole (Minas et al., 2012; Miller et al., 2013). Tuttavia, recenti ricerche hanno evidenziato come gli effetti benefici dell'azione dell'ozono possano variare notevolmente in relazione al tipo di somministrazione, se da solo o combinato ad altri composti e a differenti temperature di utilizzo (Jia et al., 2016).

In questo lavoro di tesi ci siamo impegnati nella messa a punto di un sistema utile per lo studio dell'espressione genica in pesco. Con questo obiettivo, è stato impostato un protocollo analitico basato sull'analisi RT-qPCR utilizzando il metodo di calcolo comparativo  $-\Delta\Delta Cq$  (Bustin et al., 2010) e definendo i geni di riferimento appropriati per normalizzare il dato di espressione per l'analisi dell'RNA estratto da frutti di pesco, sia in condizioni di stress da ozono che in assenza di stress. È infatti noto che per lo studio di espressione genica la stabilità dei geni di riferimento varia con l'ambiente, la crescita della pianta, il diverso tessuto vegetale e lo stress biotico e/o abiotico applicato (Bustin et al., 2010; Vandesompele et al., 2002; Sundaram et al., 2019). Pertanto, la normalizzazione dei dati rilevati in RT-qPCR utilizzando geni di riferimento adeguati è un prerequisito fondamentale per ottenere risultati affidabili.

Uno studio preliminare ci ha permesso di identificare la  $\beta$ -*tubulina* come il gene più stabile e il gene *istone H1* come quello con risultati di coefficiente di variabilità meno costanti. Sono state considerate sia le pesche sottoposte ad ozonoterapia che non trattate, evidenziando che non ci sono differenze tra le due tesi. Questo risultato differisce con quanto evidenziato in precedenza su fragola dove l'utilizzo di trattamenti differenti in postraccolta influenzava significativamente l'espressione dei geni referenti (Landi et al., 2014). La nostra indagine ha analizzato geni differenti rispetto a quelli presi in considerazione da Tong et al. (2009), su pesche non trattate, fornendo nuove opportunità per la comunità scientifica di scegliere i geni più appropriati per lo studio di espressione genica in pesco.

Per quanto riguarda i geni target analizzati, questo studio ha confermato un'effettiva influenza del trattamento con ozono nei riguardi dell'espressione dei geni coinvolti nel processo di maturazione e senescenza dei frutti. La pesca è un

tipico frutto climaterico, soggetta ad un rapido ammorbidimento dei tessuti e a una breve durata dopo la raccolta, il che rischia di influire negativamente sul suo valore di mercato (Barry et al., 2007; Osorio et al., 2013). Nei frutti carnosì di pesco, i principali cambiamenti associati alla maturazione influenzano il colore, la compattezza, il gusto e il sapore, aumentando non solo l'appetibilità, ma anche la suscettibilità al danno fisico, all'attacco dei parassiti dei frutti e l'accorciamento della durata di conservazione. In questo contesto è stata selezionata una sequenza genica relativa al gene *poligalatturonasi* con azione glicosilica. La poligalatturonasi infatti svolge un ruolo essenziale nel processo di maturazione della frutta; in particolare, ha un ruolo centrale nella degradazione della pectina durante l'ammorbidimento dei frutti (Qian et al., 2016). La maturazione e la senescenza dei frutti sono processi fisiologici regolati dall'ormone vegetale etilene. L'etilene promuove direttamente o indirettamente la trascrizione/traduzione di numerosi geni correlati alla maturazione, compresi quelli associati alla rottura della parete cellulare, alla biosintesi dei carotenoidi, allo sviluppo dell'aroma, nonché all'accumulo di pigmenti e all'ammorbidimento dei frutti (Giovannoni et al., 1989; Gapper et al., 2013). L'etilene viene percepito da una famiglia di recettori tra cui il recettore ETR1 (Schott-Verdugo et al., 2019), il cui gene è stato analizzato in questo studio. I risultati ci mostrano un'effettiva sotto espressione di entrambi i geni a partire da 24-48 ore fino alle 96 ore dal trattamento, per poi incrementare significativamente a 168 ore dal trattamento, durante la simulazione della shelf life. Questo risultato sembra suggerire che, relativamente alle condizioni applicate, l'efficacia dell'ozono in pesco nel contenere i processi di degradazione sia attivo nei primi giorni, mentre i processi associati alla maturazione e alla senescenza riprendono in modo significativo ad una settimana dal trattamento.

Questo tipo di andamento è stato osservato anche relativamente ad altri geni. Ad esempio, il pattern di espressione osservato per il gene codificante per la proteina HSP90 mostra un innalzamento dell'espressione del gene nelle pesche trattate con ozono a 168 ore dal trattamento. Le proteine HSP sono classificate in base al loro peso molecolare in HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP20 e piccoli HSP (HSPs) (Walters et al., 2013). Per tutte è nota la loro funzione come *chaperon* molecolari, fondamentali per il ripiegamento delle proteine e la prevenzione dell'aggregazione proteica irreversibile (Tyedmers et al., 2010; Walters et al., 2013). Le HSPs sono espresse massicciamente durante la risposta agli shock termici nelle piante (Tyedmers et al., 2010; Walters et al., 2013), ma è anche conosciuto il loro coinvolgimento come proteine sovraespresse all'inizio della maturazione (Goyal et al., 2012 ; Shukla et al., 2017). In pomodoro hanno la funzione di proteggere i frutti maturi da lesioni da raffreddamento (Ré et al., 2017). Sempre su pomodoro recentemente è stato dimostrato che l'etilene regola direttamente e/o indirettamente l'espressione dei geni HSPs (Mattoo et al., 2020). Un incremento nell'espressione del gene *HSP90*, concomitante ad un incremento del gene recettore *ETR1* per l'etilene, potrebbe suggerire su pesco un comportamento analogo a quello osservato su pomodoro.

Tra i geni analizzati associati agli stress termici, l'espressione del gene CSP subisce un incremento significativo a 24 ore nei frutti trattati, mentre rimane pressoché invariato nei tempi successivi, senza più manifestare differenze significative fra le tesi. Le proteine CSP riparano i danni subiti dalla cellula a causa di energetiche e rapide diminuzioni della temperatura agendo sui processi di trascrizione e su l'mRNA dei ribosomi più o meno danneggiati. Questo tipo di processo non sembra essere influenzato dal trattamento con ozono.

Un altro gene tra quelli analizzati che ha mostrato un incremento dell'espressione a h168 ore dal trattamento è il gene *glutathione S-transferasi*, codificante per un enzima ubiquitario e multifunzionale associato agli stress ossidativi. Tuttavia, la sua sovraespressione, può essere indotta da un ampio ventaglio di condizioni di stress, nelle quali rientra comunque lo stress biotico. I ruoli riconosciuti al *glutathione S-transferasi* sono la disintossicazione da sostanze tossiche grazie alla loro coniugazione con il glutathione, l'attenuazione dello stress ossidativo e la partecipazione al trasporto ormonale (Gullner et al., 2018). Per quanto riguarda la relazione dell'ozono con gli stress ossidativi è noto che decomponendosi rapidamente in fase acquosa può dare origine ad una serie di specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali l'anione radicale superossido ( $O_2^-$ ), il radicale idrossilico ( $HO\cdot$ ) ed il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), che causano alterazioni della struttura e della funzione delle macromolecole biologiche (Laisk et al., 1989; Sarti et al., 2002). Il coinvolgimento dei ROS nei meccanismi di difesa (Herrera-Vásquez et al., 2015), è stato analizzato in molteplici lavori. Nel presente lavoro sperimentale, l'attivazione del gene codificante per il *glutathione S-transferasi* è variabile nel tempo: incrementa al tempo h0, indicando inizialmente un probabile coinvolgimento di questo gene nell'azione dell'ozono, mentre l'incremento dell'espressione osservata a 168 ore dal trattamento potrebbe essere associato a processi di stress in atto nel frutto.

Per quanto riguarda l'analisi dei geni più specificatamente associati ai processi di difesa, i risultati sono difficilmente interpretabili. Se da un lato il gene *FLS2-LRR serina/treonina-chinasi*, che costituisce il recettore nel riconoscimento dei modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP) (Chakraborty et al., 2019), non risulta mai coinvolto dall'azione dell'ozono, si osserva invece una modulazione iniziale del

gene codificante per la *binding protein 2* dell'acido salicilico. L'espressione di questo gene nei frutti sottoposti ad ozonoterapia è minore al tempo 0, rispetto ai non trattati, ma incrementa in modo significativo a 24 ore dal trattamento.

In riferimento a quanto concerne i geni codificanti per le proteine associate alla patogenesi, sono state prese in considerazione il gene *taumatina* e l'allergene *Pru av1*. In particolare l'espressione della prima non viene mai influenzata dal trattamento con l'ozono in pesco. La sintesi delle proteine simili alla taumatina, è indotta nelle piante in risposta ad infezione da agenti patogeni, elicitori, stress e segnali di sviluppo delle piante. La sua azione come proteina PR è nota e classificata nella classe PR-5 (Liu et al., 2010). Mentre, per il gene *allergene Pru av1* (proteina classificata nella classe delle PR-10) si osserva un incremento dell'espressione a 168 ore dal trattamento. L'allergene principale della pesca, *Pru av 1*, è stato trovato altamente espresso nella buccia del frutto nella fase di indurimento, quando i frutti perdono transitoriamente la loro suscettibilità al patogeno fungino *Monilinia* spp. (Zubini et al., 2009). Allo stesso modo, il gene *antocianidina 3-O-glucosiltransferasi (3'GT)*, coinvolto nella via metabolica dei fenilpropanoidi, incrementa l'espressione solo a 48 h dal trattamento.

Alla luce dei risultati ottenuti, si può concludere dicendo che la panoramica fornita dall'analisi dell'espressione genica non chiarisce esattamente se l'ozono applicato in queste condizioni su pesco sia in grado di attivare la risposta immunitaria della pianta. Lo studio di altri geni coinvolti nei processi associati alla difesa in pesco potrà chiarire questo aspetto. Sicuramente l'applicazione dell'ozono può ridurre in maniera indiretta la suscettibilità ai marciumi, ad esempio rallentando i processi di maturazione e senescenza. D'altro canto, i dati sull'efficacia dell'ozono nel contenimento della malattia, non inclusi in questo

lavoro di tesi, mostrano che l'ozono ha una capacità inibitoria nei confronti del patogeno correlati ai metodi di applicazione (dati non mostrati). L'ozono rappresenta sicuramente una molecola interessante per diverse caratteristiche fisiche, chimiche e tecnologiche. Lo studio condotto per questo lavoro di tesi suggerisce che un ruolo cardine rimane quello associato alla riduzione della senescenza dei frutti quindi alla riduzione delle condizioni necessarie per lo sviluppo dei marciumi in postraccolta, obiettivo concreto del progetto PSR Marche ZeroSprechi. Ulteriori studi sono necessari per chiarire i meccanismi che stanno alla base dell'azione della molecola e saranno utili per la messa a punto di strategie di difesa o di conservazione dei frutti in postraccolta rispondenti alle moderne esigenze.

## **6 BIBLIOGRAFIA**

- (PLH), E. P. on P. H. (2011). Pest risk assessment of *Monilinia fructicola* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal*, 9(4), 2119. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2119>
- Abate, D., Pastore, C., Gerin, D., De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Pollastro, S., & Faretra, F. (2018). Characterization of *Monilinia* spp. Populations on Stone Fruit in South Italy. *Plant Disease*, 102(9), 1708–1717. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1314-RE>
- Adaskaveg, J. E., Feliciano, A. J., & Ogawa, J. M. (1991). Evaluation of the cuticle as a barrier to penetration by *Monilinia fructicola* in peach fruits (abstr.). *Phytopathology*, 81, 1150.
- Aslam, R., Alam, M. S., & Saeed, P. A. (2020). Sanitization Potential of Ozone and Its Role in Postharvest Quality Management of Fruits and Vegetables. *Food Engineering Reviews*, 12(1), 48–67. <https://doi.org/10.1007/s12393-019->

- Balaž, J. (2000). *Monilia* spp.-kao parazit voćaka. *Biljni Lekar*, 28(2–3), 155–162.
- Barry, J. A., Park, K., & Weybright, R. (2007). Beyond growing—strategies and technologies that transform products to meet market demand. *Stewart Postharvest Review*, 3(1), 1–5.
- Bustin, S. A., Beaulieu, J.-F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S. B., Olsvik, P. A., Penning, L. C., & Toegel, S. (2010). *MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments* (pp. 1–5). BioMed Central.
- Byrde, R. J. W., & Willetts, H. J. (2013). *The brown rot fungi of fruit: their biology and control*. Pergamon Press.
- Cal, A. De, & Melgarejo, P. (1999). Effects of Long-Wave UV Light on *Monilinia* Growth and Identification of Species. *Plant Disease*, 83(1), 62–65. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.1.62>
- Casals, C, Elmer, P. A. G., Viñas, I., Teixidó, N., Sisqueña, M., & Usall, J. (2012). The combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 to control brown rot infections caused by *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biology and Technology*, 64(1), 126–132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.06.004>
- Casals, Carla, Teixidó, N., Viñas, I., Silvera, E., 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(1), 51–63. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9628-7>
- Ceredi, G., & Mari, M. (2011). Jewelry of stone fruits, prevention and protection



- for proper management. *Informatore Agrario*, 67(23), 57–62.
- Chakraborty, S., Nguyen, B., Wasti, S. D., & Xu, G. (2019). Plant leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RK): structure, ligand perception, and activation mechanism. *Molecules*, 24(17), 1–37.
- 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(10), 2850–2855. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz207>
- Deepak, S. A., Kottapalli, K. R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K. S., Iwahashi, H., Masuo, Y., & Agrawal, G. K. (2007). Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current Genomics*, 8(4), 234–251.
- 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(8), 853–857. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.8.853>
- 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.
- Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2000). Early Brown Rot Infections in Sweet Cherry Fruit Are Detected by *Monilinia*-Specific DNA Primers. *Phytopathology*®, 90(2), 171–178. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.2.171>
- Gapper, N. E., McQuinn, R. P., & Giovannoni, J. J. (2013). Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 82(6), 575–591.
- Giovannoni, J. J., DellaPenna, D., Bennett, A. B., & Fischer, R. L. (1989). Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening

inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *The Plant Cell*, 1(1), 53–63.

Goffi, V., Zampella, L., Forniti, R., Petriccione, M., & Botondi, R. (2019). Effects of ozone postharvest treatment on physicochemical and qualitative traits of *Actinidia chinensis* ‘Soreli’ during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(13), 5654–5661. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9823>

Goyal, R. K., Kumar, V., Shukla, V., Mattoo, R., Liu, Y., Chung, S. H., Giovannoni, J. J., & Mattoo, A. K. (2012). Features of a unique intronless cluster of class I small heat shock protein genes in tandem with box C/D snoRNA genes on chromosome 6 in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 235(3), 453–471.

Gullner, G., Komives, T., Király, L., & Schröder, P. (2018). Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1836.

Habibi Najafi, M. B., & Haddad Khodaparast, M. H. (2009). Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. *Food Control*, 20(1), 27–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.010>

Hailu, G., & Derbew, B. (2015). Extent, causes and reduction strategies of postharvest losses of fresh fruits and vegetables—A review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5(5), 49–64.

Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., & Pla, M. (2003). Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry*, 323(2), 164–170.

Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes

- expression. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–9.
- Hill, A. G. (1982). Historical background, properties and applications. *Handbook of Ozone Technology and Applications*, 1, 1–37.
- Hoigné, J. (1998). Chemistry of aqueous ozone and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. In *Quality and treatment of drinking water II* (pp. 83–141). Springer.
- Holb, I. J. (2006). Possibilities of brown rot management in organic stone fruit production in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 12(3), 87–91.
- Holtz, B. A., Michailides, T. J., & Hong, C. (1998). Development of Apothecia from Stone Fruit Infected and Stromatized by *Monilinia fructicola* in California. *Plant Disease*, 82(12), 1375–1380.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.12.1375>
- Hong, C., & Michailides, T. J. (1999). Mycelial growth, sporulation, and survival of *Monilinia fructicola* in relation to osmotic potential and temperature. *Mycologia*, 91(5), 871–876.  
<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061092>
- Jia, J., Zhang, P., & Chen, L. (2016). The effect of morphology of  $\alpha$ -MnO<sub>2</sub> on catalytic decomposition of gaseous ozone. *Catalysis Science and Technology*, 6(15), 5841–5847.
- Kable, P. F. (1971). Significance of Short-term Latent Infections in the Control of Brown Rot in Peach Fruits. *Journal of Phytopathology*, 70(2), 173–176.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1971.tb03474.x>
- Kader, A. A. (2002). *Postharvest technology of horticultural crops* (A. A. Kader (ed.); Vol. 3311). University of California Agriculture and Natural Resources.

- Kalbasi-Ashtari, A. (2004). Effects of post-harvest pre-cooling processes and cyclical heat treatment on the physico-chemical properties of “Red Haven Peaches” and “Shahmiveh Pears” during cold storage. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*.
- Khadre, M. A., Yousef, A. E., & Kim, J.-G. (2001). Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. *Journal of Food Science*, *66*(9), 1242–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x>
- Kim, J. Do, Park, M. Y., Jeon, B. J., & Kim, B. S. (2019). Disease control efficacy of 32,33-didehydroroflomycoin produced by *Streptomyces rectiviolaceus* strain DY46 against gray mold of tomato fruit. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49779-6>
- Kim, J.-G., Yousef, A. E., & Dave, S. (1999). Application of Ozone for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review. *Journal of Food Protection*, *62*(9), 1071–1087. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.9.1071>
- Laisk, A., Kull, O., & Moldau, H. (1989). Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology*, *90*(3), 1163–1167.
- Landi, L, Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2016). Surveys for *Monilinia* spp. on stone fruit in central-eastern Italy. *Acta Horticulturae*, *1144*, 225–230. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.33>
- Landi, Lucia, 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*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3854-z>
- Landi, Lucia, Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2014). Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. *Journal of*

*Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3047–3056.

- Landi, Lucia, Murolo, S., & Romanazzi, G. (2019). Detection of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ in roots from Bois noir symptomatic and recovered grapevines. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38135-9>
- Landi, Lucia, 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(2), 145–148. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-19-0225-A>
- Langlais, B., Reckhow, D. A., & Brink, D. R. (1991). Practical application of ozone: Principle and case study. *Ozone in Water Treatment*,” Lewis Publishers. Chelsea, Mich, 133–316.
- Lauxmann, M. A., Brun, B., Borsani, J., Bustamante, C. A., Budde, C. O., Lara, M. V, & Drincovich, M. F. (2012). Transcriptomic Profiling during the Post-Harvest of Heat-Treated Dixiland *Prunus persica* Fruits: Common and Distinct Response to Heat and Cold. *PLOS ONE*, 7(12), e51052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051052>
- Liew, C. L., & Prange, R. K. (1994). Effect of Ozone and Storage Temperature on Postharvest Diseases and Physiology of Carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science Jashs*, 119(3), 563–567. <https://doi.org/10.21273/JASHS.119.3.563>
- Liu, J.-J., Sturrock, R., & Ekramoddoullah, A. K. M. (2010). The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports*, 29(5), 419–436.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data

- using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lurie, S. (1992). Controlled atmosphere storage to decrease physiological disorders in nectarines. *International Journal of Food Science and Technology*, 27(5), 507–514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb01217.x>
- Lurie, S., & Crisosto, C. H. (2005). Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest Biology and Technology*, 37(3), 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.04.012>
- Margosan, D. A., Smilanick, J. L., Simmons, G. F., & Henson, D. J. (1997). Combination of Hot Water and Ethanol to Control Postharvest Decay of Peaches and Nectarines. *Plant Disease*, 81(12), 1405–1409. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1405>
- Mari, M., Casalini, L., Baraldi, E., Bertolini, P., & Pratella, G. C. (2003). Susceptibility of apricot and peach fruit to *Monilinia laxa* during phenological stages. *Postharvest Biology and Technology*, 30(1), 105–109. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00138-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00138-8)
- Mari, M., Martini, C., Guidarelli, M., & Neri, F. (2012). Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biological Control*, 60(2), 132–140. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.013>
- Marquenie, D., Michiels, C. W., Geeraerd, A. H., Schenk, A., Soontjens, C., Van Impe, J. F., & Nicolaï, 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(2), 187–196. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00648-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00648-1)

- Martini, C, Spadoni, A., & Mari, M. (2013). First Report of Brown Rot Caused by *Monilinia fructicola* on Apple in Italy. *Plant Disease*, 97(5), 689. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0869-PDN>
- Martini, Camilla, & Mari, M. (2014). Chapter 7 - *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (*Monilinia Rot, Brown Rot*) (S. B. T.-P. D. Bautista-Baños (ed.); pp. 233–265). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00007-7>
- Mattoo, A. K., Upadhyay, R., & Tucker, M. (2020). Ethylene and RIPENING INHIBITOR modulate expression of SIHSP17. 7A, B class I small heat shock protein genes during tomato fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 11, 975.
- McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., Norred, W. P., Voss, K. A., Plattner, R. D., Kubena, L. F., & Phillips, T. D. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, 35(8), 807–820. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00052-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00052-5)
- Michailides, T. J., Morgan, D. P., & Felts, D. (2000). Detection and significance of symptomless latent infection of *Monilinia fructicola* in California stone fruits. *Abstr.) Phytopathology*, 90, S53.
- Miller, F. A., Silva, C. L. M., & Brandão, T. R. S. (2013). A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Engineering Reviews*, 5(2), 77–106.
- Minas, I. S., Tanou, G., Belghazi, M., Job, D., Manganaris, G. A., Molassiotis, A., & Vasilakakis, M. (2012). Physiological and proteomic approaches to address the active role of ozone in kiwifruit post-harvest ripening. *Journal of Experimental Botany*, 63(7), 2449–2464. <https://doi.org/10.1093/jxb/err418>

- Northover, J., & Cerkauskas, R. F. (2009). Detection and Significance of Symptomless Latent Infections of *Monilinia Fructicola* in Plums. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(1), 30–36. <https://doi.org/10.1080/07060669409500785>
- OSHA. (2019). *Ozone: OSHA Occupational Chemical Database*.
- Osorio, S., Scossa, F., & Fernie, A. (2013). Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–8.
- Palou, L., Smilanick, J. L., Crisosto, C. H., & Mansour, M. (2001). Effect of Gaseous Ozone Exposure on the Development of Green and Blue Molds on Cold Stored Citrus Fruit. *Plant Disease*, 85(6), 632–638. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.6.632>
- 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(6), 668. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0668A>
- Pi, Y., Schumacher, J., & Jekel, M. (2005). The Use of para-Chlorobenzoic Acid (pCBA) as an Ozone/Hydroxyl Radical Probe Compound. *Ozone: Science and Engineering*, 27(6), 431–436. <https://doi.org/10.1080/01919510500349309>
- Prusky, D. (2011). Reduction of the incidence of postharvest quality losses, and future prospects. *Food Security*, 3(4), 463–474. <https://doi.org/10.1007/s12571-011-0147-y>
- Puig, C. P., Dagar, A., Marti Ibanez, C., Singh, V., Crisosto, C. H., Friedman, H., Lurie, S., & Granell, A. (2015). Pre-symptomatic transcriptome changes during cold storage of chilling sensitive and resistant peach cultivars to elucidate chilling injury mechanisms. *BMC Genomics*, 16(1), 1–35. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1395-6>



- Qian, M., Zhang, Y., Yan, X., Han, M., Li, J., Li, F., Li, F., Zhang, D., & Zhao, C. (2016). Identification and expression analysis of polygalacturonase family members during peach fruit softening. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(11), 1–17.
- Razumovskii, S. D., & Zaikov, G. E. (1984). Ozone and its reactions with organic compounds. *Studies in Organic Chemistry*, *15*.
- Ré, M. D., Gonzalez, C., Escobar, M. R., Sossi, M. L., Valle, E. M., & Boggio, S. B. (2017). Small heat shock proteins and the postharvest chilling tolerance of tomato fruit. *Physiologia Plantarum*, *159*(2), 148–160.
- Ritchie, D. F. (2005). Brown rot of stone fruits. In *External factsheets* (p. unpaginated). APSnet.
- Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014). Chapter 4 - Botrytis cinerea (Gray Mold). In S. B. T.-P. D. Bautista-Baños (Ed.), *Postharvest Decay* (pp. 131–146). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1>
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., & Landi, L. (2013). Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, *75*, 24–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.07.007>
- 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*(1), 73–80. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00239-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00239-9)
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E., & Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and*

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.003>

- 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), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0452-3>
- Salami, P., Ahmadi, H., Keyhani, A., & Sarsaifee, M. (2010). Strawberry post-harvest energy losses in Iran. *Researcher*, *4*, 67–73.
- Sanhueza, D., Vizoso, P., Balic, I., Campos-Vargas, R., & Meneses, C. (2015). Transcriptomic analysis of fruit stored under cold conditions using controlled atmosphere in *Prunus persica* cv. “Red Pearl.” *Frontiers in Plant Science*, *6*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00788>
- Sarti, P., Avigliano, L., Görlach, A., & Brüne, B. (2002). Superoxide and nitric oxide–participation in cell communication. *Cell Death and Differentiation*, *9*(10), 1160–1162.
- Schott-Verdugo, S., Müller, L., Classen, E., Gohlke, H., & Groth, G. (2019). Structural model of the ETR1 ethylene receptor transmembrane sensor domain. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–14.
- Shukla, V., Upadhyay, R. K., Tucker, M. L., Giovannoni, J. J., Rudrabhatla, S. V., & Mattoo, A. K. (2017). Transient regulation of three clustered tomato class-I small heat-shock chaperone genes by ethylene is mediated by SIMADS-RIN transcription factor. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12.
- Sisquella, M., Casals, C., Picouet, P., Viñas, I., Torres, R., & Usall, J. (2013). Immersion of fruit in water to improve radio frequency treatment to control brown rot in stone fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *80*, 31–36.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.01.010>

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(5), 343–356. <https://doi.org/10.1080/01919510208901625>

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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.07.011>

Stahelin, J., & Hoigne, J. (1985). Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environmental Science and Technology*, 19(12), 1206–1213.

Sundaram, V. K., Sampathkumar, N. K., Massaad, C., & Grenier, J. (2019). Optimal use of statistical methods to validate reference gene stability in longitudinal studies. *PloS One*, 14(7), e0219440.

Suslow, T. (1998). Basics of ozone applications for postharvest treatment of fruits and vegetables. *Perishables Handling Quarterly*, 94, 9–11.

Tanou, G., Minas, I. S., Scossa, F., Belghazi, M., Xanthopoulou, A., Ganopoulos, I., Madesis, P., Fernie, A., & Molassiotis, A. (2017). Exploring priming responses involved in peach fruit acclimation to cold stress. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11933-3>

Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J., & Zhang, Z. (2009). Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-71>

Tyedmers, J., Mogk, A., & Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling

- protein aggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(11), 777–788.
- Tzortzakis, N., & Chrysargyris, A. (2017). Postharvest ozone application for the preservation of fruits and vegetables. *Food Reviews International*, 33(3), 270–315. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175015>
- 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(12), 2042–2050. <https://doi.org/10.1139/b98-183>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), 1–12.
- Villarino, M., Egüen, B., Lamarca, N., Segarra, J., Usall, J., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2013). Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 137(4), 835–845. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0292-6>
- Von Gunten, U. (2003). Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research*, 37(7), 1443–1467. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00457-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00457-8)
- Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263–1280.
- White, D. E., Pikulin, M. A., Gandck, T. P., & Friend, W. H. (1999). *Pulp bleaching reactor for dispersing high consistency pulp into a gaseous bleaching agent*

*containing ozone* (pp. 1–33). Google Patents.

- Whiteside, C., & Hassan, H. M. (1987). Induction and inactivation of catalase and superoxide dismutase of *Escherichia coli* by ozone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 257(2), 464–471. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90591-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90591-1)
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535.
- Wilson, C. L., Ghaouth, A. E. L., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Lu, J. Y., Khan, V., & Arul, J. (1994). Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease*, 78(9), 837–844.
- Wittig, H. P. P., Johnson, K. B., & Pscheidt, J. W. (1997). Effect of Epiphytic Fungi on Brown Rot Blossom Blight and Latent Infections in Sweet Cherry. *Plant Disease*, 81(4), 383–387. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.4.383>
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12), e103–e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh101>
- Zubini, P., Zambelli, B., Musiani, F., Ciurli, S., Bertolini, P., & Baraldi, E. (2009). The RNA hydrolysis and the cytokinin binding activities of PR-10 proteins are differently performed by two isoforms of the Pru p 1 peach major allergen and are possibly functionally related. *Plant Physiology*, 150(3), 1235–1247.
- Zuccolo, M., Kunova, A., Musso, L., Forlani, F., Pinto, A., Vistoli, G., Gervasoni, S., Cortesi, P., & Dallavalle, S. (2019). Dual-active antifungal agents containing strobilurin and SDHI-based pharmacophores. *Scientific Reports*,

## **7 RINGRAZIAMENTI**

Giunto alla conclusione di questo percorso di formazione, ringrazio il prof. Gianfranco Romanazzi, perché durante questi anni oltre ad essersi dimostrato sempre disponibile e professionale, mi ha dato tante opportunità di crescita, possibilità di mettermi in gioco e obiettivi da raggiungere, spronandomi sempre a dare il massimo e facendomi appassionare a questa disciplina delle Scienze Agrarie; ringrazio anche la dott.ssa Lucia Landi, la quale mi ha sostenuto e incoraggiato fin dall'inizio in questa di tesi, dedicandosi con passione alla buona riuscita di questo lavoro. Ringrazio inoltre la dott.ssa Yeimmy Yolima Peralta-Ruiz, sempre molto gentile e disponibile nel dispensare consigli e ad offrire aiuto con la sua esperienza.

Un grazie a tutti i compagni di corso della LM-SAT, in particolare Francesco, Selenia e Lucrezia, con i quali ho condiviso la maggior parte di questa avventura.

Un ringraziamento agli amici perchè ognuno di loro ha contribuito a rendere più bello questo cammino; soprattutto ringrazio Leonardo, con il quale sto condividendo lo stesso percorso di studi e quindi rappresenta per me un amico con cui è anche possibile il confronto e lo scambio di preziosi consigli.

A questo punto, il mio pensiero non può che essere rivolto alla mia famiglia, che dapprima mi ha incoraggiato e poi sostenuto durante questo importante capitolo della mia vita.

Il ringraziamento più caloroso è per la persona più importante della mia vita, Alessandra, che con amore, pazienza e fiducia, ha sempre trovato le parole giuste per essermi vicina e spingermi a dare il meglio di me stesso. Senza la sua presenza,

non sarei la persona che sono oggi e probabilmente non avrei neanche iniziato l'Università.