



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

CARATTERIZZAZIONE DEL
MICROBIOMA SU MELA, UVA E
FRAGOLA IN POSTRACCOLTA PER
L'INDIVIDUAZIONE DI TAXA
MICROBICI

*MICROBIOME CHARACTERIZATION ON
POSTHARVEST APPLE, GRAPE AND
STRAWBERRY FRUIT FOR THE
IDENTIFICATION OF MICROBIAL TAXA*

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
GIULIA MAURI

Relatore:
PROF.SSA LUCIA LANDI

Correlatore:
PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Alla mia mamma e al mio papà.
Grazie.

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	8
ABSTRACT.....	9
RIASSUNTO	10
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	12
1.1 Principali avversità della frutta in postraccolta.....	12
1.2 Patogeni fungini della frutta.....	13
1.3 Il microbioma.....	14
1.4 La metagenomica per lo studio del microbioma	16
CAPITOLO 2 SCOPO DELLA TESI	19
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI	20
3.1 Campionamento della frutta.....	20
3.2 Disegno sperimentale.....	21
3.3 Isolamento in vitro degli isolati funghi.....	22
3.4 Identificazione degli isolati fungini	22
3.4.1 Estrazione DNA fungino	23
3.4.2 Analisi PCR endpoint e elettroforesi	23
3.4.3 Sequenziamento con metodo Sanger	24
3.5 Analisi del microbioma.....	25
3.5.1 Estrazione DNA da frutta.....	25
3.5.2 Sequenziamento Shallow whole-metagenome shotgun.....	26
CAPITOLO 4 RISULTATI	28
4.1 Identificazione degli isolati fungini	28
4.2 Analisi del microbioma.....	30
CAPITOLO 5 DISCUSSIONE.....	40

CAPITOLO 6 CONCLUSIONI	45
BIBLIOGRAFIA	47

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 3-1: Provenienza e descrizione del materiale vegetale utilizzato per la prova sperimentale. 20

Tabella 4-1: Identificazione degli isolati fungini mediante analisi BLAST su banca genomica NCBI delle sequenze ITS amplificate tramite PCR end point da ciascun isolato. 30

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 3-1: Allestimento della prova sperimentale: posizionamento dei campioni nelle cassette per la conservazione a temperatura ambiente.	22
Figura 3-2: Ciclo termico della PCR end point utilizzata per l'analisi delle regioni ITS degli isolati fungini.	24
Figura 4-1: Specie fungine isolate da frutta. L'immagine mostra 4 specie fungine allevate in piastre Petri su substrato a base di Potato Dextrose Agar (PDA) per 7 giorni a temperatura ambiente e delle strutture fungine osservate al microscopio di A) <i>Cladosporium phaeospermum</i> ; B) <i>Alternaria alternata</i> ; C) <i>Penicillium expansum</i> ; D) <i>Botrytis cinerea</i>	28
Figura 4-2: Analisi elettroforetica dei frammenti amplificati con la PCR end point del DNA estratto dagli isolati fungini analizzato con i primers ITS1-ITS4 (White et al., 1990), NOTE: M= marker, la numerazione dei campioni è riportata nella tabella 4-1. Informazioni relative al mix1 e al mix2 sono riportate nel testo.	29
Figura 4-3: Abbondanza relativa dei microrganismi rilevati in relazione al regno di appartenenza nei campioni di uva, mela e fragola (Fra) analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti dove si sono sviluppati marciumi fungini (T1M) e in quelli sani (T1S) osservati entrambi dopo la conservazione a temperatura ambiente.	31
Figura 4-4: Abbondanza relativa dei 10 phyla principali emersi dall'analisi di gruppo dei campioni di uva, mela e fragola.	32
Figura 4-5: Abbondanza relativa dei 10 phyla principali nei campioni di uva, mela e fragola (Fra) analizzati nei campioni di uva, mela e fragola (Fra) analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti dove si sono sviluppati marciumi fungini (T1M) e in quelli sani (T1S) osservati entrambi dopo la conservazione a temperatura ambiente.	33
Figura 4-6: Analisi PCoA a livello di phylum basata sulla dissomiglianza di Bray-Curtis rilevata in uva, mela e fragola (Fra) analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti conservati a temperatura ambiente che hanno sviluppato marciumi fungini (T1M) e in quelli sani (T1S).....	34

Figura 4-7: Heatmap dei 35 generi principali nei campioni di uva, mela e fragola (Fra) analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti dove si sono sviluppati marciumi fungini (T1M) e in quelli sani (T1S) osservati entrambi dopo la conservazione a temperatura ambiente. L'intensità del colore rappresenta l'abbondanza di genere. Più il colore è vicino al blu, minore è l'abbondanza e più è vicino al rosso, maggiore è l'abbondanza. L'analisi del clustering gerarchico è stata misurata dalla distanza euclidea.... 36

Figura 4-8: Diagramma di venn che mostra il numero di specie condivise e uniche relativa alla popolazione microbica analizzata in uva (a) mela (b) e fragola (c); analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti in seguito allo sviluppo dei marciumi fungini (T1M) e in quelli sani (T1S) osservati entrambi dopo la conservazione a temperatura ambiente..... 38

Figura 4-9: Diagramma di venn che mostra il numero di specie condivise e uniche relativa alla popolazione microbica complessiva analizzata in uva (a) mela (b) e fragola (c)..... 39

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

BLAST	Basic local alignment search tool.
CTAB	Cetyl-trimethylammonium bromide.
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico.
ITS	Spaziatori interni trascritti del DNA ribosomiale.
NCBI	National center for biotechnology information.
NGS	Next generation sequencing.
PCR	Polymerase chain reaction.
PDA	Potato dextrose agar.
PVP	Iodopovidone.
S-WMS	Shallow whole-metagenome shotgun sequencing.
SDS	Sodio dodecile solfato.
TEA	Trietanolammina.
WMS	Whole-metagenome shotgun sequencing.

ABSTRACT

Food safety is fundamental in food businesses, as it ensures the protection of consumers from potential health risks. Among foods, fruit are acknowledged out for the benefits it brings to human health. Microbial communities associated with fruit impact to quality and pathogen resistance, but little is known about their composition during fruit development and storage. In this thesis work the fruit microbiome was analysed using the innovative technique Shallow whole-metagenome shotgun sequencing (S-WMS) in apple, cultivar 'Fuji', in strawberry cultivar 'Candonga' and grape cultivar 'Redglobe' acquired from three different supermarkets. For each fruit topology, three theses were analyzed: T0, relating to fruit directly from the supermarket, T1M, after storage at room temperature until the first rot appeared (for strawberries after 1 week, for grapes 2 weeks, and for apples 4 weeks, respectively), and T1S relating to fruit without decay symptom during storage. Alongside, from the T1M samples, the fungal pathogens affecting the fruits were isolated *in vitro* and characterized by ITS gene sequencing. *Botrytis cinerea* was isolated from strawberry, *Penicillium* and *Alternaria* species from grapes, *Penicillium expansum* and *Neonectria ditissima* from apple. The *Cladosporium* genus has been isolated from all types of fruit. The fungal specie isolated were confirmed by metagenomic study in T1M. The microbiome showed a different complexity among the fruit species and among the theses analysed. More of 95% of microbiome in T0 samples from strawberry and grape were bacterial species included in the *Pseudomonadota* phylum while in T1S and T1M samples the *Ascomycota* fungi overcome. In T0 sample from apples the presence of bacteria is lower, 70%, and involves *Actinomycetota* and *Pseudomonadota*, in addition the 30% of *Ascomycota* fungi was detected. While in apple the T0 and T1S samples have very similar microbial profiles, more differences occurred between T0 and T1S in both, strawberry and in grape. Our results suggest that the variability increases over time in the perishable fruits, compared to the apple which has a higher shelf life, suggesting in the latter a more consolidated coexistence between putative beneficial and pathogenic microorganisms. This investigation of the fruit microbiome offers useful information for the development of postharvest biocontrol strategies, as well as the opportunity to improve our knowledge about the health profile of fruit.

RIASSUNTO

La sicurezza alimentare è fondamentale per l'industria alimentare, in quanto garantisce la protezione dei consumatori da potenziali rischi per la salute. Tra gli alimenti la frutta si distingue per i benefici che apporta alla salute umana. In questo contesto le comunità microbiche associate alla frutta possono contribuire alla qualità e alla resistenza ai patogeni, ma poco si conosce sulle dinamiche che si sviluppano durante la conservazione. In questo lavoro di tesi è stato analizzato il microbioma mediante la tecnica innovativa *Shallow whole-metagenome shotgun sequencing* (S-WMS) che abita la superficie in mela, cultivar 'Fuji', in fragola, cultivar 'Candonga' e uva cultivar 'Redglobe' acquistate da tre supermercati differenti. Per ogni tipologia di frutta tre tesi sono state testate, T0, relativa alla frutta appena dopo l'acquisto al supermercato, T1M, dopo la conservazione a temperatura ambiente fino alla comparsa dei primi marciumi (rispettivamente dopo 1 settimana per la fragola, 2 settimane per l'uva e 4 settimane per la mela), e T1S relativo alla frutta che dopo la conservazione non ha subito danni. Contestualmente allo studio del microbioma dai campioni T1M, i patogeni fungini responsabili dei marciumi sono stati isolati *in vitro* e caratterizzati a livello genetico mediante sequenziamento dei geni ITS. *Botrytis cinerea* è stata isolata da fragola, specie di *Penicillium* e *Alternaria* da uva, *Penicillium expansum* e *Neonectria ditissima* da mela. Da tutte le tipologie di frutta è stato isolato il genere *Cladosporium*. Lo studio metagenomico ha confermato la presenza dei generi isolati *in vitro* sviluppati in T1M. In generale il microbioma ha mostrato una complessità differente tra le tipologie di frutti e in particolare tra le tesi analizzate. Il microbioma in fragola e uva nella tesi T0 è costituito per il 95% di specie batteriche incluse nel phylum *Pseudomonadota* mentre nelle tesi T1S e T1M prevalgono i funghi *Ascomycota*. In mela in T0 la presenza dei batteri è minore, 70%, ed è costituita da *Actinomycetota* e *Pseudomonadota*, mentre i funghi *Ascomycota* rappresentano il 30%. In mela le tesi T0 e T1S hanno profili microbici molto simili. Differenze più marcate sono emerse tra T0 e T1S sia in fragola che in uva. I dati suggeriscono che la variabilità incrementa nel tempo nei frutti più deperibili, rispetto alla mela che ha una conservabilità più elevata suggerendo in quest'ultima una convivenza più consolidata tra microrganismi potenzialmente benefici e patogeni. Questa indagine sul microbioma della frutta offre informazioni utili per lo

sviluppo di strategie di biocontrollo postraccolta, nonché l'opportunità di migliorare le nostre conoscenze sul profilo sanitario della frutta.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Principali avversità della frutta in postraccolta

Negli anni l'agricoltura ha subito profondi cambiamenti che si sono resi necessari per l'adeguamento al mercato nazionale ed internazionale dei prodotti ortofrutticoli. La concentrazione di specifiche produzioni in particolari aree e in particolari momenti dell'anno determina pericolosi fenomeni di sovrapproduzione con difficoltà di collocazione dei prodotti orticoli sul mercato e d'altra parte, le reti di trasporto permettono a tutte le merci, compresi frutta e ortaggi, di raggiungere mercati molto distanti, venendo incontro alle richieste del consumatore, che sempre di più preferisce prodotti freschi. 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). Alcune specie, come le fragole e i piccoli frutti, hanno una breve conservabilità che si protrae per pochi giorni (Romanazzi et al., 2013; Feliziani et al., 2015), altre, come pere, mele, sopportano periodi di conservazione più lunghi (Saletnik et al., 2022) anzi, talora, tendono a incrementare nel tempo le loro caratteristiche organolettiche. Considerando che la frutta è ricca di acqua e nutrienti rappresenta un substrato ideale per lo sviluppo di microrganismi, la conservazione della qualità dei frutti è una sfida importante. 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 carpfagi o all'azione patogenetica di alcuni microrganismi che possono causare malattie nei prodotti come frutta e verdura durante il trasporto, la manipolazione, l'imballaggio e lo stoccaggio. Tali agenti patogeni possono causare gravi perdite nella filiera dei prodotti freschi, con perdite

postraccolta di frutta e verdura fresca stimate fino al 50%. La decomposizione è un problema importante in tali perdite, essendo causata principalmente da patogeni fungini dopo la maturazione dei frutti. Per prevenire lo sviluppo di questi patogeni fungini è importante adottare buone pratiche di igiene e conservazione, come la corretta manipolazione e la refrigerazione delle frutta. Negli ultimi anni, nei paesi dell'UE, è stato proibito l'utilizzo di fungicidi nel postraccolta; tuttavia, per alcuni prodotti è possibile utilizzare un coadiuvante tecnologico (Romanazzi et al., 2016).

Questa ricerca mira ad approfondire quali batteri e funghi sono presenti sulla superficie della frutta, mela, uva e fragola, nella fase di postraccolta con lo scopo di ottenere indicazioni utili per migliorare il controllo dei potenziali agenti patogeni. La capacità di controllare il microbioma di qualsiasi frutto è un grande potenziale nella gestione del postraccolta. La ricerca sul microbioma della frutta offre importanti opportunità per sviluppare strategie alternative ai prodotti di sintesi utilizzando prodotti di biocontrollo postraccolta, nonché per monitorare il profilo sanitario della frutta.

1.2 Patogeni fungini della frutta

Diversi patogeni fungini possono infettare o svilupparsi sulla frutta in postraccolta, tra questi quelli che provocano le perdite maggiori sono:

- *Botrytis cinerea*: è un fungo necrofago ed è responsabile della muffa grigia che può infettare una vasta gamma di frutta, come fragole, uva, mele, pere e ciliegie. Si sviluppa soprattutto su tessuti maturi, rimanendo quiescente fin quando l'ambiente o l'ospite ne favoriscono lo sviluppo (Williamson et al., 2007). Secondo una attuale classificazione, *B. cinerea* si è classificata al secondo posto nell'elenco mondiale dei 10 principali patogeni delle piante fungine in base all'importanza scientifica ed economica (Dean et al., 2012).
- *Rhizopus stolonifer*: fungo saprofita che rappresenta il più comune agente dei marciumi postraccolta dopo la *B. cinerea* (Maas, 1998). Presenta micelio non settato, di diametro grossolano, formato da rizoidi ramificati nel punto di contatto con la matrice. L'infezione avviene a temperature comprese tra 6 e 30°C, con elevata umidità. I frutti colpiti perdono consistenza e presto presentano sintomi di un marciume deliquescente di *Rhizopus* ricoprendosi di un voluminoso micelio, di colore bianco-setaceo e successivamente tendente al nero. I danni maggiori si registrano sulla frutta conservata in ambienti non sufficientemente refrigerati.

- *Monilinia* spp.: *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena* e *Monilinia laxa* (Landi et al 2018; De Miccolis Angelini et al., 2019; Landi et al., 2020) sono i principali agenti causali del marciume bruno degli alberi da frutto. Sono funghi Ascomiceti che fanno parte della famiglia *Sclerotiniaceae*, e sono responsabili di una delle più importanti e comuni malattie delle drupacee e delle pomacee in campo, oltre che in postraccolta, causando forti perdite di resa e riducendo la conservabilità vita (Martini & Mari, 2014).
- *Penicillium* spp.: questi funghi possono causare muffa blu in frutta come arance, mele, pere e uva. Un gran numero di *Penicillium spp* sono stati identificati come agenti causali di degradamento nel postraccolta. Principalmente presenti nel suolo, possono contaminare anche attraverso dispersione aerea o contaminazione crociata attraverso le attrezzature da campo (Sanderson & Spotts, 1994).
- *Alternaria* spp.: questi funghi possono causare marciume nero. Specie principalmente saprofite, ma alcune possono essere fitopatogene. Comunemente risiedono nel suolo o in tessuti vegetali in decomposizione. *Alternaria spp* è un patogeno ben noto nel postraccolta che causa un impatto economico notevole in diverse coltivazioni (Thomma, 2003).
- *Aspergillus* spp.: questi funghi possono causare muffe nere su diverse tipologie di frutta come mele, uva e arance. *Aspergillus* riesce ad adattarsi velocemente ai cambiamenti ambientali. Produce micotossine (Saif et al., 2021).
- *Cladosporium* spp.: generalmente saprotrofi, sono i più presenti ed abbondanti nell'aria sia interna che esterna (Horner et al., 2004), infatti sono stati isolati principalmente in aree pubbliche e su numerose tipologie di alimenti; le spore presenti nell'aria possono diventare un allergene per l'uomo (Ogòrek et al., 2012).

1.3 Il microbioma

Il microbioma della frutta è costituito da un insieme di microorganismi che colonizzano la superficie (epifiti) e l'interno (endofiti) della frutta stessa (Zhang et al., 2021).

Le recenti conoscenze acquisite grazie a queste comunità microbiche sono considerate rilevanti per il controllo biologico nella prevenzione della patologia postraccolta dei frutti e nell'influenzare la qualità di frutta e verdura.

Le comunità microbiche possono essere classificate in base alla loro struttura e funzione nei tessuti del frutto. Le interazioni tra i microorganismi presenti nel microbioma possono influenzare lo stato e l'evoluzione dell'intera popolazione microbica, così come la loro

capacità funzionale (Hooks & O'Malley, 2017). Queste interazioni possono avvenire all'interno dello stesso membro o tra membri diversi, includendo specie, generi, famiglie e domini. Esse possono essere classificate come positive, negative o neutre (Berg et al., 2020). Le interazioni positive includono mutualismo, sinergia o commensalismo, mentre le interazioni negative comprendono predazione, parassitismo, antagonismo o competizione. Alcune interazioni possono anche essere neutrali, senza effetti osservati.

La conoscenza dei meccanismi di trasmissione dei microrganismi risulta fondamentale per poter regolare il microbioma, offrendo un prezioso strumento di protezione per la frutta contro i patogeni (Frank et al., 2017). Sono state distinte tre possibili modalità di colonizzazione che possono spiegare la presenza di microbi sulla frutta: colonizzazione verticale, orizzontale e mista (Bright & Bulgheresi, 2010; Ngolong Ngea et al., 2021). La colonizzazione verticale si riferisce ai microbi che vengono trasmessi da una parte della pianta al frutto. La colonizzazione orizzontale si riferisce all'origine del ceppo nell'ambiente, come il suolo, il magazzino o i lavoratori ed è la principale modalità di contaminazione della frutta. Altri studi dimostrano come anche le condizioni climatiche, soprattutto le precipitazioni, l'ambiente di crescita e le pratiche di gestione possano influenzare il microbioma presente sulla superficie della frutta (Abdelfattah et al., 2018; Allard et al., 2020).

L'analisi del microbioma della frutta è una disciplina relativamente nuova che è stata sviluppata negli ultimi anni grazie ai recenti avanzamenti tecnologici in campo microbiologico e genomico. Gli studi sul microbioma della frutta sono iniziati a emergere nella letteratura scientifica a partire dalla metà degli anni '90, ma il vero sviluppo della disciplina è avvenuto negli ultimi dieci anni. Le tecnologie di sequenziamento del DNA di nuova generazione hanno permesso di analizzare il microbioma in modo molto più dettagliato e preciso rispetto alle tecniche di analisi microbiologica tradizionale, consentendo una migliore comprensione della composizione e della funzione del microbioma (Tringe & Rubin, 2005).

La comprensione e il controllo delle interazioni fisiche, fisiologiche e molecolari che si verificano nel sistema olobiotico richiedono una chiara comprensione della funzione del microbioma della frutta. Gli studi hanno evidenziato l'importante influenza della composizione della comunità microbica all'interno di un organismo sulla fisiologia dei suoi ospiti, inclusa la risposta alle malattie (Berg et al., 2015; Hardoim et al., 2015; Berg et al., 2020). Tuttavia, secondo Delgado-Baquerizzo et al. (2016), la relazione tra la diversità microbica e il funzionamento dei taxa microbici in un ecosistema specifico, è ancora poco conosciuta.

Riuscire a modulare la comunità microbica, può portare nuove strategie di controllo che possano introdurre effetti benefici nel frutto, rallentando l'alterazione negativa del microbioma che può precedere alla comparsa di malattie nel postraccolta, di solito dipese da diversi fattori come tempo e temperatura di conservazione e tipo di varietà della frutta (Diskin et al., 2017).

La ricerca applicata al microbioma si impegna a promuovere la salute degli esseri viventi superiori come umani, animali e piante, nonché dei sistemi ecologici (Berg et al., 2020). In questo contesto una strategia di biocontrollo solida è fondamentale per garantire un microbioma sano il quale, a sua volta, promuoverà la produzione di frutta salutare e contribuirà al benessere umano.

I recenti progressi nell'esplorazione e nella comprensione del microbioma aprono nuove possibilità per lo sviluppo di approcci postraccolta nel biocontrollo più efficaci. Si ritiene che gli studi sul microbioma nel contesto della frutta rappresentino una nuova frontiera che rivoluzionerà la comprensione del biocontrollo e della biologia postraccolta. Questa prospettiva apre nuovi orizzonti e promette significativi cambiamenti nel modo in cui si affronta la gestione e il controllo dei patogeni e dei processi di deterioramento nella frutta dopo la raccolta (Droby & Wisniewski, 2018).

Gli studi di metagenomica fino ad ora realizzati hanno evidenziato una differente composizione della popolazione microbica su pianta in relazione all'organo, (frutto, foglia radice), alla specie e al contesto ambientale. Alcuni studi effettuati sulle specie di fruttiferi oggetto di questo lavoro di tesi hanno evidenziato su uva abbondanti comunità fungine tra cui le principali sono associate ai generi *Alternaria* spp *Cladosporium* spp. e *Botrytis* spp. (Singh et al., 2018). Nella mela sono stati identificati patogeni opportunisti quali *Penicillium expansum* e *B. cinerea* che causano danni nella pre e postraccolta. Sono stati trovati principalmente sulla superficie del frutto che colonizzano a seguito di danni superficiali; altri generi quali *Alternaria* e *Cladosporium* invece provocano marciume subito sotto la superficie (Patriarca, 2019). Tra le più abbondanti comunità fungine presenti sulla fragola quelle di maggior presenza sono *Botrytis* e *Cladosporium* (Abdelfattah et al., 2016). Tuttavia, il microbioma va considerato un sistema dinamico che è influenzato dall'origine della frutta, dalle condizioni ambientali e di allevamento dei fruttiferi (Wicaksono et al., 2022).

1.4 La metagenomica per lo studio del microbioma

Il recente grandioso sviluppo delle piattaforme di sequenziamento di nuova generazione ha aperto una nuova era nell'esplorazione della biodiversità, vale a dire la ricchezza e la varietà delle forme di vita e degli ecosistemi. In particolare, lo studio della diversità microbica in una

varietà di ambienti, incluso la frutta, precedentemente limitato a organismi coltivabili in laboratorio, può ora essere condotto a un livello di risoluzione senza precedenti sia a livello tassonomico che funzionale attraverso tecniche molecolari avanzate basate sul sequenziamento massivo del DNA o RNA.

La metagenomica applica tecniche moderne di genomica per analizzare il DNA presente in campioni di materiale biologico complesso, direttamente nel loro ambiente naturale come suoli e tessuti ospite (Tringe & Rubin, 2005), ottenendo la possibilità di analizzare sequenze di microrganismi che precedentemente si ritenevano inaccessibili.

Gli approcci molecolari per indagare la biodiversità del microbioma sono relativi a processi di sequenziamento ad alta processività e comprendono: 1) DNA metabarcoding; 2) metagenomica shotgun; 3) metagenomica funzionale.

Il DNA metabarcoding consente la valutazione globale della composizione tassonomica di specifici raggruppamenti tassonomici (ad es. batteri o funghi) in qualsiasi campione di interesse ed è basato sull'amplificazione selettiva di regioni ipervariabili ubiquitarie, denominate “DNA barcode” (ad esempio regioni variabili dell'rRNA 16S per i batteri, o regioni spaziatori interni trascritti del DNA ribosomale – ITS, per i funghi). La Whole-Metagenome Shotgun Sequencing (WMS), che consiste nel sequenziamento totale e nella successiva annotazione delle sequenze degli acidi nucleici ottenute, può rivelare la diversità tassonomica e funzionale in un determinato campione / ambiente. Infine, la metagenomica funzionale consente di esplorare il potenziale funzionale e metabolico dei genomi microbici eseguendo screening funzionali su larga scala.

Con lo sviluppo della ricerca degli ultimi anni, il sequenziamento WMS ha preso sempre più campo come approccio per la genomica. Questa tecnica è stata sviluppata per analizzare l'intera comunità microbica presente in un dato campione, studiando la visione globale della comunità, dai diversi livelli di diversità filogenetica, all'intero complemento genico e alle vie metaboliche nella comunità (Chen & Pachter, 2005).

Dal DNA estratto vengono formate librerie che contengono frammenti di genoma da un mix eterogeneo di specie, ceppi e sottopopolazioni. (Tringe & Rubin, 2005). Il DNA estratto dal campione viene frammentato e sequenziato utilizzando tecnologie di sequenziamento ad alta velocità, come la tecnologia Illumina. I dati di sequenziamento ottenuti vengono quindi assemblati con tecniche computazionali e confrontati con database di riferimento per identificare i geni funzionali e le sequenze di DNA presenti nel campione (Wooley et al., 2010).

La formazione di frammenti e il loro riassettaggio dà una copertura del genoma approssimativamente uniforme; ciò che complica il lavoro dei bioinformatici sono i possibili errori di sequenziamento che potrebbero generare sequenze non genomiche o sequenze ripetitive che possono causare errori di riassettaggio (Quince et al., 2017).

L'analisi metagenomica può fornire informazioni dettagliate sulla diversità e sulla funzione dei microorganismi presenti in un dato ambiente. Lo studio del microbioma dei vari habitat sta acquisendo un'importanza notevole e sempre più studi stanno emergendo anche in ambito agrario (Abdelfattah et al., 2016; Patriarca, 2019; Sangiornio et al., 2022). Tuttavia, l'identificazione dei microbi chiave e delle loro funzioni generalmente richiede ampi studi a causa del vasto numero di specie e geni e degli alti livelli di variazione intra-individuale e inter-individuale. Il sequenziamento Shallow Whole-Metagenome Shotgun Sequencing (S-WMS) può essere una valida alternativa al WMS, che, a causa dei costi proibitivi, è attualmente applicato all'analisi di un numero limitato di campioni. Studi effettuati recentemente hanno evidenziato che la tecnica S-WMS è in grado di produrre variazioni tecniche inferiori rispetto al sequenziamento barcoding 16S per studi sul microbioma garantendo una maggiore riproducibilità e copertura nei database di riferimento (Xu et al., 2021; La Reau et al., 2023).

Quindi la tecnologia S-WMS colma il divario riscontrato tra WMS e il sequenziamento dell'amplicone 16S/18S/ITS. Il sequenziamento S-WMS fornisce informazioni tassonomiche sul DNA genomico totale di tutti gli organismi da un campione evitando la necessità di isolamento e coltivazione di microrganismi. Questo è fondamentale poiché quasi il 99% di tutti i microrganismi non può essere coltivato all'interno di un laboratorio. Mentre WSS rimane il gold standard per l'analisi del microbioma ad alta risoluzione, l'S-WMS è una potente alternativa al sequenziamento dell'amplicone. Il sequenziamento S-WMS utilizza NGS per fornire una tassonomia a livello di specie attraverso diversi taxa con una distorsione PCR minima o nulla o limitata dalla regione di amplificazione.

Vantaggi del sequenziamento S-WMS è quello di sequenziare più microrganismi in una singola corsa senza la necessità di isolamento e coltivazione. Allo stesso modo, il sequenziamento S-WMS ha un bias limitato rispetto all'analisi metagenomica di ampliconi PCR poiché non è richiesta l'amplificazione di regioni target specifiche per procarioti o eucarioti. Invece, i risultati del sequenziamento forniscono informazioni complete sulla diversità e composizione microbica.

Capitolo 2

SCOPO DELLA TESI

I microrganismi sono parte integrante della composizione di frutta e verdura e si trovano sia in superficie come epifiti che nei tessuti come endofiti. Sebbene per lo più non causino malattie, il loro ruolo è tuttavia trascurato in relazione alla qualità dei frutti postraccolta, alla suscettibilità o alla resistenza alle malattie. Alcuni di questi microrganismi sono in grado di infettare il frutto e sviluppare marciume e deterioramento in postraccolta tra cui principalmente i funghi che appartengono ai generi *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Colletotrichum* e *Rhizopus*. La gestione di questi patogeni si basa principalmente sull'uso di fungicidi chimici applicati ai frutti prima e dopo la raccolta. Sono state suggerite anche strategie di gestione alternative tra cui l'utilizzo di sostanze di origine naturale. La consapevolezza che le superfici dei frutti ospitano microrganismi benefici ha favorito il campo del controllo biologico utilizzando microrganismi per lo sviluppo di prodotti commerciali di biocontrollo riportati in numerose pubblicazioni scientifiche. I rapidi sviluppi nell'esplorazione e nella comprensione del microbioma offrono nuove opportunità per il controllo dei patogeni in postraccolta della frutta la cui efficacia passa attraverso la conoscenza approfondita delle interazioni microbiche che si innescano negli alimenti. Nondimeno, la conoscenza della popolazione microbica che popola la frutta, un alimento consumato a partire dalla prima infanzia, aiuta a comprenderne il ruolo di questo alimento come fonte di microbi intestinali benefici. Diventa quindi fondamentale la comprensione del microbioma della frutta che acquistiamo al supermercato e come cambia in relazione alla sua conservazione e allo sviluppo di microrganismi patogeni. Le nuove tecniche di sequenziamento offrono oggi la possibilità di analizzare con maggiore disinvoltura la totalità della popolazione microbica presente in un alimento. In questo lavoro di tesi si è affrontato uno studio metagenomico utilizzando la tecnica innovativa S-WMS per ottenere informazioni sulla composizione delle comunità microbiche complessive in mela, cultivar 'Fuji', in fragola cultivar 'Candonga' e uva cultivar 'Redglobe'. Per ogni tipologia di frutta è stata messa a confronto l'abbondanza microbica presente al momento dell'acquisto al supermercato, e dopo un periodo di conservazione a temperatura ambiente, in frutti con presenza di marciumi e nei frutti sani.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

In questo lavoro di tesi mediante uno studio di metagenomica utilizzando la tecnologia S-WMS è stata fatta un'indagine sulla variabilità della popolazione microbica complessiva, presente su fragola (*Fragaria × ananassa* Duch), mela (*Malus domestica*) e uva (*Vitis vinifera* L.) durante il periodo di postraccolta.

3.1 Campionamento della frutta

Il campionamento è stato effettuato presso tre diversi supermercati della zona: 'Conad' di Castelferretti (AN); 'Coal' di Agugliano (AN) e 'Si con te' di Polverigi (AN).

Dai tre i supermercati sono stati acquistati tre specie di frutta, nello specifico: uva, cultivar 'Redglobe', mela, cultivar 'Fuji', e fragola, cultivar 'Candomga' come riportato nella **Tabella 3-1**.

Tabella 3-1: Provenienza e descrizione del materiale vegetale utilizzato per la prova sperimentale.

Provenienza	Frutta	Cultivar	Quantità
'Conad', Castelferretti (AN)	Uva	'Redglobe'	2 Kg
	Mela	'Fuji'	5 Kg
	Fragola	'Candomga'	1,5 Kg
'Coal', Agugliano (AN)	Uva	'Redglobe'	2 Kg
	Mela	'Fuji'	5 Kg
	Fragola	'Candomga'	1,5 Kg
'Si con te', Polverigi (AN)	Uva	'Redglobe'	2 Kg
	Mela	'Fuji'	5 Kg
	Fragola	'Candomga'	1,5 Kg

3.2 Disegno sperimentale

Per ogni supermercato di origine, da almeno 5 mele, 15 acini di uva e 15 fragole, è stata prelevata la porzione esterna con un pelapatate, costituita dall'esocarpo e una piccola porzione superficiale di mesocarpo (0.5 cm), posto in tubi sterili e conservati a -80°C. Tale materiale ha rappresentato il tempo 0 (T0) della prova sperimentale.

Il resto della frutta comprata è stato posta in apposite cassette precedentemente pulite con una soluzione di ipoclorito al 0,5%. I singoli frutti sono stati adagiati all'interno delle cassette ad una adeguata distanza come mostrato nella **Figura 3-1**. Le cassette sono state coperte per garantire un'umidità costante al loro interno e conservate a temperatura ambiente fino alla comparsa dei primi marciumi su frutta.

Con questa finalità, le cassette sono state osservate per quattro settimane, rispettivamente una settimana per la fragola, due per l'uva e quattro per la mela, tempi necessari per la manifestazione della malattia per ognuna delle specie. Durante questo periodo, in relazione alla tipologia di frutta, sono stati prelevati gli isolati fungini sviluppati dai singoli frutti che presentavano marciumi. Quindi, i frutti dai quali è stato prelevato il materiale infetto sono stati riposti nella cassetta

Una volta ottenuto un numero significativo (per ogni supermercato di provenienza, 5 mele 15 acini di uva e 15 fragole) di frutti infetti, dalla superficie sia da quest'ultimi (T1M) che da quelli sani residui nelle cassette (T1S), è stata prelevata la porzione esterna come descritto per il T0. In totale per ogni specie sono stati prelevati 3 campioni per la tesi T0, 3 per la tesi T1S e 3 per la tesi T1M per un totale di 27 campioni. Ogni campione era costituito da circa 10g di materiale vegetale che è stato conservato a - 80°C fino alla fase di estrazione del DNA totale.



Figura 3-1: Allestimento della prova sperimentale: posizionamento dei campioni nelle cassette per la conservazione a temperatura ambiente.

3.3 Isolamento in vitro degli isolati funghi

L'isolamento dei funghi è stato effettuato prendendo piccole quantità della zona sintomatica del frutto posizionandola su piastre Petri contenenti un substrato a base di agar destrosio di patate (PDA), + antibiotico (ampicillina e streptomicina), alla concentrazione di 100 mg/L^{-1} , con lo scopo di contrastare la crescita dei batteri. Le colture sono state incubate a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ per 5 giorni. Gli isolati, controllati giornalmente, sono stati trasferiti su piastre PDA in assenza di antibiotici e incubati alle medesime condizioni iniziali per ottenere colture pure. Gli isolati fungini ottenuti sono stati conservati a 4°C .

3.4 Identificazione degli isolati fungini

Dopo lo sviluppo delle colonie pure in PDA, è stata effettuata una prima identificazione morfologica con l'ausilio del microscopio ottico (DM 2500; LAICA) che ha consentito di analizzare la tipologia di ife fungine e le spore (conidi) sviluppate da ogni isolato. L'identificazione specie specifica è stata effettuata mediante sequenziamento Sanger delle sequenze ITS (spaziatori interni trascritti), ottenute utilizzando la coppia di primer ITS1-ITS4 (White et al., 1990).

3.4.1 Estrazione DNA fungino

Da ciascun isolato fungino è stato estratto il DNA utilizzando la procedura a base di bromuro di cetil trimetil ammonio al 3% (CTAB 3%) (Doyle & Doyle, 1990). In dettaglio, da ciascun campione, sono stati prelevati 100 mg di micelio e inseriti in provette Eppendorf da 2 ml a cui sono stati aggiunti 50 mg circa di sodio metabisufate con lo scopo di ridurre gli stress ossidativi associati alla frantumazione meccanica. Il micelio è stato macinato previo raffreddamento delle provette in azoto liquido utile a provocare uno shock termico nei tessuti fungini. In seguito, è stato aggiunto 700 µl di tampone di estrazione (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 M EDTA, 1.4 M NaCl, 2% (p/v) PVP). Le provette, adeguatamente miscelate, sono state incubate in bagnetto a 65°C per 40 min. Passato il tempo di incubazione, con lo scopo di separare i detriti cellulari dal DNA, sono stati aggiunti 700 µl di cloroformio/alcool isoamilico (24:1) e miscelato per 2 min. Successivamente, la separazione del DNA è stata effettuata centrifugando le provette per 10 min a 7500 ×g. Il sovranatante è stato raccolto e posizionato in una nuova provetta ed è stato ripetuto il lavaggio con cloroformio. In seguito, la precipitazione del DNA è stata effettuata aggiungendo isopropanolo allo 0.8% e centrifugando le provette a 16800 ×g per 20 min. Il pellet di DNA ottenuto è stato lavato dai sali in eccesso aggiungendo 300µl di etanolo freddo al 70% e centrifugando le provette per 5 min alla massima velocità. Il DNA è stato lasciato ad asciugare a temperatura ambiente per eliminare l'alcool ed è stato disciolto in 50 µl di acqua ultrapura.

3.4.2 Analisi PCR endpoint e elettroforesi

Per l'ottenimento delle sequenze genomiche utili alla identificazione specie specifica degli isolati fungini mediante sequenziamento Sanger, il DNA estratto è stato sottoposto a PCR endpoint utilizzando i primer universali ITS1-ITS4 (White et al., 1990), per i quali sono riportate di seguito le sequenze:

ITS1	5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG C -3'
ITS4	5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'

Sono stati preparati due mix di reazione per l'amplificazione PCR contenenti:

1) mix1:

3 µl di DNA,

25 µl di EmeraldAmp gT PCR Master Mix' 2×(Merck),

1 µl di ciascun primer (2 µM),

H₂O *nuclease-free* per arrivare a volume pari a 50 µl;

2) mix2:

2 μ l di DNA,

25 μ l di 'EmeraldAmp gT PCR Master Mix' 2 $\times$ (Merck),

0,5 μ l di ciascun primer (2 μ M),

H₂O *nuclease-free* per arrivare a volume pari a 50 μ l.

I mix di reazione sono stati posti in provette da 0,2 ml per l'amplificazione PCR. Il ciclo termico è stato eseguito mediante l'utilizzo di un termociclatore Thermal Cycler (BIO-RAD) con il seguente protocollo termico: un ciclo iniziale di attivazione dell'enzima di 3' a 95°C seguito da una ripetizione da 39 cicli ognuno costituito da tre steps, ovvero denaturazione del DNA a 95°C per 30 secondi, innesco dei primer per 1 minuto a 55°C ed estensione del frammento per 1 minuto a 72°C. Il ciclo termico ha previsto un'estensione finale da 5 minuti a 72°C e poi mantenimento a temperatura di 12°C (*Figura 3-1*).

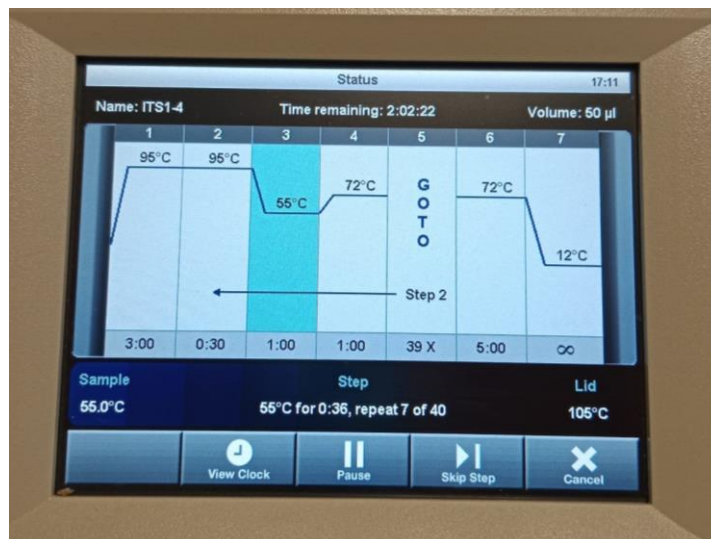


Figura 3-2: Ciclo termico della PCR end point utilizzata per l'analisi delle regioni ITS degli isolati fungini.

I campioni amplificati sono stati caricati su gel di agarosio all'1,5%. Tale gel è stato preparato utilizzando una soluzione tampone (TAE 1%), agarosio e GelRed (Sigma Aldrich) un colorante per acido nucleico fluorescente. A fine corsa è stato utilizzato il transilluminatore Gel Doc 1000, per accertare l'avvenuta amplificazione dei campioni.

3.4.3 Sequenziamento con metodo Sanger

I campioni amplificati sono stati confezionati seguendo le indicazioni dell'azienda Genewiz-Azenta (Germania) per il sequenziamento mediante metodo Sanger.

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi di omologia di sequenza tramite BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) presso la banca genomica National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.5 Analisi del microbioma

Il microbiota della frutta è stato analizzato in relazione ai tre differenti tempi: il primo relativo al momento dell'acquisto della frutta (T0), il secondo relativo alla frutta che ha espresso i sintomi di malattia (T1M) e l'ultimo alla frutta che invece non ha sviluppato sintomi (T1S). Nel dettaglio le tesi T1S e T1M rappresentavano frutti conservati per 1 settimana, 2 settimane e 4 settimane a temperatura ambiente, rispettivamente per fragola, uva e mela, dalla tesi T0.

3.5.1 Estrazione DNA da frutta

Per ogni tipologia di frutta e provenienza, di ciascuna tesi, T0, T1M e T1S, tutto il materiale vegetale campionato è stato posto in un mortaio e polverizzato aggiungendo azoto liquido. Dalla polvere ottenuta sono state prelevati circa 300-500 ng di materiale e raccolti in tubi Eppendorf di 2 ml; ad essi è stato aggiunto 700 µl di tampone di estrazione (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 M EDTA, 1.4 M NaCl, 2% (p/v) PVP, Sodio dodecil solfato, SDS 0.1%). I campioni sono stati polverizzati meccanicamente utilizzando TissueLyser (QIAGEN) che garantisce una disaggregazione rapida e completa dei campioni aggiungendo una apposita sferetta di acciaio a ciascuna provetta e sottoponendo i campioni per 30 minuti a 30 mHz .

Le provette al termine dei 30 minuti sono state incubate in bagnetto a 65°C per 40 min con l'aggiunta di altri 150 µl di tampone di estrazione. Passato il tempo di incubazione, i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 3500 ×g a 4°C. Di seguito il sovranatante è stato recuperato, posto in un nuovo tubo da 2 ml a cui sono stati aggiunti 800 µl di cloroformio/fenolo (50:50) e miscelato per 2 min. I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione per 10 min a 6500 ×g. Il sovrinatante è stato raccolto e posizionato in una nuova provetta ed è stato ripetuto il lavaggio con cloroformio/fenolo. In fine, come ultimo lavaggio, è stato utilizzato cloroformio/alcool isoamilico (24:1). La precipitazione degli acidi nucleici è stata effettuata aggiunto isopropanolo allo 0.6% e 1/10 di sodio acetato 10M. Dopo 30 minuti di incubazione a -20°C, i campioni sono stati centrifugati a 16800 ×g per 20 min massima velocità per 20 min. Il pellet di DNA ottenuto è stato lavato aggiungendo 300µl di etanolo freddo al 70% e centrifugato per 5 min a 16800 ×g per 5 min. Il DNA è stato lasciato ad asciugare a temperatura ambiente per eliminare l'alcool ed è stato disciolto in 50 µl di acqua

ultrapura. Si è proceduto con estrazioni successive fino ad esaurimento del materiale di partenza. L'integrità e la qualità del DNA è stata verificata sulla base di un rapporto di assorbanza da 1,80 a 1,90 a 260/280 nm, utilizzando BioPhotometer plus (Eppendorf Inc., Westbury, NY, USA) e da 1,8 a 2,0 a 230/260 nm. Una volta stabilita la qualità, il DNA, ottenuto dalle diverse estrazioni e dalle tesi omologhe di ciascun supermercato è stata mescolata per ottenere in fine tre campioni per ogni tipologia di frutta ognuno dei quali denominati T0, T1S e T1M. Quindi un totale di 9 campioni è stato sottoposto all'indagine S-WMS.

3.5.2 Sequenziamento *Shallow whole-metagenome shotgun*

I campioni di DNA estratto sono stati inviati alla Novogene per lo studio metagenomico NGS (Next Generation Sequencing) Cambridge (UK), utilizzando la tecnologia S-WMS. Il metodo S-WMS è una tecnica di sequenziamento metagenomico 'superficiale' che fornisce informazioni tassonomiche sul DNA genomico totale di tutti gli organismi da un campione evitando la necessità di isolamento e coltivazione di microrganismi.

In breve, il sequenziamento metagenomico ha previsto la valutazione del grado di degradazione del DNA e della potenziale contaminazione mediante gel di agarosio all'1%. La concentrazione di DNA è stata misurata utilizzando il fluometro Qubit® dsDNA Assay Kitin Qubit® 2.0 (Life Technologies, CA, USA). Il valore OD è compreso tra 1,8 e 2,0, è stato e concentrazioni di DNA superiori a 1ug sono stati utilizzati per costruire le librerie che sono state generate utilizzando NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, USA) seguendo le raccomandazioni del produttore. In breve, il campione di DNA è stato frammentato mediante sonicazione a una dimensione di 350 bp, quindi i frammenti di DNA si sono ligati con l'adattatore per il sequenziamento Illumina con ulteriore amplificazione PCR. Alla fine, i prodotti PCR sono stati purificati (sistema AMPure XP) e le librerie sono state analizzate per la distribuzione delle dimensioni da Agilent2100 Bioanalyzer e quantificate utilizzando il metodo PCR Real Time. Il sequenziamento dei campioni è stato eseguito su un sistema di generazione di cluster cBot secondo le istruzioni del produttore. Dopo la generazione del cluster, le preparazioni della libreria sono state sequenziate su una piattaforma Illumina Novaseq 6000 e sono state generate letture paired-end. Quest'ultime sono state utilizzate per l'indagine della popolazione microbica che è stata effettuata con il software di classificazione delle sequenze metagenomiche Kraken2 (v2.0.7-beta, <https://www.ccb.jhu.edu/software/kraken2/>). Kraken utilizza l'allineamento esatto di k-mers,

una sottosequenza di DNA di lunghezza K in una lunga sequenza di basi di DNA. Ignorando le varianti genetiche, accetta corrispondenze esatte creando un database dedicato per abbinare le corrispondenze di k -mer, il che aumenta notevolmente la velocità di rilevamento. Il database di riferimento di Kraken contiene genomi batterici, arcaici e virali. La procedura è stata effettuata in 4 steps:

- steps 1: le letture pulite a doppia estremità sono state combinate per ciascun campione di metagenomica e convertite in sequenze fasta;
- steps 2: è stato utilizzato il software Kraken2 per confrontare e annotare la sequenza fasta ottenuta nello step 1;
- step 3: i risultati del confronto per ciascun campione sono stati integrati ed è stata eseguita l'abbondanza delle specie;
- step 4: l'analisi statistica e la mappatura sono state eseguite in base alla tabella dell'abbondanza delle specie.

L'abbondanza relativa dei diversi taxa identificati è stata calcolata e mostrata nei grafici in particolare in relazione al regno, ai phyla principali e al genere.

Un'analisi gerarchica dei generi basata sull'abbondanza relativa tassonomica è stata effettuata e mostrata con una mappa di calore (heatmap). L'analisi del clustering gerarchico è stata misurata dalla distanza euclidea, e mostrata per i 35 generi maggiormente rappresentati.

Inoltre, è stato effettuato un ordinamento PCoA (Principal Correspondence Analysis) basata sulla dissomiglianza di Bray-Curtis con il quale è stato possibile descrivere la variazione microbica all'interno delle tesi analizzate e tra le tipologie di frutta.

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 Identificazione degli isolati fungini

Dalle cassette conservate a temperatura ambiente sono stati ottenuti 20 isolati fungini. In dettaglio 9 da fragola, 7 da uva e 4 da mela.

Dopo una settimana le fragole mostravano una incidenza di marciume complessiva del 20%, l'uva dopo due settimane del 15% e la mela dopo 4 settimane del 13%.

L'analisi al microscopio degli isolati fungini ha evidenziato differenti morfologie di cui un esempio è mostrato nella **Figura 4-1**.

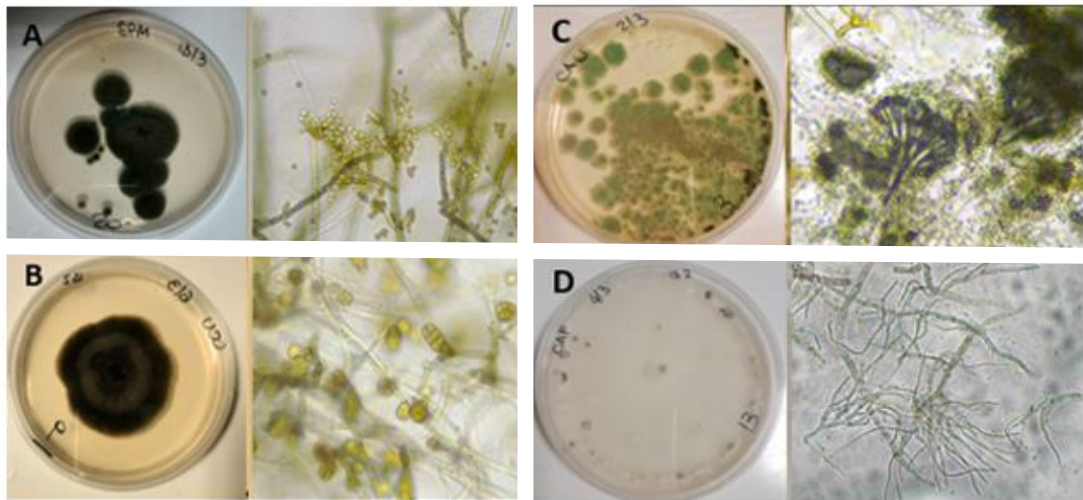


Figura 4-1: Specie fungine isolate da frutta. L'immagine mostra 4 specie fungine allevate in piastre Petri su substrato a base di Potato Dextrose Agar (PDA) per 7 giorni a temperatura ambiente e delle strutture fungine osservate al microscopio di A) *Cladosporium phaeospermum*; B) *Alternaria alternata*; C) *Penicillium expansum*; D) *Botrytis cinerea*.

L'analisi PCR end point utilizzando i primers universali ITS1-ITS4 ha prodotto singoli frammenti amplificati di lunghezza variabile compresa tra 350-450 bp (**Figura 4-2**).

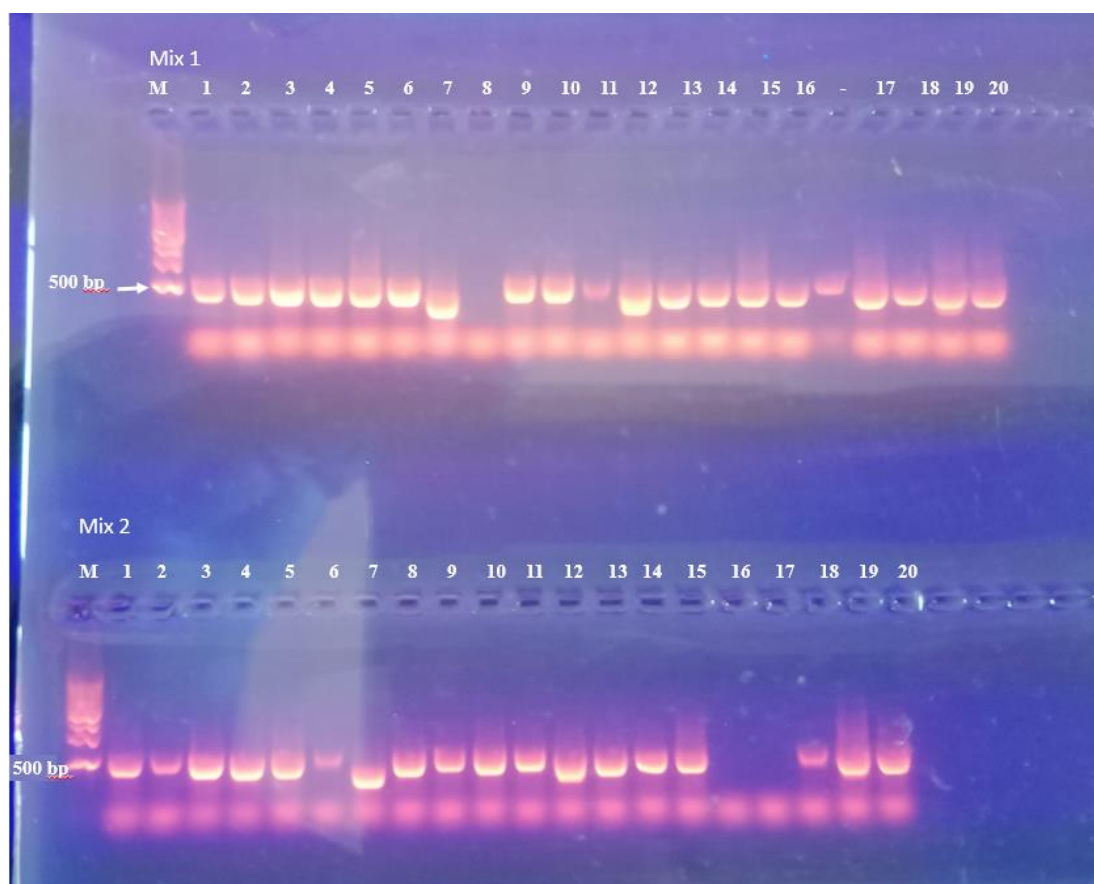


Figura 4-2: Analisi elettroforetica dei frammenti amplificati con la PCR end point del DNA estratto dagli isolati fungini analizzato con i primers ITS1-ITS4 (White et al., 1990), NOTE: M= marker, la numerazione dei campioni è riportata nella tabella 4-1. Informazioni relative al mix1 e al mix2 sono riportate nel testo.

L'analisi di omologia delle sequenze ITS effettuata mediante il software BLAST presente nella banca genomica NCBI sono state correlate a diversi generi tipicamente relazionati alle malattie della frutta, con più esattezza, come riportato in **Tabella 4-1**, i generi principali isolati dai frutti malati di fragola sono caratterizzati principalmente dal genere *Cladosporium* ssp. e *B. cinerea*; nella mela dal genere *Cladosporium* ssp. e *Penicillium* ssp. e nell'uva genere *Alternaria* ssp., *Penicillium* ssp. e *Cladosporium* ssp. Per alcuni isolati l'identificazione mediante BLAST su banca genomica è risultata ambigua in quanto corrispondente a più specie fungine. L'analisi di ulteriori e differenti geni housekeeping potrebbe chiarire in modo più chiaro la specie di appartenenza.

Tabella 4-1: Identificazione degli isolati fungini mediante analisi BLAST su banca genomica NCBI delle sequenze ITS amplificate tramite PCR end point da ciascun isolato.

Id campione	Genere	Specie	Sequenze di riferimento (N° NCBI)	Omologia con sequenze di riferimento NCBI (%)
1 U	<i>Cladosporium</i>	<i>sphaerospermum</i>	MT582795.1	99,42
2 U	<i>Alternaria</i>	<i>aborescens</i>	MH356755.1	99,81
3 U	<i>Penicillium</i>	<i>brevicompactum</i>	KX426968.1	99,44
8 U	<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	KP689176.1	99,42
9 U	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	MN733022.1	100
10 U	<i>Penicillium</i>	<i>olsonii</i>	MH705351.1	99,09
11 U	<i>Penicillium</i>	<i>brevicompactum</i>	MN902154.1	99,44
4 F	<i>Cladosporium</i>	<i>sp</i>	KR152316.1	94,76
5 F	<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	OM415968.1	100
6 F	<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	MT786364.1	99,22
7 F	<i>Geotrichum</i>	<i>sp</i>	JQ437602.1	92,53
12 F	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>	KR094468.1	99,19
13 F	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>	OQ561207.1	99
14 F	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>	MN689856.1	99,59
15 F	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>	MN689856.1	99,60
16 F	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>	ON566788.1	99,80
17 M	<i>Neonectria</i>	<i>ditissima</i>	MT478963.1	99,01
18 M	<i>Penicillium</i>	<i>expansum</i>	MN752170.1	97,50
19 M	<i>Cladosporium</i>	<i>pseudocladosporioides</i>	MT582794.1	98
20 M	<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	HQ443256.1	99,60

NOTE U = uva; F = fragola; M = mela.

4.2 Analisi del microbioma

L'analisi del microbioma ha identificato la presenza di microrganismi appartenenti a regni differenti in quantità variabile nei diversi campioni (**Figura 4-3**). Il regno dei *bacteria* nella tesi T0, corrispondente al periodo appena successivo all'acquisto della frutta, è risultata predominante soprattutto in uva e fragola mostrando valori superiori al 90%. Le tesi T1M e T1S, corrispondenti rispettivamente alla frutta malata e alla frutta sana dopo il periodo di incubazione in cassetta, in uva e in fragola, mostrava una riduzione drastica del regno dei *bacteria* mentre è risultato predominante il regno degli *eukaryota* dove sono annotati i funghi sporigeni filamentosi. La percentuale degli *eukaryota* nei campioni di uva per le tesi T1M e T1S era rispettivamente del 66% e 45%, mentre in fragola, per le tesi T1M e T1S era rispettivamente di 99% e 76% (**Figura 4-3**). Interessante nei campioni di mela analizzati si è osservato un profilo quantitativo leggermente differente, le tesi T0 e T1S, hanno mostrato

profili molto simili con percentuali di *bacteria* che si sono mantenuti in entrambi i casi intorno al 70% e di *eukaryota* che rappresentavano circa il 28%. Differenze in mela si sono osservate nella tesi T1M, dove la quantità di *eukaryota* è incrementata fino al 53% (**Figura 4-3**). Gli altri regni erano presenti in percentuali inferiori all'1%. Interessante notare che i virus sono stati rilevati principalmente nella tesi T1S sia in uva che in fragola (**Figura 4-3**).

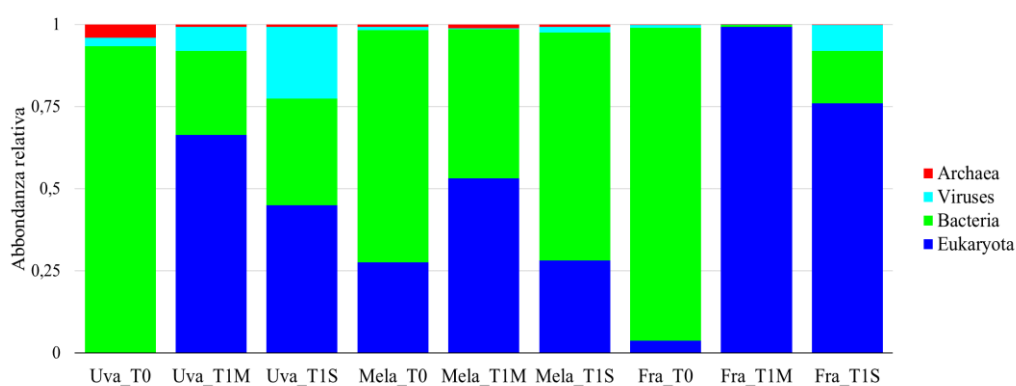


Figura 4-3: *Abbondanza relativa dei microrganismi rilevati in relazione al regno di appartenenza nei campioni di uva, mela e fragola (Fra) analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti dove si sono sviluppati marciumi fungini (T1M) e in quelli sani (T1S) osservati entrambi dopo la conservazione a temperatura ambiente.*

Complessivamente l'analisi di gruppo per ogni tipologia di frutta ha evidenziato in tutte e tre le tipologie la predominanza del phylum *Pseudomonadota*, (sinonimo *Proteobacteria*) un importante phylum di batteri Gram-negativi, e *Chordata* che rappresenta un phylum di animali comprendente i Vertebrati, gli Urocordati ed i Cefalocordati. Una elevata percentuale di microrganismi era costituita dal phylum indicato come *Ascomycota* che include i funghi che producono spore all'interno di sporangi chiamati aschi, con una netta prevalenza in fragola (36%) rispetto a uva e mela (rispettivamente 18% e 15%). Interessante è stato osservare una predominanza di *Actinomycetota* che include batteri Gram-negativi in mela (20%) rispetto alle altre due specie di frutta che, per questo phylum, hanno mostrato valori inferiori al 4%. Gli altri phyla sono risultati annotati in concentrazioni minori e variabili in tutte e tre le tipologie di frutta analizzata (**Figura 4-4**).

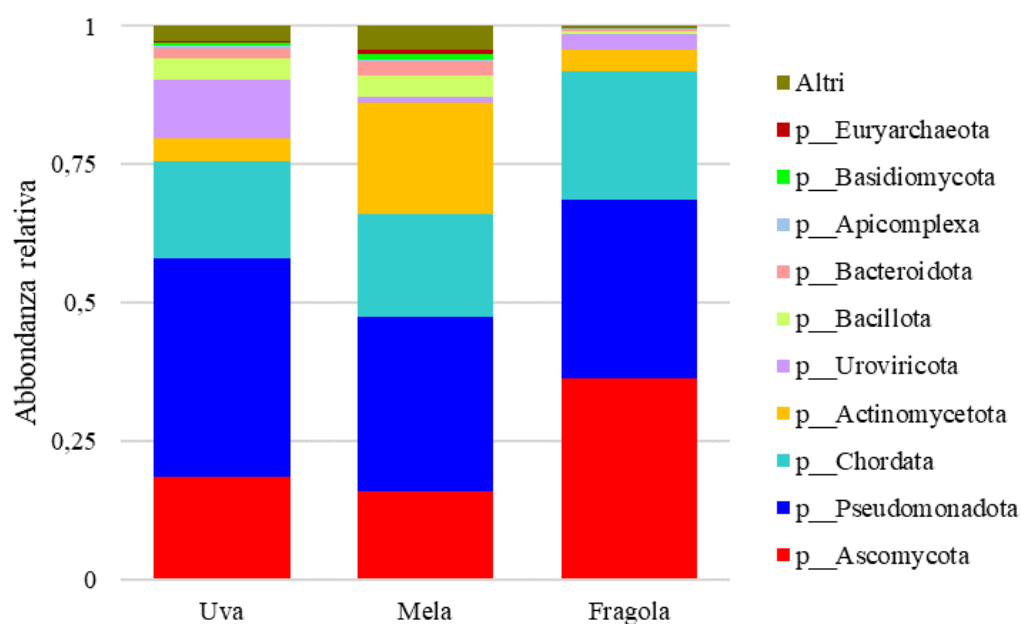


Figura 4-4: *Abbondanza relativa dei 10 phyla principali emersi dall'analisi di gruppo dei campioni di uva, mela e fragola.*

In relazione alle diverse tesi la composizione tassonomica dei 10 phyla più abbondanti si è differenziata all'interno di ogni tipologia di frutta (**Figura 4-5**). Nello specifico la tesi T0 in uva e fragola ha mostrato una prevalenza del phylum *Pseudomonadota*, rispettivamente con percentuali del 96% e 90 %, mentre in mela la quantità di questo phylum era del 37%. In quest'ultima al tempo T0 troviamo una presenza importante di *Actinomycetota* (21%) e *Chordata* (20%). Interessante nella mela la composizione predominante della popolazione microbica è risultata pressoché invariata nella tesi T1 rispetto a quella T0 dove ritroviamo *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* e *Chordata* a concentrazioni rispettivamente del 35%, 24% e 22%. La tesi T1S in uva e fragola ha mostrato un profilo differente rispetto a quello osservato in T0 con alcune similitudini tra loro. In particolare, il phylum batterico *Pseudomonadota* è diminuito drasticamente e la presenza microbica è risultata più frammentata e suddivisa più equamente tra i phyla principali. Il gruppo principale è risultato essere quello dei *Chordata* (40% in uva e 65% in fragola), seguito da quello degli *Uroviricota* (21% in uva e 7% in fragola), *Ascomycota* (2% in uva e 10% in fragola), *Actinomycetota*, (6.8% in uva e 7% in fragola). Il phylum *Bacillota* (sinonimo *Firmicutes*) è risultato molto presente nell' uva, (7%), mentre in fragola è stato identificato a concentrazioni inferiori all'1% (**Figura 4-5**).

La tesi TIM ha mostrato, come atteso, una predominanza dei funghi *Ascomycota* che in fragola ha raggiunto percentuali superiori al 98% mentre in mela e uva era del 40% e 52% rispettivamente (**Figura 4-5**).

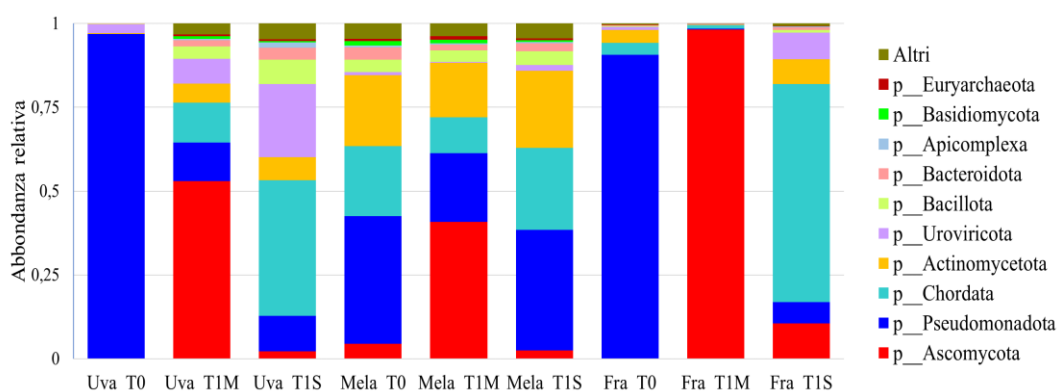


Figura 4-5: *Abbondanza relativa dei 10 phyla principali nei campioni di uva, mela e fragola (Fra) analizzati nei campioni di uva, mela e fragola (Fra) analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti dove si sono sviluppati marciumi fungini (TIM) e in quelli sani (TIS) osservati entrambi dopo la conservazione a temperatura ambiente.*

Inoltre, per comprendere la somiglianza/variazione tra la composizione del microbioma rilevato nei campioni, l'analisi delle coordinate principali (PCoA), ricavata dalla matrice delle distanze genetiche tra le tesi analizzate a livello di phylum, è ampiamente rappresentata dalle coordinate PC1 e PC2 (**Figura 4-6**). L'analisi mette in evidenza una elevata diversità microbica tra i campioni sottolineando una maggiore somiglianza in relazione alle tesi piuttosto che alla tipologia di frutta principalmente in uva e mela. La mappa mostra che la differenza nel gruppo mela è minore rispetto al gruppo fragola e uva. Ciò indica che la struttura della comunità della comunità microbica in mela è in una certa misura più stabile rispetto al gruppo (**Figura 4-6**).

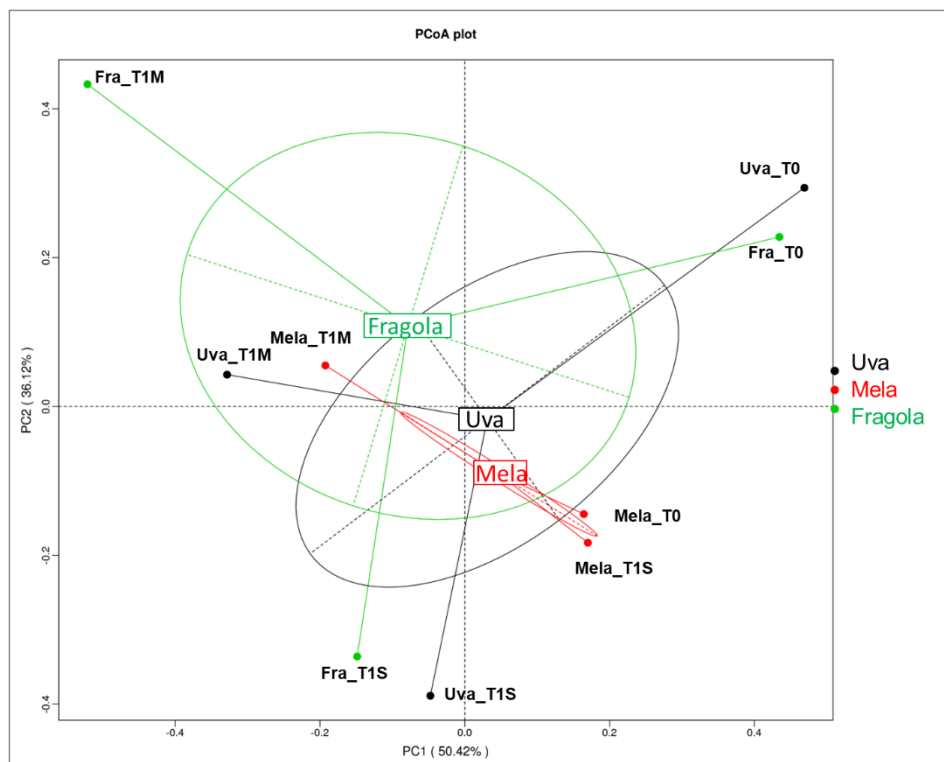


Figura 4-6: Analisi PCoA a livello di phylum basata sulla dissomiglianza di Bray-Curtis rilevata in uva, mela e fragola (Fra) analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti conservati a temperatura ambiente che hanno sviluppato marciumi fungini (T1M) e in quelli sani (T1S).

NOTA: gli assi X e Y mostrano la componente principale 1 e la componente principale 2 relative all'abbondanze e alla somiglianza delle popolazioni microbiche. La percentuale di variazione spiegata dalle coordinate principali tracciate è indicata sugli assi. Ogni punto rappresenta un singolo campione e i colori rappresentano diversi gruppi di campioni.

L'analisi dell'abbondanza dei 35 generi principalmente rappresentati è riportata nella heatmap (**Figura 4-7**).

Per quanto riguarda i campioni analizzati di uva la tesi T0 ha mostrato una abbondanza prevalente dei generi *Salmonella* ed *Escherichia*, phylum *Pseudomonadota*, molto più pronunciata rispetto agli altri generi. Nella tesi T1M si è osservata la prevalenza di diversi generi appartenenti al phylum *Ascomycota* con un'abbondanza predominante per il genere *Penicillium* seguito da *Aspergillus* e *Talaromyces*. Nella tesi T1S è stata osservata una maggior presenza dei generi *Valbivirus* seguita da *Clostridium*, *Paenibacillus* e *Plasmodium* inclusi rispettivamente nei phyla *Uroviricota*, *Bacillota* e *Apicomplexa* (**Figura 4-6**).

Per quanto riguarda la mela è stato confermato anche a livello di genere un profilo molto simile per le tesi T0 e T1S nelle quali predominano i generi *Starkeya*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, (phylum *Pseudomonadota*), *Frigoribacterium*, *Microbacterium*, *Nocardioidea*, (phylum *Actinomycetota*). I generi *Hymenobacter* e *Streptomyces* (phylum *Uroviricota* e *Bacteroidota*, rispettivamente) dominano nella tesi T0, mentre i generi *Xanthomonas*, *Acinetobacter* e *Pantoea* (phylum *Pseudomonadota*), *Rhodococcus*, (phylum *Actinomycetota*), sono risultati ben rappresentati in entrambe le tesi ma con una maggior abbondanza in T1S. In mela, tesi T1M, dominante è risultata la presenza dei generi *Purpureocillium*, *Fusarium*, *Thermothielavioides*, *Neurospora*, *Pyricularia*, *Colletotrichum*, *Zymoseptoria*, *Cercospora* e *Cladosporium* appartenenti al phylum fungino *Ascomycota*.

In fragola se nel tempo T0 predominante rispetto alle altre tesi è risultato il genere *Pseudomonas*, (phylum *Pseudomonadota*), nella tesi TM1 domina il genere *Botrytis* (phylum *Ascomycota*). Nella tesi TS1 più abbondanti sono risultati i generi *Cutibacterium* e *Mycobacterium* (phylum *Actinomycetota*) e Homo (phylum *Chordata*), (**Figura 4-7**).

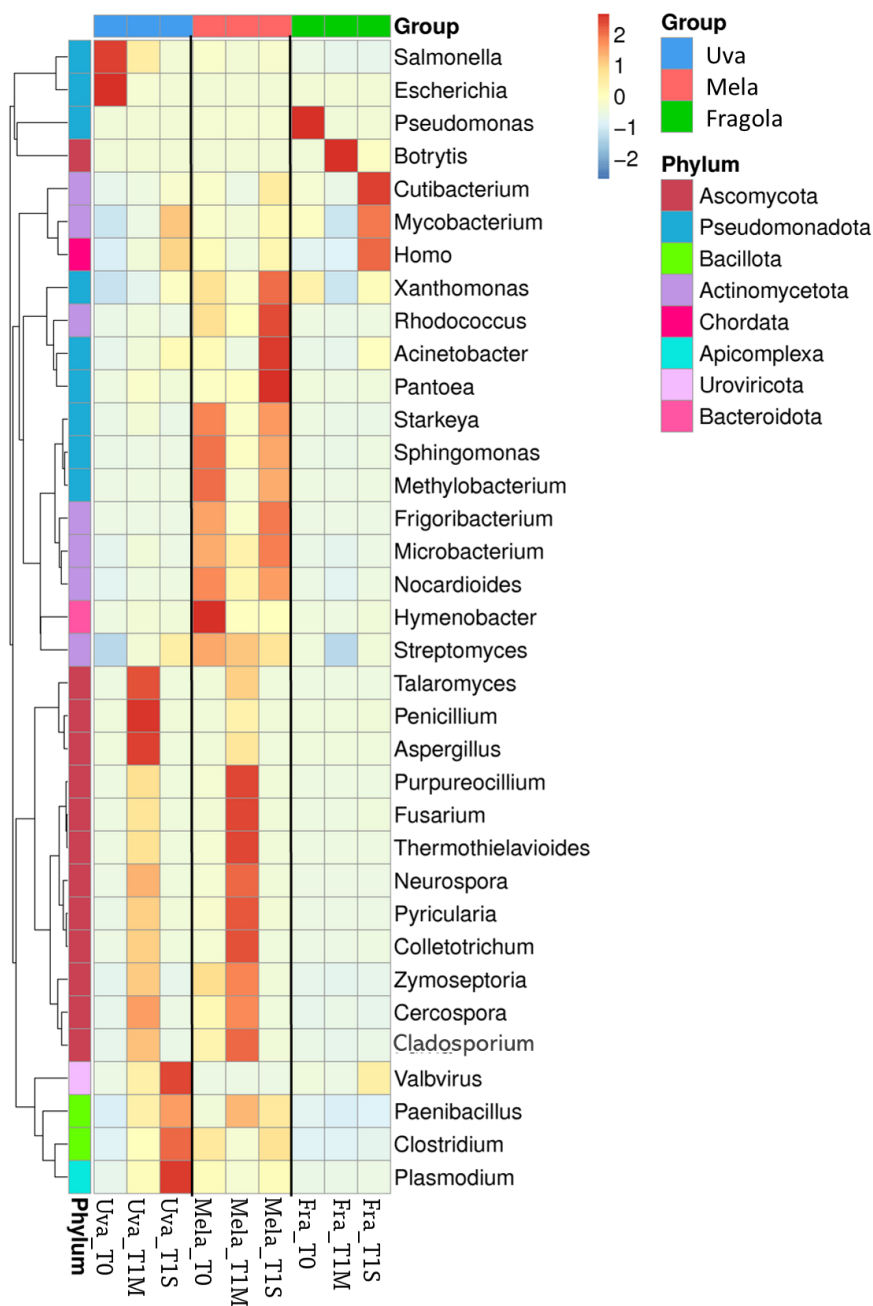


Figura 4-7: Heatmap dei 35 generi principali nei campioni di uva, mela e fragola (Fra) analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti dove si sono sviluppati marciumi fungini (T1M) e in quelli sani (T1S) osservati entrambi dopo la conservazione a temperatura ambiente. L'intensità del colore rappresenta l'abbondanza di genere. Più il colore è vicino al blu, minore è l'abbondanza e più è vicino al rosso, maggiore è l'abbondanza. L'analisi del clustering gerarchico è stata misurata dalla distanza euclidea.

In totale l'indagine metagenomica è stata in grado di identificare nell'uva 175, 371 e 3426 specie, rispettivamente per le tesi T0, T1S e T1M. In particolare, il 28% delle specie identificate in Uva nella tesi T0 sono condivise con quelle identificate nelle altre tesi di uva analizzate, il 13% per la tesi T1S e solo l'1% delle specie identificate nel campione T1M è condiviso con gli altri campioni di uva analizzati (**Figura 4-8a**). Nel microbioma della mela sono state identificate 1487, 899, e 6022 specie microbiche, rispettivamente per le tesi T0, T1S e T1M. In mela le specie condivise per il campione T0 rappresentavano il 52,1%, per il campione T1 l'86,2% e per il campione T1M il 12,8% (**Figura 4-8b**). Per quanto riguarda la fragola l'indagine metagenomica ha individuato 1158, 295 e 541 specie, rispettivamente per le tesi T0, T1S e T1M. In fragola il campione T0 condivideva con le altre tesi il 10,7 % delle specie, il T1S il 42% e il T1M 22,9% (**Figura 4-8c**).

L'analisi delle specie identificate per ogni tipologia di frutta indipendentemente dai singoli campioni testati, mostra che l'uva mostra una quantità di specie non condivise pari al 14,1%, la fragola pari a 11,1 % e la mela pari al 43,1% (**Figura 4-9**).

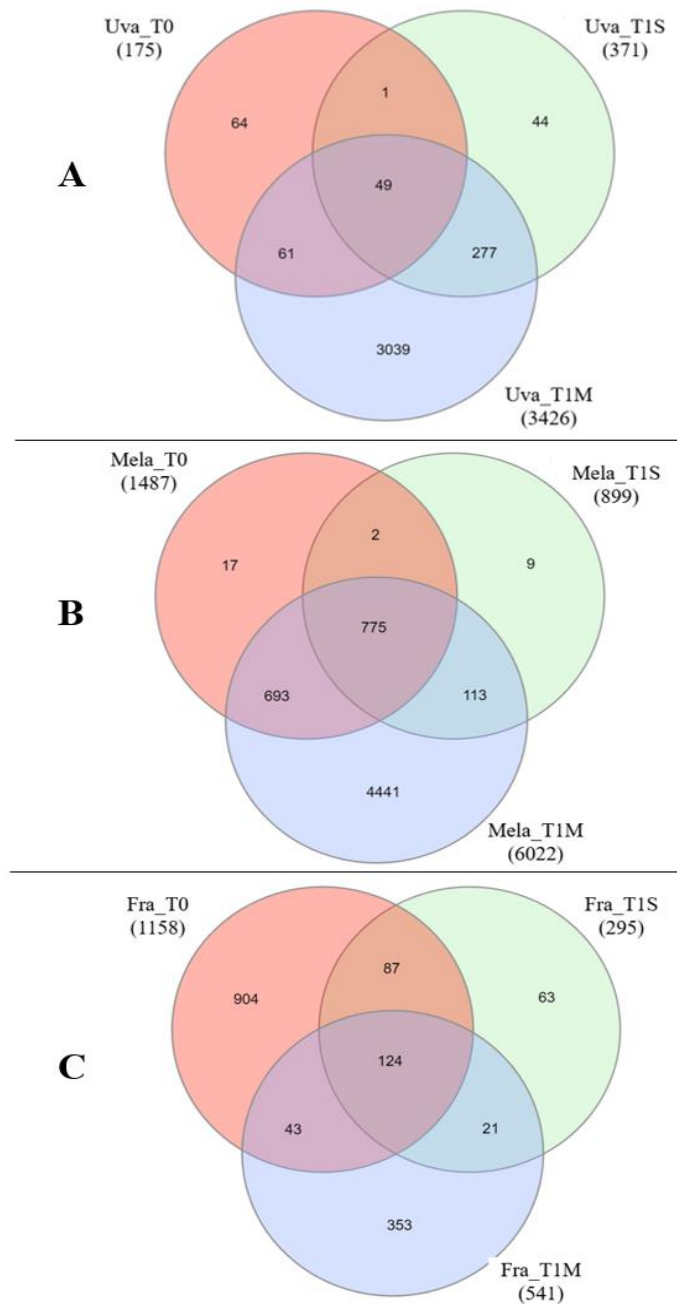


Figura 4-8: Diagramma di venn che mostra il numero di specie condivise e uniche relativa alla popolazione microbica analizzata in uva (a) mela (b) e fragola (c); analizzati nel periodo appena successivo l'acquisto al supermercato (T0), e nei frutti in seguito allo sviluppo dei marciumi fungini (TIM) e in quelli sani (TIS) osservati entrambi dopo la conservazione a temperatura ambiente.

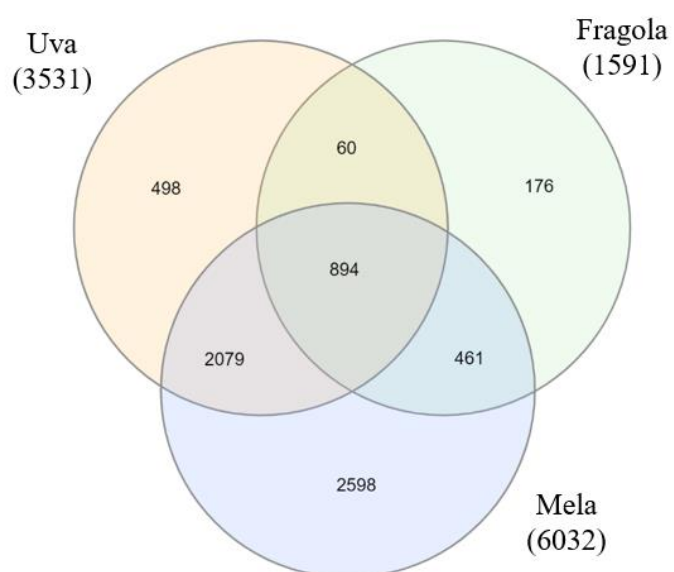


Figura 4-9: Diagramma di venn che mostra il numero di specie condivise e uniche relativa alla popolazione microbica complessiva analizzata in uva (a) mela (b) e fragola (c).

Capitolo 5

DISCUSSIONE

Lo studio del microbioma, l'insieme dei microrganismi associati a un frutto nei vari habitat, sta acquisendo un interesse notevole e sempre più studi stanno emergendo anche in ambito agrario sia per l'importanza dei vegetali nella dieta umana sia per comprendere il ruolo delle comunità microbiche nel controllo biologico dei patogeni in postraccolta (Zhang et al., 2021).

In questo lavoro di tesi è stata fatta una indagine per individuare la popolazione microbica che caratterizza tre tipologie di frutta, mela, uva e fragola, ampiamente utilizzate nella dieta e tra le più presenti nei mercati di tutto il mondo. Abbiamo effettuato uno studio metagenomico utilizzando la tecnologia S-WMS, a nostra conoscenza utilizzata per la prima volta su frutta, che è stata in grado di fornire informazioni complessive sulla composizione della popolazione microbica. Ci siamo concentrati sulla popolazione epifitica presente nella cultivar di mela 'Fuji', fragola 'Candong' e uva 'Redglobe' acquistandole da tre supermercati differenti. Questo per ottenere un risultato che non fosse troppo associato alla provenienza. Lo studio ha avuto come obiettivo quello di mettere in luce come cambia la popolazione microbica dal momento appena successivo l'acquisto al supermercato, (T0), durante la conservazione a temperatura ambiente fino alla comparsa dei primi marciumi (T1M), confrontandoli con la frutta che durante la conservazione non ha subito danni (T1S). In questo lavoro di tesi la comparsa dei marciumi è avvenuta in tempi differenti associati alla differente shelf life, delle tre tipologie di frutta. Quindi in fragola i campioni T1S e T1M sono stati ottenuti dopo 1 settimana di conservazione a temperatura ambiente, in uva dopo 2 settimane e in mela dopo 4 settimane, in linea con la conservabilità di queste specie (Weber, 2014; Feliziani et al., 2015).

I frutti infetti hanno mostrato principalmente marciumi associati a specie del genere *Cladosporium*. Si tratta di un fungo ubiquitario, noto come saprofita e patogeno che causa marciumi nell'uva da tavola in postraccolta (Solairaj et al., 2022; Yang et al., 2023). Nella cultivar 'Redglobe', una varietà popolare per i mercati di esportazione, per il suo sapore e la lunga conservabilità (Dokoozlian et al., 1996), le infezioni in postraccolta dovute a questo fungo sono importanti (Young et al., 2020). In mela è stato isolato anche nella cultivar 'Fuji' (Gao et al., 2013; Kohl et al., 2015) e in fragola in diverse cultivar (Nam et al., 2015; Ayoubi

et al., 2018). Tuttavia, ceppi di *C. cladosporioides* possono avere un potenziale come agenti di biocontrollo per ridurre la ticchiolatura del melo causata da *Venturia inaequalis* nelle foglie e nei frutti (Kohl et al., 2015). Tra gli altri funghi che hanno causato marciumi in fragola emerge *B. cinerea*, agente di marciume grigio, una delle malattie fungine che più colpiscono la fragola (Feliziani et al., 2015; Feliziani and Romanazzi, 2016; Orozco-Mosqueda et al., 2023). Specie appartenenti al genere *Alternaria* e *Penicilium*, sono state isolate in uva e mela. In quest'ultima è stato isolato anche *N. ditissima*, un fungo ascomicete che causa il cancro delle pomacee (Weber, 2014). In questo contesto si è sviluppato questo studio che ha evidenziato per quanto riguarda la popolazione microbica complessiva differenze tra le tipologie di frutta, ma soprattutto tra le differenti tesi testate. In questo lavoro di tesi ci siamo concentrati nell'analisi di microrganismi in particolare in relazione al regno, phylum e genere. Studi successivi saranno effettuati per analizzare nel dettaglio l'abbondanza e l'interazione delle singole specie che sono emerse numerose dall'analisi, in modo particolare su mela. Tuttavia, già a livello di regno, se nella tesi T0 c'è una predominanza del regno dei *bacteria* in tutte le specie di frutta, nella tesi T1S, e, come atteso nella tesi T1M, prevale il regno degli *eukaryota* dove sono inclusi i funghi. Questo risultato sottolinea un accumulo nel tempo di taxa fungini sulla frutta. Oggi si stima che la perdita di frutta postraccolta causata da funghi fitopatogeni rappresenti oltre il 50% della produzione agricola totale di frutta (Zhang et al., 2017). Probabilmente il ruolo dei funghi come patogeni nella frutta ne determina un maggiore sviluppo nel tempo anche su frutti sani. Interessante è osservare già a livello di regno una elevata differenza in abbondanza della popolazione batterica in mela che è di circa il 70%, rispetto all'uva e alla fragola che in T0 rappresenta il 95% del microbioma. Inoltre, in mela il pattern microbico rimane pressoché invariato tra T0 e T1S. Questo risultato potrebbe essere associato ai tempi di conservazione delle mele che, nel nostro esperimento provenivano probabilmente da alcuni mesi di stoccaggio in frigorifero. Le mele 'Fuji' sono tra le ultime varietà di mele ad essere raccolte ovvero da metà ottobre in poi, mentre l'indagine del microbioma in questo lavoro di tesi è stata effettuata in febbraio-marzo. Per quanto riguarda la fragola e l'uva, si tratta di specie fruttifere molto più deperibile e che prevedono periodi di conservazione ridotti. Le differenze più marcate sono emerse con l'analisi dei phyla identificati. In uva e fragola in T0 predomina tra i batteri il phylum *Pseudomonadota*, che rappresenta oltre il 90% dei batteri. Un importante phylum di batteri Gram-negativi che include un'ampia varietà di generi patogeni anche per l'uomo, come *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Legionella*. In mela la popolazione batterica è distribuita in differenti phyla. Infatti, oltre a *Pseudomonadota*, che non supera il 37%, abbondante è il phylum

Actinomycetota, oltre il 20%. Questo è un phylum di batteri Gram-positivi. Il genere *Bifidobacterium* di *Actinomycetota* è il più comune nel microbioma dei neonati umani (Turroni et al., 2012). Inoltre *Actinomycetota* include batteri di grande importanza economica per l'uomo perché l'agricoltura e le foreste dipendono dal loro contributo ai sistemi del suolo (Ghai et al., 2011). Nel suolo aiutano a decomporre la materia organica degli organismi morti in modo che le molecole possano essere riprese dalle piante. Sebbene questo ruolo sia svolto anche dai funghi, gli *Actinomycetota* sono molto più piccoli e probabilmente non occupano la stessa nicchia ecologica. Quindi da questo lavoro di tesi emerge la presenza di una popolazione più eterogenea di batteri in mela rispetto a fragola e uva.

Interessante in mela già al tempo T0 è presente una elevata quantità di organismi appartenenti al phylum *Chordata*, dove sono raggruppati i vertebrati incluso l'uomo. Questo sottolinea una maggiore manipolazione associata al più lungo periodo di conservazione rispetto ad uva e fragola. In quest'ultima questo phylum aumenta notevolmente nelle tesi T1S, probabilmente associato alle continue manipolazioni anche se operate con i guanti. Tuttavia, sottolinea come è delicato l'equilibrio che si instaura tra microrganismi che compongono il microbiota. In generale il pattern osservato in TS1 è molto simile tra fragola e uva, mentre in mela ricalca quanto osservato in T0. Comprende principalmente per i funghi il phylum *Ascomycota*, che include i funghi sporigeni molti dei quali patogeni vegetali. Questo gruppo nella tesi T1S predomina in fragola. Interessante il phylum *Uroviricota* che include batteriofagi è principalmente associato alla fragola e uva, e comprende virus che vivono come ospiti in batteri.

Per quanto riguarda le tesi T1M, come intravisto attraverso l'analisi dei regni, sono i funghi del phylum *Ascomycota*, che includono quelli isolati, a prevalere, in modo quasi assoluto in fragola (99%), mentre per la tesi T1M c'è più similitudine tra uva e mela, con percentuali maggiori nella prima rispetto alla seconda. Questo aspetto riproduce l'incidenza di malattia che in mela è leggermente più bassa rispetto a quella osservata nelle altre tipologie di frutta.

Sulla base dei risultati ottenuti dall'isolamento dei funghi patogeni su frutta e mettendoli in relazione con l'abbondanza dei principali 35 generi mostrati nella heatmap possiamo osservare come l'uva e la mela per la tesi T1M siano abitate da un numero di generi appartenenti al phylum degli *Ascomycota*, molto ampio. Ritroviamo tra questi alcuni dei generi tra i più diffusi e agenti di malattia in frutta come *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Thermothielavioides*, *Neurospora*, *Pyricularia*, *Colletotrichum*, *Zymoseptoria*, *Cercospora*, *Cladosporium*. Alcune specie appartenenti a questi generi sono stati responsabili dei marciumi sviluppati altri non si sono sviluppati. Questo probabilmente è associato all'affinità con

l'ospite. O potrebbero mancare le condizioni ottimali per il loro sviluppo e quindi non riuscire a causare la malattia, oppure le dinamiche che si sviluppano nel microbioma possono in qualche modo impedire lo sviluppo di quest'ultimi. Ad esempio, le specie maggiormente ritrovate in uva appartenenti al genere *Aspergillus* riguardano *A. luchuensis*, *A. chevalieri*, *A. oryzae* (dati non mostrati) che si sviluppano su ospiti differenti (Molina-Hernandez et al., 2023). In merito alla comparazione tra i funghi isolati dai marciumi e quelli identificati nel microbioma, il genere *Alternaria* non è merso in quest'ultimo. Le ragioni possono essere molteplici, tuttavia, va evidenziato che i nuovi sistemi di indagine metagenomica si stanno evolvendo molto velocemente negli ultimi anni ma la completezza dei database e l'assegnazione tassonomica, come anche l'utilizzo uniforme dei termini spesso non sono adeguatamente aggiornate (Angeli et al., 2019). Molti altri studi elogiano questo nuovo tipo di analisi ma ne dichiarano l'incompletezza e l'inattendibilità dell'assegnazione tassonomica soprattutto per i livelli più bassi (es. specie) (Jo et al., 2021). L'esperienza effettuata in questo lavoro di tesi ha evidenziato che è stato necessario utilizzare librerie presenti in database differenti per fare emergere con più chiarezza le specie fungine. L'utilizzo di librerie differenti ha portato alla modifica dei nomi tassonomici utilizzati precedentemente questo ha comportato una ricerca aggiuntiva per associare i nuovi sinonimi alle classiche annotazioni tassonomiche.

In fragola la predominanza del genere *Botrytis* è associata alla presenza di *B. cinerea*, che costituisce la quasi totalità della popolazione microbica nella tesi TIM (dati non mostrati), e che rappresenta la specie fungina predominante isolata sottolineando la virulenza di questa specie.

Analizzando le tesi che includevano frutti sani, in uva in T0 va evidenziata la maggior presenza dei generi *Salmonella* ed *Escherichia*, il che suggerisce qualche preoccupazione per i consumatori essendo generi che includono specie batteriche tossiche per l'uomo. Chiaramente ne andrebbe valutata la concentrazione per stabilire se supera valori di tossicità tollerabili. *Pseudomonas*, genere di batteri Gram-negativi prevale in fragola nella tesi T0 che include specie ubiquitarie. Alcuni studi attribuiscono a questo genere un ruolo nel deterioramento degli alimenti di origine vegetale (Wareing et al., 2010) e animale (Wickramasinghe et al., 2019), è noto che possono svolgere un ruolo importante nella resistenza alle malattie delle piante. È stato scoperto che *Pseudomonas putida* può inibire la germinazione delle spore di *Penicillium digitatum* (Yu & Lee, 2015), e che *Pseudomonas aeruginosa* può inibire la germinazione delle spore di *Colletotrichum truncatum* e ridurre l'incidenza dell'antracnosi del peperone (Sandani et al., 2019). Molti ceppi di *Pseudomonas* possono produrre sostanze bioattive per resistere a molte malattie delle piante (Dimkić et al.,

2022). Queste specie sono state identificate in fragola al tempo T0 ma sono decadute drasticamente in T1M e T1S. In generale nella tesi T1S è interessante notare che i generi prevalenti cambiano rispetto al T0. In uva in T1S oltre a protozoi del genere *Plasmodium* tra i batteri aumenta *Mycobacterium*, *Bacillota* che hanno un ruolo come patogeni, e il *Paenibacillus*, notevole dal punto di vista della sicurezza alimentare poiché i membri di questo genere sono stati collegati all'inibizione della crescita di *Salmonella*, (Sprando et al., 2017) identificata abbondante in uva al tempo T0. Questo suggerisce una competizione nel tempo tra le specie di questi due generi. Infatti, nella tesi T1S in uva il genere *Salmonella* diminuisce drasticamente rispetto al tempo T0. Mentre in fragola predominano i batteri *Cutibacterium* e *Mycobacterium*. In entrambe le specie la componente fungina rimane molto bassa.

Su mela si nota come il microbioma anche in base ai generi mostri una somiglianza molto elevata per le tesi T0 e T1S, evidenziando, a differenza di quanto osservato in mela e fragola, la composizione tassonomica è rimasta stabile nel tempo. Questo ci può suggerire che il microbioma presente sulla mela si sia in qualche modo già stabilizzato prima del momento dell'acquisto. Sono tanti i generi batterici coinvolti. Studi precedenti hanno evidenziato che la mela commestibile contiene quasi 100 milioni di batteri (Wassermann, et al., 2019).

Tra questi l'elevata presenza del genere *Acinetobacter*, *Pantoea* nella tesi T1S suggerisce un possibile danneggiamento poiché è noto che questi contribuiscono al deterioramento degli alimenti (Parlapani et al., 2013; Gu et al., 2018). Inoltre, entrambi i generi sono stati indicati come particolarmente abbondanti in mela coltivata con metodi convenzionali mentre *Methylobacterium*, *Hymenobacter*, ritrovati abbondanti in mela al tempo T0 sono anche associati a mela coltivata in regime biologico (Wassermann et al., 2019). Tuttavia, analisi ulteriori, che coinvolgeranno un'analisi più approfondita a livello di specie, saranno necessarie per comprendere il ruolo dei diversi microrganismi nella conservabilità della frutta.

Capitolo 6

CONCLUSIONI

Questa tesi aggiunge nuove informazioni sulla tipologia di microrganismi che risiedono in mela, uva e fragola in postraccolta. Si tratta di frutti di elevato interesse economico, in quanto parte integrante della dieta umana e che troviamo in tutti i supermercati anche fuori dalla stagionalità. Da questo studio è emerso come siano differenti le comunità microbiche in relazione alle tipologie di frutta ma ancora di più in relazione ai tempi di conservazione e, come atteso, alla comparsa di marciumi di origine fungina. L'analisi del microbioma nelle tesi ottenute dai frutti con presenza di marciumi è coerente con la tipologia di funghi isolati e caratterizzati mediante sequenziamento Sanger, ma evidenzia in questi campioni anche la presenza di una ricca popolazione di microrganismi, funghi e batteri, che non hanno prodotto sintomi su frutti. Sottolineando l'importanza della relazione specifica ospite-patogeno nello sviluppo della malattia. Interessante è stato osservare che le specie di frutta altamente deperibili mutano molto rapidamente la composizione microbica durante la conservazione a temperatura ambiente. Infatti, se subito dopo l'acquisto al supermercato predomina la popolazione batterica costituita da *Pseudomonadota*, dove sono raggruppati anche molti batteri responsabili delle tossinfezioni alimentari come i generi *Salmonella* ed *Escherichia*, dopo la conservazione a temperatura ambiente, 1 settimana per fragola e 2 per l'uva, a predominare sono i funghi *Ascomycota*, indipendentemente o meno dalla presenza di marciumi fungini. In mela, un frutto ad elevata conservabilità, la popolazione fungina è già numericamente presente al momento dell'acquisto insieme a una popolazione batterica che è costituita da *Pseudomonadota*, e *Actinomycetota*. Questi ultimi includono molti batteri che rientrano anche nella composizione del microbiota umano oltre ad altri utili in agricoltura. Interessante in mela la popolazione dopo quattro settimane di conservazione a temperatura ambiente non cambia. Questo risultato suggerisce l'instaurazione, per un periodo più ampio rispetto alle specie deperibili, di un equilibrio tra la popolazione microbica. L'analisi delle singole specie microbiche costituenti il microbioma nelle differenti fasi di conservazione dei frutti potrà chiarire questi aspetti.

Concludendo, l'analisi del microbioma si sta sempre più ampliando e le nuove scoperte possono essere utili in diversi settori, ma l'incognita è ancora ampia e nuovi studi saranno necessari per avere più consapevolezza di questo grande mondo ancora da esplorare e comprendere.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelfatah A., Wisniewski M., Li Destri Nicosia M. G., Cacciola S. O., Schena L. 2016. Metagenomic analysis of fungal diversity on strawberry plants and the effect of management practices on the fungal community structure of aerial organs. *PLoS ONE*, 11: e0160470. doi:org/10.1371/journal.pone.0160470.
- Abdelfattah A., Malacrino A., Wisniewski M., Cacciola S. O., Schena L. 2018. Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biological Control*, 120: 1-10. doi:org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.009.
- Allard S. M., Ottesen A. R., Micallef S. A. 2020. Rain induces temporary shifts in epiphytic bacterial communities of cucumber and tomato fruit. *Scientific Reports*, 10: 1765. doi:10.1038/s41598-020-58671-7.
- Angeli D., Sare A. R., Jijaklib M. H., Pertota I., Massart S. 2019. Insights gained from metagenomic shotgun sequencing of apple fruit epiphytic microbiota. *Postharvest Biology and Technology*, 153: 96–106. doi:org/10.1016/j.postharvbio.2019.03.020.
- Ayoubi N., Soleimani M., Zare R. 2018. *Cladosporium* species, a new challenge in strawberry production in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, 56: 486–493. doi:org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-20151.
- Berg G., Krause R., Mendes R. 2015. Cross-kingdom similarities in microbiome ecology and biocontrol of pathogens. *In Frontiers in Microbiology*, 6: 1311. doi:10.3389/fmicb.2015.01311.
- Berg G., Rybakova D., Fischer D., Cernava T., Verges M. C. C., Charles T. et al. 2020. Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *In Microbiome*, 8: 103. doi:10.1186/s40168-020-00875-0.

- Bright M., Bulgheresi S. 2010. A complex journey: Transmission of microbial symbionts. *In Nature Reviews Microbiology*, 8: 218–230. doi:org/10.1038/nrmicro2262.
- Chen K., Pachter L. 2005. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS computational biology*, 1:e24. doi:org/10.1371/journal.pcbi.0010024.
- Colin R. J., Stone B. W. G., Tyler H. L. 2015. Emerging perspectives on the natural microbiome of fresh produce vegetables. *Agriculture* 5: 170-187. doi:org/10.3390/agriculture5020170.
- Cruz A. F., Barka G. D., Sylla J., Reineke A. 2018. Biocontrol of strawberry fruit infected by *Botrytis cinerea*: Effects on the microbial communities on fruit assessed by next-generation sequencing. *Journal of Phytopathology*, 166: 403–411. doi:org/10.1111/jph.12700.
- Delgado-Baquerizo M., Maestre F. T., Reich P. B., Jeffries T. C., Gaitan J. J., Encinar D. et al. 2016. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*, 7: 10541. doi:org/10.1038/ncomms10541.
- De Miccolis Angelini R. M., Romanazzi G., Pollastro, S., Rotolo C., Faretra F., Landi L. 2019. New high-quality draft genome of the brown rot fungal pathogen *Monilinia fructicola*. *Genome Biology and Evolution*, 11: 2850–2855. doi:10.1093/gbe/evz207.
- Di Canito A., Mateo-Vargas M. A., Mazzieri M., Cantoral J., Foschino R., Cordero-Bueso G., et al. 2021. The role of yeasts as biocontrol agents for pathogenic fungi on postharvest grapes: A review. *Foods* 10: 1650. doi:org/10.3390/foods10071650.
- Dimkić I., Janakiev T., Petrović M., Degrassi G., Fira D. 2022. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiological and molecular plant pathology* 117: 117. doi:10.1016/j.pmpp.2021.101754.
- Diskin S., Feygenberg O., Maurer D., Droby S., Prusky D., Alkan N. 2017. Microbiome alterations are correlated with occurrence of postharvest stem-end rot in mango fruit. *Phytobiomes Journal*, 1: 117-127. doi:org/10.1094/PBIOMES-05-17-0022-R.
- Dokoozlian N., Luvisi D., Moriyana M., Schrader P. 1996. Influence of cultural practices in the berry size and composition of Redglobe table grapes. *University of California Cooperative Extension (UCCE)*. Pub. TB6-96.

- Doyle J. J., Doyle J. L., Brown A.H., Grace J. P. 1990. Multiple origins of polyploids in the *Glycine tabacina* complex inferred from chloroplast DNA polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 714-717.
- Droby S., Wisniewski M. 2018. The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biolog. *Postharvest Biology and Technology*, 140: 107–112. doi:org/10.1016/j.postharvbio.2018.03.004.
- Emery K. M., Michailides T. J., Scherm H. 2000. Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia. *Plant Disease*, 84: 853-857. doi: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*. 5: 111-1177. doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.078.
- Feliziani E., Romanazzi G. 2016. Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research* 6: 47-63. doi:10.3233/jbr-150113.
- Frank A., Saldierna Guzman J., Shay J. 2017. Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, 5: 70. doi:10.3390/microorganisms5040070.
- Gao L. L., Zhang Q., Sun X. Y., Jiang L., Zhang R., Sun G.Y., et al. 2013. Etiology of moldy core, core browning, and core rot of fuji apple in China. *Plant Disease* 97,; 510-516. doi: 10.1094/PDIS-01-12-0024-RE. PMID: 30722224.
- Ghai R., Rodriguez-Valera F., McMahon K. D., Toyama D., Raquel D., Rinke R. et al. 2011. Lopez-Garcia P (ed.). "Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river". *PLOS ONE*, 6: e23785. Bibcode:2011PLoSO623785G. doi:10.1371/journal.pone.0023785.
- Gu G., Ottesen A., Bolten S., Ramachandran P., Reed E., Rideout S., et al. 2018. Shifts in spinach microbial communities after chlorine washing and storage at compliant and abusive temperatures. *Food Microbiology* 73, 73–84. doi:10.1016/j.fm.2018.01.002.

- Handelsman J., Rondon M. R., Brady S. F., Clardy J., Goodman, R. M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5: R245-R249. doi:10.1016/s1074-5521(98)90108-9.
- Hardoim P. R., van Overbeek L. S., Berg G., Pirttilä A. M., Compant S., Campisano A. et al. 2015. The hiddenworld within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79: 293-320. doi:10.1128/MMBR.00050-14.
- Holb I. J. 2006. Possibilities of brown rot management in organic stone fruit production in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 12: 87–91. doi:org/10.31421/IJHS/12/3/665.
- Hooks K. B., O'Malley M. A. 2017. Dysbiosis and its discontents. *MBio*, 8:e01492-17. doi: 10.1128/mBio.01492-17.
- Horner W. E. , Worthan A. G., Morey P.R. 2004. Air- and dustborne mycoflora in houses free of water damage and fungal growth. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 6394-6400. doi:10.1128/CMR.00056-10.
- Jo Y., Back C.-G., Kim K.-H., Chu H., Lee J. H., Moh S.H. et al. 2021. Comparative study of metagenomics and metatranscriptomics to reveal microbiomes in overwintering pepper fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 6202. doi:org/10.3390/ijms22126202.
- Kohl J., Scheer C., Holb I. J., Masny S., Molhoek, W. M. L. 2015. Toward an integrated use of biological control by " *Cladosporium cladosporioides* H39 in apple scab (*Venturia inaequalis*) management. *Plant Disease*, 99:535-543. doi:10.1094/PDIS-08-14-0836-RE.
- La Reau, A.J., Strom, N.B., Filvaroff, E. Mavrommatis K, Ward T.L., Knights D. 2023. Shallow shotgun sequencing reduces technical variation in microbiome analysis. *Scientific Reports* 13: 7668. doi:org/10.1038/s41598-023-33489-1.
- Landi L., De Miccolis Angelini R. M., Pollastro S., Abate D., Faretra F. et al. 2018. Genome sequence of the brown rot fungal pathogen *Monilinia fructigena*. *BMC Res. Notes* 11: 758. doi:10.1186/s13104-018-3854-z.

- Landi L., Pollastro S., Rotolo C., Romanazzi G., Faretra F., De Miccolis Angelini R. M. 2020. Draft genomic resources for the brown rot fungal pathogen *Monilinia laxa*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 33: 145–148. doi:10.1094/MPMI-08-19-0225-A.
- Martini C., Mari M. 2014. “*Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (Monilinia rot, brown rot),” in postharvest decay, control strategies, ed. S. Bautista-Baños (Cambridge, MA: Academic Press Elsevier).
- Molina-Hernandez J. B., Tappi S., Gherardi M., de Flaviis R., Laika J. Yolima Peralta-Ruiz Y et al. 2023. Cold Atmospheric plasma treatments trigger changes in sun-dried tomatoes mycobiota by modifying the spore surface structure and hydrophobicity. *Food Control*. 145: 109453, doi:org/10.1016/j.foodcont.2022.109453.
- Nam M. H., Park M. S., Kim H. S., Kim T. I., Kim H. G. 2015. *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* cause blossom blight in strawberry in Korea. *Mycobiology*. 43: 354-9. doi:10.5941/MYCO.2015.43.3.354.
- Ngolong Ngea G. L., Qian X., Yang Q., Dhanasekaran S., Ianiri G., Ballester A. R., et al. 2021. Securing fruit production: Opportunities from the elucidation of the molecular mechanisms of postharvest fungal infections. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 20: 2508-2533. doi: 10.1111/1541-4337.
- Ogórek R., Lejman A., Pusz W., Miłuch A., Miodyńska P. 2012. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia Lekarska*, 19: 80-85.
- Orozco-Mosqueda M.d.C., Kumar A., Fadji A. E., Babalola O. O., Puopolo G., Santoyo G. 2023. Agroecological management of the grey mould fungus *Botrytis cinerea* by plant growth-promoting bacteria. *Plants*, 12: 637. doi:org/10.3390/plants12030637.
- Parlapani F. F., Meziti A., Kormas K. A., Boziaris I. S. 2013. Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiology*, 33: 85–89. doi: 10.1016/j.fm.2012.09.001.
- Patriarca Andrea. 2019. Fungi and mycotoxin problems in the apple industry. *Current Opinion in Food Science*, 29:42–47. doi:org/10.1016/j.cofs.2019.08.002.

- Quince C., Walker A. W., Simposon J. T., Ioman N. J., Segata N. 2017. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*. 35: 833-844. doi: 10.1038/nbt.3935.
- 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*. doi:75:24-27 10.1016/j.postharvbio.2012.07.007.
- Romanazzi G., Smilanick J. L., Feliziani E., Droby S. 2016. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113: 69–76. doi:org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.003.
- Rousseaux S., Diguta C. F., Radoi-Matei F., Alexandre H., Guilloux-Bénatier M. 2014. Non-*Botrytis* grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. *Food Microbiology*, 38: 104-121. doi: 10.1016/j.fm.2013.08.013.
- Saif F.A., Yaseen S. A., Alameen A. S., Mane S. B., Undre P. B. 2021. Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV–Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246: 119010. doi:org/10.1016/j.saa.2020.119010.
- Saletnik B., Zagula G., Saletnik A., Bajcar M., Słysz E., Puchalski C. 2022. Method for prolonging the shelf life of apples after storage. *Applied Science*, 12: 3975. doi:org/10.3390/app12083975.
- Sandani H. B. P., Ranathunge N. P., Lakshman P. L. N., Weerakoon W. M. W. 2019. Biocontrol potential of five Burkholderia and Pseudomonas strains against Colletotrichum truncatum infecting chilli pepper. *Biocontrol Science and Technology* 29: 727-745, doi:10.1080/09583157.2019.1597331.
- Sanderson P. G., Spotts R. A. 1994. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology*, 85: 103-110.
- Sangiorgio D., Cellini A., Donati I., Ferrari E., Tanunchai B., Wahdan S., et al. 2022. Taxonomical and functional composition of strawberry microbiome is genotype-dependent. *Journal of Advanced Research*, 42: 189–204. doi:org/10.1016/j.jare.2022.02.009.

- Sequino G., Valentino V., Torrieri E., De Filippis F. 2022. Specific microbial communities are selected in minimally-processed fruit and vegetables according to the type of product. *Foods* 11: 2164. doi:org/10.3390/foods11142164.
- Singh P., Santoni S., This P., Peros J. P. 2018. Genotype-environment interaction shapes the microbial assemblage in grapevine's phyllosphere and carposphere: *An NGS approach. Microorganisms*, 6: 96 doi:10.3390/microorganisms6040096.
- Solairaj, D., Legrand, N.N.G., Yang, Q., Liu, J., Zhang, H. 2022. Microclimatic parameters affect Cladosporium rot development and berry quality in table grapes. *Horticultural Plant Journal*, 8: 171-183 doi:org/10.1016/j.hpj.2021.07.002.
- Solairaj D., Yang Q., Legrand N. N. G., Routledge M. N., Zhang H. 2021. Molecular explication of grape berry-fungal infections and their potential application in recent postharvest infection control strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 116: 903–917. doi:10.1016/j.tifs.2021.08.037.
- Sprando R. L., Black T., Olejnik N., Keltner Z., Topping V., Ferguson M., et al. 2017. Assessing the effect of oral exposure to *Paenibacillus alvei*, a potential biocontrol agent, in male, non-pregnant, pregnant animals and the developing rat fetus. *Food and Chemical Toxicology* 103: 203–213. doi:10.1016/j.fct.2017.03.009.
- Sun D., Qu J., Huang Y., Lu J., Yin L. 2021. Analysis of microbial community diversity of muscadine grape skins. *Food Research International*, 145. doi:10.1016/j.foodres.2021.110417.
- Sylla J., Alsanian B. W., Krüger E., Wohanka W. 2015. Control of *Botrytis cinerea* in strawberries by biological control agents applied as single or combined treatments. *European Journal of Plant Pathology*, 143: 461–471. doi:10.1007/s10658-015-0698-4.
- Thomma B. P. H. J. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4: 225-236. doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x.
- Tringe S. G., Rubin E. M. 2005. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature reviews genetics*, 6: 805-814. doi:org/10.1038/nrg1709

- Turrone F., Peano C., Pass D.A., Foroni E., Severgnini M., Claesson M.J. et al. 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLOS ONE*, 7: e36957. doi:10.1371/journal.pone.0036957.
- Vandenkoornhuyse P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A., Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206: 1196–1206. doi:10.1111/nph.13312.
- Wareing P., Stuart F., Fernandes R. 2010. Food-Spoilage Bacteria. London: Royal Society of Chemistry.
- Wassermann B., Müller H., Berg G. 2019. An apple a day: which bacteria do we eat with organic and conventional apples? *Frontiers in Microbiology*, 10:1629. doi:10.3389/fmicb.2019.01629.
- Weber R. 2014. Biology and control of the apple canker fungus *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) from a Northwestern European perspective. *Erwerbs-Obstbau*, 56: 95–107 doi:org/10.1007/s10341-014-0210-x.
- White T.I., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribo-somal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Wickramasinghe N.N., Ravensdale J.T., Coorey R., Dykes G.A., Scott Chandry P. 2019. In situ characterisation of biofilms formed by psychrotrophic meat spoilage pseudomonads. *Biofouling*, 35: 840-855, doi:10.1080/08927014.2019.1669021.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan J. A. L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8: 561-580. doi:org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.
- Wooley J.C., Godzik A., Friedberg I. 2010. A Primer on Metagenomics. *PLoS Comput Biol*, 6: e1000667. doi:org/10.1371/journal.pcbi.1000667.

- Xu W., Chen T., Pei Y., Guo H., Li Z., Yang Y. et al. 2021. Characterization of shallow whole-metagenome shotgun sequencing as a high-accuracy and low-cost method by complicated mock microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 12: 678319. doi:10.3389/fmicb.2021.678319.
- Yang Y., Luo W., Zhang W., Mridha M. A. U., Wijesinghe S. N., McKenzie E. H. C. et al. 2023. *Cladosporium* species associated with fruit trees in guizhou province, China. *Journal of Fungi*, 9: 250. doi:org/10.3390/jof9020250.
- Young C., Choudhury R., Crisosto C., Gubler W. 2020. Brown spot in table grape Redglobe controlled in study with sulfur dioxide and temperature treatments. *Calif Agr*, 74: 163-168. doi:org/10.3733/ca.2020a0022.
- Yu S.M., Lee Y.H. 2015. Genes involved in nutrient competition by *Pseudomonas putida* JBC17 to suppress green mold in postharvest satsuma mandarin. *Journal of Basic Microbiology*, 55: 898-906. doi:10.1002/jobm.201400792.
- Zhang H., Mahunu G. K., Castoria R., Apaliya M.T. Yang Q. 2017. Argumentation of biocontrol agents with physical methods against postharvest diseases of fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 69: 36-45. doi:10.1016/j.tifs.2017.08.020.
- Zhang H., Serwah Boateng N. A., Ngolong Ngea G. L., Shi Y., Lin H., Yang Q. et al. 2021. Unravelling the fruit microbiome: The key for developing effective biological control strategies for postharvest diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20: 4906-4930, doi:10.1111/1541-4337.12783.