



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI SPORE
AERODIFFUSE DI *MONILINIA* SPP. IN PESCHETO
E VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI
TRATTAMENTI CON OZONO SUL MARCIUME
BRUNO DELLE DRUPACEE IN POSTRACCOLTA

*MOLECULAR IDENTIFICATION OF
MONILINIA SPP. SPORES IN PEACH ORCHARD AIR
AND EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF OZONE
TREATMENT ON POSTHARVEST BROWN ROT OF
STONE FRUITS*

Studente:
DAVIDE PRINCIPI

Relatore:
PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

Correlatore:
DOTT. LUCIA LANDI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

INDICE

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUZIONE	7
1.1 MARCIUME BRUNO DELLE DRUPACEE: MONILIOSI	7
1.2 LE SPECIE AGENTI CAUSALI DI MONILIOSI	7
1.3 SINTOMATOLOGIA	12
1.4 I MEZZI DI CONTROLLO FISICI IN POSTRACCOLTA	17
1.5 OZONO	19
1.5.1 Meccanismi biochimici di trattamenti in postraccolta	22
2 OBIETTIVI DELLA RICERCA	25
3 MATERIALI E METODI	27
3.1 PROVA SPERIMENTALE 1: VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DI PATOGENI FUNGINI IN POSTRACCOLTA E DELL'EFFICACIA DELL'OZONO SUL CONTENIMENTO DELLA MONILIOSI	27
3.1.1 Materiale vegetale	27
3.1.2 Trattamenti preraccolta	28
3.1.3 Trattamenti postraccolta	30
3.1.4 Valutazione delle infezioni latenti	32
3.2 PROVA SPERIMENTALE 2: IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI SPORE AERODIFFUSE DI MONILINIA SPP. IN PESCHETO	34
3.2.1 Raccolta campioni	34
3.2.2 Raccolta campioni	34
3.2.3 Analisi molecolare degli estratti	35
3.2.3.1 Validazione del DNA estratto	35
3.2.3.2 Analisi PCR mediante primers specifici a M. fructigena, M. fructicola, M. laxa	36
3.2.3.2.1 PCR convenzionale in Multiplex	37

3.2.3.2.2	<i>PCR quantitativa Real Time (qPCR)</i>	38
3.2.3.2.3	<i>Droplet Digital PCR (ddPCR)</i>	39
4	RISULTATI	41
4.1	PROVA SPERIMENTALE 1: VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DI PATOGENI FUNGINI IN POST RACCOLTA E DELL'EFFICACIA DELL'OZONO SUL CONTENIMENTO DELLA MONILIOSI	41
4.1.1	Diffusione della moniliosi su pesche in postraccolta senza conservazione	41
4.1.2	Diffusione della moniliosi su pesche in postraccolta frigoconservate in atmosfera controllata con ozono per 10 giorni	42
4.1.3	Diffusione della moniliosi su pesche in postraccolta frigoconservate in atmosfera controllata con ozono per 20 giorni	42
4.2	PROVA SPERIMENTALE 2: IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI SPORE AERODIFFUSE DI MONILINIA SPP. IN PESCHETO	45
4.2.1	Validazione del DNA estratto	45
4.2.2	PCR convenzionale in Multiplex	46
4.2.4	Droplet Digital PCR (ddPCR)	49
5	DISCUSSIONE	51
6	CONCLUSIONI	56
7	BIBLIOGRAFIA	57

RIASSUNTO

La moniliosi o marciume bruno è una malattia che colpisce drupacee e pomacee, causata da funghi del genere *Monilinia*. Questa fitopatia è riconosciuta come una delle più dannose a livello mondiale e causa gravi perdite di produzione sia in campo, sia in postraccolta. Con l'obiettivo di potenziare le conoscenze utili a strategie di protezione integrata, in questo lavoro sono state sviluppate due sperimentazioni relative alla moniliosi su drupacee. Una ha riguardato lo studio dell'efficacia di trattamenti in postraccolta a base di ozono quale prodotto alternativo per il controllo delle infezioni causate da *Monilinia* spp. in pesche della cultivar 'Extreme 486' provenienti dell'azienda 'Acciari Società Agricola S.R.L.' (Ortezzano, FM). Lo studio ha evidenziato l'efficacia della frigoconservazione in atmosfera controllata con ozono nel test a 20 giorni rispetto alla frigoconservazione tradizionale. L'identificazione delle specie aerodiffuse di *Monilinia* è stata svolta in un frutteto dell'azienda 'Mazzoni' (Montedinove, AP), mediante analisi molecolare effettuata sulle membrane relative al captaspore volumetrico mediante PCR quantitativa Real Time e droplet digital PCR. I risultati mostrano la presenza di *M. laxa* ed *M. fructicola* sia nel periodo tra marzo-inizio aprile, corrispondente alla fase fenologica della fioritura, sia nel periodo luglio-ottobre, corrispondente alla fase di raccolta. *M. fructigena* è stata rilevata principalmente nel periodo primaverile. Questo lavoro di tesi è stato realizzato nell'ambito del progetto PSR Marche 'ZeroSprechi' (www.zerosprechi.info), e suggerisce che per un'agricoltura sostenibile l'applicazione di trattamenti con prodotti alternativi, unita al monitoraggio delle principali specie presenti in campo potrebbe consentire lo sviluppo di strategie di lotta più innovative ed eco-compatibili nel controllo della moniliosi.

ABSTRACT

Brown rot is a disease of stone fruit and pome fruit caused by fungus of the genus *Monilinia*. This disease is one of the most important fungal diseases in the world, and it can cause heavy losses in the field and postharvest. With the idea of strengthening the useful knowledge and the integrated defensive strategies against this disease, in this work we developed two tests associated with brown rot. The first one was on the effectiveness of ozone as a postharvest alternative treatment in limiting the infections from *Monilinia* spp. on peaches cv. 'Extreme 486' collected from 'Acciari Società Agricola S.R.L.' (Ortezzano, FM). The work shows the effectiveness of cold with gaseous ozone storage in the 20 days test, in comparison with only cold storage. The second test was on the identification of the air broadcast spore of *Monilinia* spp. from the 'Mazzoni' agency's orchard (Montedinove, AP). The molecular analysis on the spore-trap with qPCR and ddPCR show the presence of *M. laxa* and *M. fructicola* between the end of March and the beginning of April, corresponding with the phenological phase of blooming, and from July to October, corresponding with the ripening and harvest of the fruit. *M. fructigena* was observed only in spring. This work is run within PSR Marche project 'ZeroSprechi' (www.zerosprechi.info), and suggests that the application of alternative treatment with the monitoring of the most common pathogens could support the development of innovative and eco-friendly strategies against brown rot of stone fruit.

1 INTRODUZIONE

1.1 MARCIUME BRUNO DELLE DRUPACEE: MONILIOSI

Il marciume bruno delle drupacee (in inglese *brown rot*) è una malattia crittogamica causata da specie di funghi appartenenti al genere *Monilinia* Honey, e rientra tra le più importanti malattie fungine a livello mondiale (Holb et al., 2013). Questi patogeni fungini sono particolarmente aggressivi nei confronti delle produzioni frutticole di specie appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae* e spesso causano importanti perdite produttive, nelle fasi di preraccolta ma soprattutto durante la conservazione in postraccolta, che possono raggiungere vette pari al 60%, e che si traducono in danni economici tutt'altro che marginali (Di Francesco e Mari, 2018).

1.2 LE SPECIE AGENTI CAUSALI DI MONILIOSI

Il genere *Monilinia* è estremamente eterogeneo e al suo interno è possibile distinguere due sezioni: le *Junctoriae* e le *Disjunctoriae*, sulla base di differenze morfo-fisiologiche quali ad esempio la morfologia dei conidi, oppure il ciclo vitale (Batra, 1991). A livello europeo maggiore attenzione è rivolta verso la macrocategoria delle *Junctoriae*, in particolare a quattro specie: *Monilinia fruticola*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena*, e *Monilinia polystroma*.

M. fruticola è considerato il patogeno più distruttivo rispetto ad altre specie del genere *Monilinia* (De Miccolis Angelini et al., 2019) poiché causa gravi danni, sia in preraccolta sia in postraccolta, su piante appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae* (Ogawa e English, 1991; Hong et al., 1997), con una maggiore incidenza sulle specie della sottofamiglia *Prunoideae* rispetto a quella delle *Pomoideae* (Holb, 2008), colpendo tendenzialmente pesche e nettarine (Wilson

e Ogawa, 1979). Detto ciò, la propagazione di questo agente patogeno può avere conseguenze molto gravi, soprattutto in annate caratterizzate da temperature comprese tra i 20-25°C, durante la fase di maturazione dei frutti, ed elevata piovosità nel periodo di raccolta. Allevata *in vitro* su PDA, *M. fructicola* cresce più velocemente rispetto a *M. laxa* ad una temperatura di 22°C. Dopo 7 giorni di incubazione, la colonia presenta un'estensione maggiore di diametro (80-85 mm) rispetto alle altre specie (Poniatowska et al., 2013) (Figura 1). Il margine della colonia è intero e compatto, lo stroma è grigio-marrone chiaro e presenta strati irregolari e sclerozi discoidali (Abate et al., 2018). Questo patogeno produce conidi a temperature comprese tra 15°C e 20°C (Rungjindamai et al., 2014; Obi et al., 2018) con dimensioni di 12,5-14,5 × 8-10 µm e con un solo tubetto germinativo per ciascun conidio.

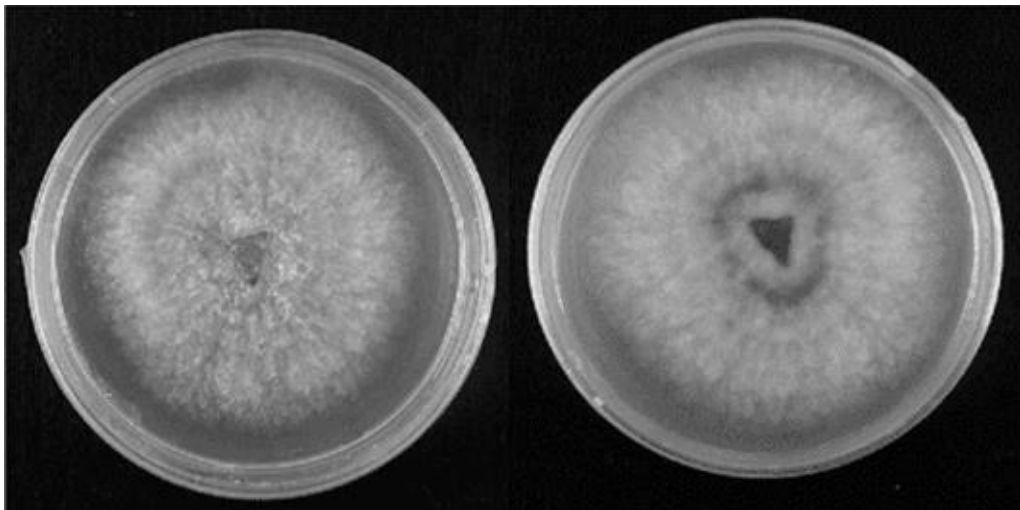


Figura 1 – Colonia di *Monilinia fructicola* su piastra Petri contenente un substrato a base di PDA. Sinistra fronte, destra retro (Ondejkova et al., 2010).

M. fructigena colpisce invece principalmente le pomacee (Di Francesco et al., 2018). Provoca il marciume dei frutti, prima o durante la conservazione, mentre risultano più rare infezioni di fiori, ramoscelli e rami (Martini e Mari, 2014).

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

M. laxa allevata *in vitro* su PDA mostra, a 22°C, un tasso di crescita inferiore rispetto agli isolati della specie *M. fructicola*. Le colonie sono marcatamente lobate e hanno una sporulazione scarsa. Nei primi giorni di incubazione, le colonie sono di colore bianco-rosato; dopo circa una settimana cambiano colore e dopo 10 giorni diventano grigio-olivastro (Poniatowska et al., 2013) (Figura 3). Lo stroma può essere grigiastro o marroncino. I conidi sono simili a quelli di *M. fructicola*, il tubetto germinativo è corto e ruotato. La dimensione dei conidi è di $11,5-17 \times 8-11 \mu\text{m}$, i tubi germinali sono corti e le ramificazioni sono vicino ai margini (Martini et al., 2014; Rungjindamai et al., 2014). Lo sviluppo di *M. laxa* può verificarsi a 10°C, ciò la rende capace di sopravvivere anche in climi più rigidi e caratterizzati da basse temperature rispetto alle altre specie (Obi et al., 2018).



Figura 3 - Colonia di *Monilinia laxa* su piastra Petri contenente un substrato a base di PDA (Di Francesco e Mari, 2018).

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

organi floreali, seguita dall'avvizzimento dei tessuti interessati sempre più marcato e diffuso al passare del tempo. Questo porta ad una riduzione dell'allegagione ma non solo in quanto i fiori infetti, che a questo punto saranno ormai disseccati, rimangono attaccati al ramoscello e costituiscono una ulteriore fonte di inoculo per le piante vicine, considerando che al loro interno il fungo continua la produzione di conidiofori e conidi (Di Francesco et al., 2018), (Figura 5).



Figura 5 – Avvizzimento florale causato da *Monilinia* spp. con sporulazione visibile tra i petali e lo stelo (Pscheidt, 2020).

Successivamente all'avvizzimento dei fiori segue un'ulteriore propagazione della malattia che va ad interessare anche il ramoscello a cui il fiore è collegato, determinando anche qui la comparsa di macchie marroni di dimensioni variabili, oltre alla produzione di essudati gommosi (Figura 6).



Figura 6 – Cancro rameale con emissione di essudati gommosi in risposta ad un'infezione da *Monilinia* spp. su ramo di pesco (Lalancette, 2015).

A questo punto l'infezione può propagarsi alle foglie, anche se questa casistica risulta essere tendenzialmente meno consueta, determinando inizialmente una variazione cromatica della porzione malata verso il marrone scuro, seguita da un disseccamento della stessa, ma che nei casi più gravi può portare alla morte della foglia (Figura 7). Le infezioni fogliari vengono causate più frequentemente dalla specie *M. laxa*, mentre è stato osservato che le altre specie del genere *Monilinia* tendono a non dare questo tipo di sintomatologia (Hrustic et al., 2012).



Figura 7 – Infezione fogliare causata da *Monilinia* spp. con emissione di muffa su susino.

Per quanto riguarda il frutto l'infezione può verificarsi durante l'allegagione, nei casi in cui i fiori siano già infetti, oppure per penetrazione delle spore nel frutto attraverso aperture naturali, come gli stomi, in alternativa tramite ferite e lesioni del frutto (Emery et al., 2000). A questo punto è possibile che la malattia non mostri immediatamente sintomi e che rimanga in uno stato di latenza; infatti, se l'infezione avviene quando il frutto è ancora immaturo, il patogeno trova condizioni sfavorevoli per il suo sviluppo. Ciò è dovuto anche ai meccanismi difensivi della pianta stessa che, nella fase precedente alla maturazione, risultano essere particolarmente efficaci (Obi et al., 2018).

Durante la fase di maturazione i frutti tendono a diventare più suscettibili a causa dell'aumento del contenuto zuccherino e dell'indebolimento dei meccanismi di difesa, determinando il sopraggiungere dei primi sintomi, e cioè l'iniziale comparsa di macchie circolari marroni di dimensioni crescenti al passare del tempo (Liberato e Miles, 2006). La malattia si aggrava in ambienti caratterizzati da alte temperature ed umidità relativa, portando nei casi più gravi all'allargamento della zona malata su gran parte della superficie del frutto nel giro di pochi giorni, a cui fa seguito la comparsa di masse micellari bruno grigiastre contenenti spore altamente infettive (Figura 8). A questo punto il frutto va incontro ad una forte disidratazione ed assume una consistenza legnosa, diventando ciò che in gergo viene definita "mummia" (Figura 9).



Figura 8 – Infezione con emissione di muffa da parte di *Monilinia* spp. su nettarina.

Questa, insieme ai cancri rameali, sarà l'area di svernamento del fungo, nonché la fonte di inoculo principale per l'infezione nella primavera successiva.



Figura 9 – Mummie derivate da frutti di pesco a seguito di un'infezione da parte di *Monilinia* spp.

1.4 I MEZZI DI CONTROLLO FISICI IN POSTRACCOLTA

Nell'ultimo secolo l'agricoltura ha subito profondi cambiamenti per adeguarsi alla rapida evoluzione tecnologica, economica e del mercato, oltre ad adattarsi alle mutate esigenze del consumatore, cercando di mantenere comunque un approccio sostenibile anche dal punto di vista ambientale. A questi cambiamenti è associato anche l'inevitabile sviluppo tecnologico nei settori del trasporto e soprattutto della conservazione, spinto da una domanda in crescita da parte di consumatori sempre più esigenti e attenti, che richiedono varietà, qualità, disponibilità e freschezza dei prodotti durante tutto l'anno (Prusky, 2011). In questo contesto risulta particolarmente complessa la conservazione della frutta, data la sua ricchezza in acqua ed elementi nutritivi, e che perciò costituisce il substrato ideale per lo sviluppo e la propagazione di patogeni che, in molti casi,

determinano cali qualitativi tali da causare la completa estradizione del prodotto dal mercato, portando così a carenze produttive ed elevati danni economici per le aziende (Romanazzi et al., 2016). È infatti stimato che mediamente il 30-40% dei prodotti ortofrutticoli mondiali raccolti venga perso o scartato (Salami et al., 2010). Chiaramente questo dato non è omogeneo, infatti è stato stimato che queste perdite risultano maggiori nei paesi in via di sviluppo, dove possono toccare valori superiori al 50%, mentre sono minori nei paesi più sviluppati, dotati di tecnologie più avanzate, dove si stabilizzano su valori compresi tra il 5% e il 35% (Hailu e Derbew, 2015). In ogni caso le maggiori perdite si hanno durante la vendita al dettaglio o appena prima del consumo (Hailu e Derbew, 2015). Per limitare questi danni, soprattutto nell'ambito della difesa dei prodotti ortofrutticoli da fitopatie, sono sempre stati di importanza primaria, nelle strategie di conservazione e non solo, prodotti chimici naturali e di sintesi (Kim et al., 2019; Zuccolo et al., 2019). Come detto inizialmente però, una sempre maggiore presa di coscienza nei confronti dell'ambiente sta spingendo il progresso verso la sperimentazione di vie più ecosostenibili, preferibili alle strategie più impattanti, che spesso ricorrono all'impiego di formulati chimici di sintesi. Ciò comunque non deve portare necessariamente all'eliminazione completa di questo tipo di input, che anzi va utilizzato insieme ad altri di diversa natura in maniera complementare, in modo tale da generare e sfruttare gli effetti sinergici ed utilizzare ogni mezzo di difesa in maniera ottimale, nell'ottica di un approccio integrato ideale (Casals et al., 2012; Sisquella et al., 2013; Romanazzi e Feliziani, 2014; Romanazzi et al., 2016).

Nell'ambito della conservazione, ma non solo, spiccano strategie che si avvalgono dell'uso di mezzi di tipo fisico. Questi vanno a regolare la presenza o

ad eliminare gli agenti patogeni attraverso l'impiego di energia oppure modificando le condizioni ambientali. Una possibile applicazione in campo dei mezzi fisici consiste ad esempio nello sfruttamento delle alte temperature per l'eliminazione dei patogeni o delle infestanti come avviene con il pirodiserbo o con la solarizzazione, mentre è risaputo che nel postraccolta si hanno effetti positivi sfruttando le basse temperature come nella frigoconservazione, spesso associata ad atmosfera controllata. Inoltre, vi sono mezzi fisici ancora in fase di sperimentazione come ad esempio l'impiego di radiazioni, trattamenti ipobarici ed iperbarici e l'impiego dell'ozono (Martini e Mari, 2014), quest'ultimo di particolare interesse per questo specifico studio.

1.5 OZONO

Tra i metodi più innovativi per la conservazione di prodotti freschi in postraccolta è sicuramente opportuno considerare l'ozono (Palou et al., 2002). È infatti risaputo come l'applicazione di ozono abbia un'azione positiva nella riduzione della contaminazione microbica, inoltre il suo impiego viene generalmente considerato più sicuro sugli alimenti poiché, a differenza di altri prodotti per la sanificazione, non lascia residui chimici sulla superficie dei prodotti (Glowacz et al., 2015; Glowacz e Rees, 2016). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato come il potenziale disinfettante dell'ozono sia circa 1,5 volte maggiore rispetto a quello del cloro (Suslow, 2004; Kim et al., 2013) L'ozono è una molecola polare costituita da tre atomi di ossigeno (O_3) e dalla simmetria simile alla molecola dell'acqua. Può essere rappresentato come un ibrido di risonanza con due strutture limite caratterizzate da un legame singolo da un lato e uno doppio dall'altro (Figura 10).

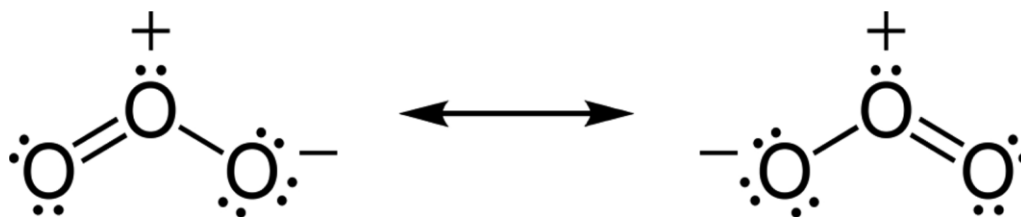


Figura 10 – La struttura di risonanza dell’ozono (O_3) (Suslow, 2004).

A temperatura ambiente l’ozono è un gas di colore bluastro e dall’odore pungente, presente a concentrazione variabile nei diversi strati dell’atmosfera. A livello del suolo la concentrazione dell’ozono si aggira intorno a 0,02 ppm mentre raggiunge valori anche 10 volte superiori nell’ozonofera, strato dell’atmosfera situato a circa 15-35 km di altitudine, corrispondente con la parte basale della stratosfera.

Viste le sue caratteristiche chimiche la molecola di ozono risulta essere tossica per gli esseri viventi, molto instabile, reattiva e dall’elevata natura ossidante, rendendo così preferibile la produzione del gas al momento dell’utilizzo piuttosto che l’immagazzinamento e la conservazione, vista anche la sua infiammabilità ed esplosività. Proprio questo potere ossidante, generato dalla tendenza della molecola a ritornare ad uno stato diatomico più stabile tramite il rilascio di un singolo atomo di ossigeno, rende l’ozono molto interessante per molte industrie come prodotto sanificante e disinfettante (Prabha et al., 2015).

In natura l’ozono si forma nella stratosfera grazie all’assorbimento di alcune radiazioni ultraviolette emesse dal Sole, e nel suo processo di formazione svolge una indispensabile azione protettiva in quanto queste hanno effetti nocivi sugli esseri viventi. Inoltre, può formarsi anche nella troposfera durante i temporali grazie alle scariche elettriche e ai fulmini.

A livello industriale, dove è spesso necessaria la produzione di quantità più elevate e a concentrazioni maggiori di ozono, si procede con dei macchinari specifici chiamati ozonizzatori, che permettono la produzione di questo a partire dall'ossigeno atmosferico o dall'ossigeno puro tramite scariche elettriche generate da elettrodi tra cui viene mantenuta un'elevata differenza di potenziale. Da un punto di vista pratico l'ozono può essere usato in due forme diverse sulla base della tipologia di trattamento in postraccolta che si vuole eseguire, e cioè ozono in soluzione acquosa per trattamenti precedenti alla conservazione e ozono in forma gassosa fornito a specifiche concentrazioni in maniera intermittente o continuativa nella fase di frigo-conservazione (Palou et al., 2003). Entrambe le forme sono efficaci nel postraccolta, ma allo stesso tempo la loro azione risulta fortemente dipendente da numerosi fattori, primi tra tutti il tipo di prodotto trattato, il suo stadio di sviluppo, la temperatura e l'umidità relativa. Comunque, tra le due forme quella gassosa risulta la più efficace nel postraccolta (Suslow, 1998). Ciò è dovuto alla maggior purezza dell'ozono gassoso rispetto a quello in soluzione, che determina maggiore reattività e durata dell'efficacia, inoltre l'azione dell'ozono in soluzione è fortemente dipendente anche dalle caratteristiche dell'acqua utilizzata come ad esempio la purezza, la temperatura e il pH, oltre che anche dall'umidità relativa atmosferica durante la conservazione (Kim et al., 1980). D'altra parte, l'efficacia dell'ozono gassoso è influenzata solo dalla quantità di ozono generata nella cella di conservazione e dalla velocità di riduzione ad ossigeno.

Alcuni studi riportano che l'ozono gassoso è più efficace di quello in soluzione acquosa nel ridurre l'incidenza di patogeni fungini e muffe. Questo implica che l'ozono gassoso è caratterizzato da maggiore attività antifungina

rispetto a quello in soluzione acquosa (Zorlugenc et al., 2008; Najafi e Khodaparast, 2009). Comunque, in generale l'ozono può essere considerato un inibitore della crescita fungina, poiché previene la germinazione e la sporulazione di varie specie di funghi (Whangchai et al., 2006).

L'esposizione all'ozono gassoso determina una maggior biosintesi di antiossidanti nei frutti ed un rallentamento dei processi metabolici associati a riduzioni qualitative (Zhao et al., 2013). Diversi studi riportano l'efficacia dell'ozono nel mantenimento qualitativo e allungamento della shelf life di frutta e verdura. Ad esempio, frigoconservazione a 2°C e atmosfera con ozono (0,35 mg/L) su fragola (*Fragaria ananassa* Duch. cv. Camarosa) ha portato all'ottenimento di questi benefici (Pérez et al., 1999). Lo stesso vale per pere esposte a ozono gassoso (100 mg/L) per 60 min seguito da stoccaggio a 25°C (Alencar et al., 2014).

1.5.1 Meccanismi biochimici di trattamenti in postraccolta

Oltre ad un'azione biocida nei confronti di microrganismi patogeni, l'ozono permette il prolungamento del mantenimento delle caratteristiche qualitative di frutta e verdura grazie alla sua capacità di inibire la sintesi dell'etilene, uno dei principali processi metabolici che possono avvenire nel postraccolta e che causano peggioramenti qualitativi (Huyskens-Keil et al., 2012). Infatti, l'ozono blocca la biosintesi dell'etilene prevenendo l'accumulo di ACC (Acido 1-amminociclopropano-1-carbossilico), immediato precursore dell'etilene, attraverso l'inibizione dell'enzima che lo sintetizza, e cioè l'ACC-sintetasi (Minas et al., 2014). Questo è un processo fondamentale nella biosintesi dell'etilene ed è stato dimostrato che la concentrazione di ACC è direttamente

proporzionale alla produzione di questo (Wang et al., 2002). Ciò è stato dimostrato ad esempio da alcuni studi svolti su kiwi (*Actinidia deliciosa*, cv. Hayward) (Minas et al., 2014).

L'ozono inibisce anche l'azione dell'ACC-ossidasi, l'enzima che catalizza l'ossidazione dell'ACC per formare l'etilene, altro passaggio chiave nella sintesi dell'alchene, causando una riduzione della produzione di questo, oltre che della respirazione e del rammollimento dei tessuti nel frutto (Toti et al., 2018). Questo è stato osservato su melone cv. Caldeo (Yin et al., 2013).

L'elevata reattività dell'ozono lo rende capace anche di reagire direttamente con l'etilene, producendo diossido di carbonio (CO₂) e acqua (H₂O), rimuovendolo così dall'atmosfera (Skog e Chu, 2001; Smilanick, 2003; Yin et al., 2013).

È stato osservato che trattamenti con ozono riducono significativamente il rammollimento del frutto, anche se ancora non è chiara la correlazione tra i cambiamenti della parete cellulare e questo fenomeno (Rodoni et al., 2009), nonostante sia chiaro che questo sia fortemente dipendente dall'azione di enzimi che degradano le pareti delle cellule vegetali (Toti et al., 2018). In ogni caso alcuni studi hanno dimostrato che esposizioni di frutta ad ozono portano ad una riduzione dell'attività di alcuni di questi enzimi (Toti et al., 2018). Si ipotizza che questa inibizione avvenga indirettamente, infatti il rammollimento dei tessuti è un fenomeno legato alla maturazione, che a sua volta dipende dalla quantità sintetizzata e dalla concentrazione atmosferica dell'etilene, su cui, come abbiamo visto precedentemente, agisce direttamente l'ozono.

Si è visto che trattamenti con ozono su frutta e verdura fresche portano a situazioni di stress ossidativo, determinando una maggior sintesi di antiossidanti

come risposta autodifensiva (Mahajan et al., 2014). Studi dimostrano che trattamenti con ozono vanno ad influenzare sistemi difensivi nel frutto legati alla via dell'acido scichimico, portando ad una maggior produzione di antiossidanti (Lindroth, 2010). Ancora, esposizioni di frutta ad alte concentrazioni di ozono possono promuovere la biosintesi di antiossidanti come composti fenolici e flavonoidi in risposta allo stress ossidativo (Zhao et al., 2013).

2 OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il marciume bruno rappresenta una tra le malattie più impattanti e dannose che colpisce drupacee e pomacee, sia in pre sia in postraccolta determinando importanti perdite produttive e danni economici tutt'altro che indifferenti alle aziende agricole. Per contrastare quest'avversità in passato ci si è affidati principalmente ad una difesa di tipo chimico ma, nel contesto moderno di agricoltura integrata, questa tipologia di approccio va sostituita studiando e vagliando strategie di lotta in campo più sostenibili dal punto di vista ambientale ma comunque economicamente praticabili. Per raggiungere questo obiettivo determinante è acquisire informazioni in merito alla diffusione degli agenti causali in campo che consentano di pianificare strategie utili a preservare il raccolto. D'altro canto, è compito della ricerca scientifica trovare soluzioni eco-compatibili capaci di prolungare la conservazione in postraccolta, per supportare le aziende sottoposte ad una domanda sempre più esigente da parte di consumatori più consci e sensibili riguardo le problematiche ambientali. Va inoltre considerato che le caratteristiche organolettiche di un prodotto non derivano unicamente dalle strategie agronomiche utilizzate per la sua produzione, ma in larga parte anche dalle modalità di conservazione impiegate. Numerosi studi sono stati condotti con successo per identificare sistemi alternativi all'uso dei classici fungicidi con la finalità di ottenere un protocollo adatto al contenimento delle malattie e limitare contemporaneamente l'eccessivo impatto ambientale e il rischio chimico annesso alla salute umana. In questo contesto l'ozono negli ultimi anni si è dimostrato particolarmente efficace nel contenimento di contaminazioni microbiologiche agendo come molecola sanificatrice, in quanto forma dell'ossigeno altamente reattiva. Non va

dimenticato inoltre che tutto ciò non comporta la produzione di residui, rendendo particolarmente interessante il suo utilizzo nell'ambito agroalimentare. In questo contesto si inserisce questo lavoro di tesi, che ha come obiettivo quello di valutare l'efficacia dell'utilizzo di strategie e tecnologie innovative nel contrastare la propagazione della malattia sia in pre sia in postraccolta. Più nello specifico, è possibile dividere le attività svolte in due sperimentazioni: una parte del lavoro è stata dedicata all'approfondimento dell'epidemiologia della malattia nelle fasi precedenti alla raccolta, attraverso l'analisi molecolare di spore aerodiffuse del patogeno, raccolte tramite l'impiego di captaspore, per valutare con precisione durante l'anno quando il patogeno è presente e così agire con interventi preventivi più mirati ed ecosostenibili. Una seconda sperimentazione si è concentrata sullo studio di sistemi capaci di ridurre le perdite produttive in postraccolta attraverso l'utilizzo dell'ozono, molecola disinfettante e sanificante caratterizzata dallo svolgimento della sua attività senza il rilascio di alcun sottoprodotto, per il prolungamento della shelf life della frutta. Lo studio è stato svolto in aziende marchigiane 'Acciari Società Agricola S.R.L.'(FM), e 'Mazzoni S.R.L' (AP), partners nel progetto PSR "Prevenzione delle malattie postraccolta delle drupacee per la riduzione degli sprechi di ortofrutticoli freschi - ZeroSprechi" (www.zerosprechi.info), promosso dalla Regione Marche, 'Misura 16.1 sull'Innovazione'.

3 MATERIALI E METODI

3.1 PROVA SPERIMENTALE 1: VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DI PATOGENI FUNGINI IN POSTRACCOLTA E DELL'EFFICACIA DELL'OZONO SUL CONTENIMENTO DELLA MONILIOSI

3.1.1 Materiale vegetale

Le pesche prelevate ed utilizzate nella prova appartengono alla cultivar Extreme 486, una varietà a polpa gialla dal gusto sub-acido, caratterizzata da una maturazione molto tardiva, una fioritura medio-tardiva e un elevato vigore e simmetria del frutto. Questo è di grosso calibro, con buccia vellutata e molto scura su quasi la totalità della superficie esterna.

Le pesche sono state fornite da un frutteto della Società Agricola Acciari S.R.L., situata ad Ortezzano in provincia di Fermo (43°01'18.45"N; 13°36'36.16"E) (Figura 11). La raccolta è stata effettuata alla maturazione commerciale dei frutti, cioè lo stadio adatto al conferimento alla GDO (grande distribuzione organizzata).



Figura 11 - Pescheto dell'azienda 'Acciari' (FM).

3.1.2 Trattamenti preraccolta

Per effettuare i trattamenti in preraccolta sono stati utilizzati due diversi atomizzatori: un atomizzatore tradizionale normalmente utilizzato dall'azienda ed un atomizzatore innovativo modello 2000 EOLO GTE10 della TEYME (Figura 12).



Figura 12 – Atomizzatore innovativo TEYME 2000 Eolo GTE10

Questo macchinario può essere utilizzato per trattare piante di agrumi, olivi, mandorle e altre piante da frutto; è dotato di un'elica a bassi consumi grazie alle dieci lame dal profilo a falce e passo variabile con 8 punti di regolazione; un canale TURBO ausiliario nella parte inferiore che permette di impiegare senza ulteriori consumi il 16,5% in più di aria altrimenti sprecata in modelli meno recenti, andando così a ridurre la deriva del prodotto; la sede della ventola, di acciaio inox delle dimensioni di 1015mm × 500mm, dotata di quattro canali per

meglio convogliare l'aria in entrata, permette un aumento del 17% di quella emessa; il riduttore a due velocità con punto neutro, capace di trasferire grandi potenze e la frizione ZAMAK con partenza progressiva. Inoltre, questo atomizzatore è caratterizzato da un telaio rinforzato, per sopportare le vibrazioni; un mescolatore a tre livelli per mix più omogenei ad alte, medie e basse pressioni; 44 spruzzatori anti-gocciolamento; tanica in polietilene fino a 4000 L con tanica ausiliaria (10% principale) e tanica dell'acqua da 18 L; 3 livelli di filtraggio rispettivamente alla bocca della tanica, alla pompa di suzione e una centrale di filtraggio a pressione.

Tornando ai trattamenti prima della raccolta sono stati selezionati tre filari del frutteto, che sono stati suddivisi in tre parti da 100- 150 m l'una per rispecchiare le tre tesi:

- La prima parte del filare non ha subito trattamenti in preraccolta ed è stata separata dalla seguente attraverso l'apposizione di un nastro bianco;
- La seconda parte del filare, compresa tra il nastro bianco nella parte basale e da un nastro rosso nella parte liminare, è stata trattata con una miscela di Signum (Boscalid + Piraclostrobin), ad una concentrazione di 0,75 l/ha, e Decis Evo (Deltametrina), ad una concentrazione pari a 0,5 l/ha, utilizzando l'atomizzatore innovativo precedentemente descritto;
- La terza parte del filare, compresa tra il nastro rosso alla parte basale e uno verde alla parte liminare, è stata trattata con la stessa miscela della porzione precedente, utilizzando l'atomizzatore tradizionale di proprietà dell'azienda stessa.

3.1.3 Trattamenti postraccolta

La raccolta è avvenuta in data 23/09/2021, tre giorni dopo il trattamento, rispettando quindi i tempi di carenza dei prodotti utilizzati. Questa si è svolta prelevando 3675 campioni totali, suddivisi in 105 cassette, dotate di alveoli in materiale plastico caratterizzati da una capienza di 35 pesche cadauno. Delle 105 cassette, 21 sono state riportate subito in università mentre le restanti 84 sono state lasciate in azienda per un prelievo successivo. Delle 21 cassette iniziali, 15 sono state destinate al monitoraggio, in modo tale da avere 5 cassette per le tre tesi, rispettivamente:

- NT, il campione non trattato, costituito da pesche prelevate dalla prima porzione dei filari e perciò non sottoposte al trattamento fungicida in preraccolta;
- AI, il campione trattato con l'atomizzatore innovativo, costituito dalle pesche prelevate nella seconda porzione dei filari;
- AT, il campione trattato con l'atomizzatore tradizionale, costituito dalle pesche prelevate nella terza porzione dei filari.

Su queste è stata valutata l'incidenza dei principali patogeni in postraccolta, con particolare attenzione rivolta ai funghi appartenenti al genere *Monilinia*, attraverso il monitoraggio eseguito a cadenza giornaliera per 10 giorni sui frutti. Le pesche sono state poste in cassette coperte con sacchetti di plastica nera ed incubate a temperatura ambiente allo scopo di far sviluppare i patogeni fungini presenti e allo stesso tempo evitare la contaminazione reciproca delle cassette (Figura 13).



Figura 13 – Cassette da 35 pesche ricoperte da film plastico di colore nero

Il monitoraggio per questa prima prova è stato eseguito dal 27/09/2021 al 14/10/2021 a cadenza giornaliera, per un totale di 10 rilievi complessivi.

Le restanti 84 cassette sono state utilizzate per simulare la shelf life e valutare l'efficacia dell'ozono nella conservazione in postraccolta dei frutti. Perciò 42 delle cassette sono state poste in celle tradizionali e quindi semplicemente frigoconservate a 4°C. Le restanti 42 cassette invece, oltre alla conservazione a 4°C, sono state sottoposte ad ozonoterapia, grazie alla presenza di un ozonizzatore che ha mantenuto nella cella livelli di ozono giornalieri pari a 50 ppb e notturni di 200 ppb. Per questa prova sono state prelevate 21 cassette per cella a 10 e a 20 giorni dalla raccolta, mantenendo le tesi della prova precedente con l'aggiunta di un'ulteriore variabile, identificata da una T finale, per simboleggiare le cassette sottoposte a frigoconservazione tradizionale, oppure da una O, per indicare le cassette sottoposte a Frigoconservazione in atmosfera controllata con ozono, arrivando così ad un totale di 6 tesi complessive. Anche

in questo caso delle 21 cassette prelevate (per cella), 15 sono state sottoposte a monitoraggio giornaliero, considerando che il prelievo è stato effettuato in cella tradizionale e in cella con ozono, ciò ha portato ad avere complessivamente 30 cassette per prova con 5 cassette per tesi (raddoppiate da 3 a 6 per l'aggiunta della variabile frigoconservazione, frigoconservazione+ozono). Il monitoraggio della prova a 10 giorni ha coperto il periodo dal 5/10/2021 al 20/10/2021, per un totale di 10 monitoraggi complessivi. La prova a 20 giorni invece è stata posta sotto osservazione dal 20/10/2021 al 29/10/2021, per un totale di 10 monitoraggi complessivi (Figura 14).

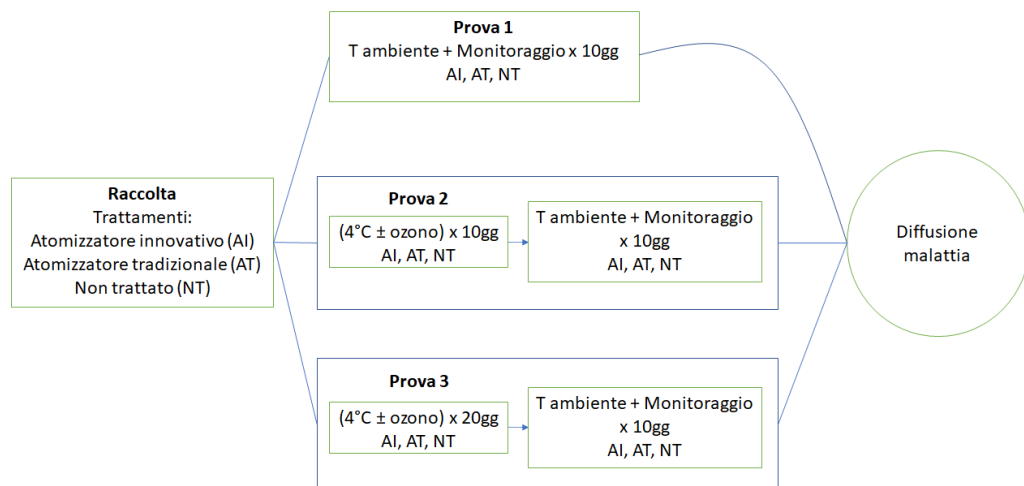


Figura 14 – Workflow della prova sperimentale 1

3.1.4 Valutazione delle infezioni latenti

Per tutti i rilievi è stata calcolata la diffusione (D) per ciascuna tesi presa in analisi, espressa come valore percentuale del rapporto tra i frutti infetti individuati e quelli totali, con la formula:

$$D = n \cdot 100 / N$$

n: numero di frutti infetti

N: numero di frutti esaminati.

I dati così raccolti sono stati elaborati statisticamente calcolando le medie e la deviazione standard per ciascuna tesi considerata e per ciascun rilievo svolto. La significatività è stata valutata con il test di Tukey secondo il livello di probabilità $P < 0,05$.

3.2 PROVA SPERIMENTALE 2: IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI SPORE AERODIFFUSE DI *MONILINIA* SPP. IN PESCHETO

3.2.1 Raccolta campioni

A partire dal 18/03/2021 al 28/10/2021 è stata fatta un'indagine in merito alle spore, conidi, di *Monilinia* spp. aereo-diffuse analizzando un pescheto collocato presso l'Azienda Agricola Mazzoni Stefano, con sede a Montedinove in provincia di Ascoli Piceno (42°59'14.3"N; 13°33'24.3"E). Nel dettaglio un captaspore volumetrico, Modello VPPS200, è stato collocato al vertice del pescheto. Ogni settimana a partire dal 18/03/2021, dal captaspore volumetrico veniva prelevato il nastro (2×30 cm circa) nelle ore centrali della mattinata (h 10.00-12.00) e posto in una scatola in materiale plastico. L'indagine è stata protratta fino 28/10/2021, data dell'ultimo prelievo, per un totale di 32 settimane. I nastri sono stati conservati a 4°C fino al processamento dei campioni.

3.2.2 Raccolta campioni

Ogni membrana è stata ridotta in strisce di piccole dimensioni ed inserite all'interno di provette da 15 ml insieme a 3 ml di una soluzione di acqua milliQ e Tween 20, allo 0,1%, un tensioattivo utile a separare le spore dalla membrana. Le provette sono state agitate per 2-3 minuti con il vortex, quindi sottoposte all'azione degli ultrasuoni mediante il sonicatore, modello ELMA Transsonic 460 per 20 minuti (Pilo et al., 2022). Allo scopo di concentrare gli estratti, è stata prelevata la soluzione da ogni tubo e posta in 3 provette eppendorf da 1,5 ml. Ad ogni provetta è stato aggiunto 2-propanolo (Sigma-Aldrich) al 0,8%. Dopo aver mescolato la soluzione per 5 minuti a temperatura ambiente, è stato effettuato un passaggio in centrifuga per 20 minuti a 12.000g per far precipitare il DNA. Il

pellet ottenuto è stato lavato aggiungendo 300 ml di etanolo al 70% e di seguito è stato risospeso in 20 µl di H₂O distillata. L'integrità e la qualità del DNA è stata verificata sulla base di un rapporto di assorbanza da 1,80 a 1,90 a 260/280 nm e da 1,8 a 2,0 a 230/260 nm, utilizzando BioPhotometer plus (Eppendorf Inc., Westbury, NY, USA).

3.2.3 Analisi molecolare degli estratti

3.2.3.1 Validazione del DNA estratto

Con lo scopo di valutare la qualità degli estratti, è stata effettuata un'indagine preliminare sui campioni utilizzando primers universali per i funghi ascomiceti.

La PCR prevede l'amplificazione della regione ITS dell'r(ribosomale)DNA che comprende i geni spaziatori non codificanti ITS1 5', e ITS2 ed il gene 5,8S, mediante l'utilizzo del *forward primer* ITS1 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3' ed il *reverse primer* ITS4 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3' (White et al., 1990). Per ogni campione il mix di reazione è stato preparato in 20 µl contenenti 10 µl di master mix EmeraldAmp PCR Master MIX (Takara) 2 ×, 1 µl di ciascun primer alla concentrazione di 10 mM e 5 µl di DNA estratto. La reazione d'amplificazione è stata eseguita con un termociclatore ICycler (Bio-rad), impostando un ciclo termico che includeva 1 ciclo iniziale di denaturazione a 95°C per 3 min, seguito da 40 cicli costituiti da 3 step:

- 30 sec a 95°C,
- 1 min a 55°C e
- 1 min a 72°C.

In fine il ciclo termico si è concluso con un'estensione finale di 72°C per 1 min.

I campioni, una volta amplificati, sono stati caricati su un gel di agarosio all'1%. Il gel è stato preparato sciogliendo agarosio all'interno di 100 ml di soluzione tampone (TrisHCl-Acido acetico glaciale-EDTA) (TAE 1%) ed aggiungendo 5 µl di intercalante degli acidi nucleici (Gelred, Biotinum). Per ogni campione sono stati caricati 10 µl insieme ad un DNA Ladder (100 pb) che identifica 13 bande di dimensioni da 100 a 2000 pb. La corsa è avvenuta ad una velocità di 100 V. Infine, abbiamo utilizzato il transilluminatore Gel Doc 1000 per visualizzare le diverse posizioni delle bande presenti sul gel dovute al diverso peso molecolare dei vari amplificati.

3.2.3.2 Analisi PCR mediante primers specifici a *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*

L'indagine è stata condotta utilizzando coppie di primers specifiche per le specie di *M. fructigena*, *M. fructicola* e *M. laxa* di seguito descritti:

- MO368-5, il primer reverse generico per il riconoscimento di *M. fructigena*, *M. fructicola* e *M. laxa*. Questo è costituito da 20 nucleotidi in sequenza 5'GCAAGGTGTCAAACCTT CCA-3'.
- MO368-8R, il primer forward specifico per *M. fructigena*, costituito da 20 nucleotidi in sequenza 5'-AGATCAAACATCGTCCATCT-3'. Questo porta alla costituzione di un amplicone di lunghezza pari a 402 pb;
- MO368-10R, il primer forward specifico per *M. fructicola*, costituito da 20 nucleotidi in sequenza 5'-AAGATTGTCACCATGGTTGA-3' e che permette l'ottenimento di un amplicone da 535 pb;

- Laxa R-2, il primer forward specifico per *M. laxa*, anch'esso costituito da 20 nucleotidi in sequenza 5'-TGCACATCATATCCCTCGAC-3', che dà come risultato di reazione un amplicone da 351 pb.

L'analisi è stata condotta utilizzando il metodo PCR Multiplex proposto per la PCR convenzionale, e con lo scopo di incrementare la possibilità di rilevare la presenza delle spore di *Monilinia*, sono stati messi a punto dei protocolli utili all'utilizzo delle tecnologie PCR Real Time (qPCR) e digital droplet PCR (ddPCR).

3.2.3.2.1 PCR convenzionale in Multiplex

L'indagine è stata effettuata secondo il protocollo sviluppato da Cotê et al. (2004). Per ogni campione il mix di reazione è stato preparato in 20 µl contenenti 10 µl di master mix EmeraldAmp PCR Master MIX (Takara) 2 ×, 0,8 µl di ciascun primer alla concentrazione di 10 mM e 5 µl di DNA estratto. La reazione d'amplificazione è stata eseguita con un termociclatore ICycler (Bio-rad), impostando un ciclo termico costituito da 1 ciclo iniziale di denaturazione a 95°C per 2 min, seguito da 35 cicli costituiti da 3 step:

- 15 sec a 95°C,
- 15 sec a 60°C
- 1 min a 72°C;

In fine il ciclo termico si è concluso con un'estensione finale di 72°C per 5 min. Nell'analisi sono stati inclusi anche dei campioni positivi in rappresentanza delle tre specie di *Monilinia* testate: isolato 'B3P1' di *M. fructigena*, 'B2P6 BI' di *M. fructicola* e 'B2P2' di *M. laxa*. I campioni, una volta amplificati, sono stati caricati su un gel di agarosio all'1% precedentemente descritto.

3.2.3.2.2 PCR quantitativa Real Time (qPCR)

I primers precedentemente descritti sono stati testati mediante qPCR. A questo scopo sono state costruite 3 curve standard di riferimento ognuna costituita da 3 diluizioni seriali 1:10, da 100 a 1 ng/μl, del DNA estratto dai tre isolati presi come riferimento. Le 3 curve standard insieme ai campioni sono stati analizzati utilizzando il termociclatore CFX Connect Real Time Detection System (Bio-Rad Laboratories). Le reazioni qPCR sono state eseguite in piastre PCR trasparenti a 96 pozzetti (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Per ogni campione il mix di reazione è stato realizzato in un volume di 12 μl, contenente 5,6 μl di DNA, 0,1 μM di ciascun primer e 6 μl di SsoFast (Eva Green Supermix 2× (Bio-Rad Laboratories)). Il ciclo termico utilizzato ha previsto un passaggio di 3 min a 98°C utile all'attivazione dell'enzima seguito da un ciclo ripetuto 40 volte costituito da: 15 sec a 98°C; 15 sec a 72°C; 60 sec a 72°C.

Dopo una prima amplificazione i campioni sono stati sottoposti ad una seconda amplificazione allo scopo di incrementare la probabilità di rilevare la presenza di spore appartenenti a *Monilinia* nelle membrane analizzate. Con questa finalità 1 μl di amplificato è stato utilizzato come template e sottoposto ad una seconda amplificazione in qPCR con i primers specifici per le tre specie di *Monilinia* utilizzando la procedura precedentemente descritta.

Per verificare la specificità degli amplificati, è stata eseguita l'analisi della curva di fusione nell'intervallo da 55 a 98°C con un gradiente di 0,05°C/sec. L'efficienza (E) qPCR di ciascuna coppia di primer è stata determinata secondo le curve standard generate dalle tre tipologie di campione testate.

3.2.3.2.3 Droplet Digital PCR (ddPCR)

Il test ddPCR è stato eseguito utilizzando il sistema QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). L'analisi è stata condotta mediante la tecnologia SYBR green che consente di tracciare le sequenze amplificate mediante l'inclusione della molecola fluorescente Eva Green nella doppia elica del DNA. Per ogni campione il mix di reazione è stato preparato secondo il protocollo in 22 μ l contenenti 11 μ l QX200 2 \times , ddPCR Eva Green Supermix (Bio-rad), 1 μ l di ciascun primer alla concentrazione di 900 nM, 10 μ l di DNA. La Mastermix e il DNA del campione sono stati accuratamente miscelati e poste in una cartuccia DG8 QX100 TM / QX200 (BIO-RAD), necessaria per generare le gocce di emulsione olio/reagente. Con questa finalità nella cartuccia DG8 sono stati trasferiti nell'ordine, 20 μ l del mix di reazione e 70 μ l dell'olio minerale Droplet Generation Oil (Bio-Rad) nelle apposite posizioni; quindi, la cartuccia è stata inserita nel QX200 Droplet Generator TM (Bio-Rad) per consentire la formazione delle goccioline. Dopo la generazione delle goccioline, le miscele dei campioni sono state trasferite con cura su una piastra PCR a 96 pozzetti ddPCR TM (Bio-Tad), dopodiché la piastra è stata sigillata ponendo sulla stessa un foglio di alluminio, a 180°C utilizzando il sigillante per piastre PCR PX1 TM (Bio-Rad). L'amplificazione è stata eseguita nel termociclatore ICycler (Bio-Rad), con una velocità di rampa di 2°C/s con il seguente protocollo: 95°C per 5 min seguiti da 40 cicli di denaturazione a 95°C per 15 sec; 60°C per 15 sec; 72°C per un min. L'enzima è stato disattivato a 4°C per 5 minuti seguito da 90°C per 5 minuti. Terminato il ciclo di amplificazione le goccioline sono state lette in un QX200 Droplet reader TM (Bio-Rad), dopodiché i dati ddPCR sono stati analizzati utilizzando Quantasoft versione

1.6.6. Lo script ha analizzato i dati dei segnali esportati dal software QuantaSoft, con la sua soglia automatica definita o con una soglia selezionata, definita manualmente, applicata. Questo incorpora il calcolo dei parametri di base del ddPCR come la concentrazione, le ampiezze medie delle goccioline positive e negative, le copie medie per partizione e il volume totale delle partizioni misurate (dimensione di reazione effettiva), come definito dalle linee guida MIQE digitale (Huggett et al., 2013).

4 RISULTATI

4.1 PROVA SPERIMENTALE 1: VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DI PATOGENI FUNGINI IN POST RACCOLTA E DELL'EFFICACIA DELL'OZONO SUL CONTENIMENTO DELLA MONILIOSI

4.1.1 Diffusione della moniliosi su pesche in postraccolta senza conservazione

I rilievi hanno evidenziato l'efficacia dei trattamenti effettuati nei confronti del controllo del marciume bruno delle drupacee. Al settimo giorno le tesi trattate con gli atomizzatori AT e AI hanno evidenziato una diffusione della malattia significativamente più bassa rispetto al testimone non trattato NT. In dettaglio, la tesi trattata con AT ha mostrato una diffusione media pari al 3,4% e quella con AI del 0,6%, mentre il testimone non trattato ha mostrato una diffusione del 21,7% (Figura 15).

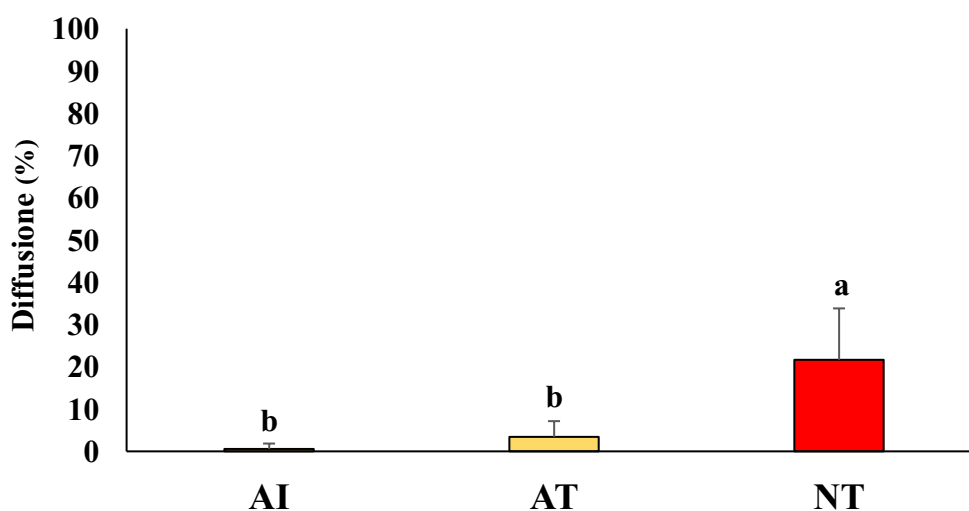


Figura 15 – Diffusione di moniliosi dopo 7 giorni dalla raccolta osservata su pesche, cultivar Extreme 486 raccolte presso l'azienda 'Acciari'. Il grafico rappresenta la media + deviazione standard (SD) di 5 ripetizioni, 35 pesche a ripetizione. Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test di intervallo multipli, Tukey $P \leq 0,05$). AI = atomizzatore innovativo; AT = atomizzatore tradizionale; NT = testimone non trattato.

4.1.2 Diffusione della moniliosi su pesche in postraccolta frigoconservate in atmosfera controllata con ozono per 10 giorni

I rilievi effettuati sulle pesche collocate a temperatura ambiente per 10 giorni successivi al trattamento con ozono, non hanno evidenziato differenze significative tra le varie tesi per quanto riguarda il controllo in postraccolta del marciume bruno delle drupacee (dati non mostrati).

4.1.3 Diffusione della moniliosi su pesche in postraccolta frigoconservate in atmosfera controllata con ozono per 20 giorni

I rilievi effettuati sui campioni collocati a temperatura ambiente per 10 giorni successivi al trattamento per 20 giorni con ozono hanno invece evidenziato differenze tra i trattamenti testati. Al settimo giorno di shelf life infatti tutte le tesi hanno mostrato una diffusione della malattia più bassa rispetto al testimone non trattato. Andando più nello specifico, la tesi NTT ha mostrato una diffusione pari al 37,5%, mentre le altre tesi hanno mostrato una diffusione della malattia inferiore al 14%, con valori più bassi per le tesi AIT, 2,9%, e ATO, 4,6%. I risultati mostrano che, nelle pesche trattate in preraccolta, l'ozono non determina un'ulteriore riduzione della diffusione della malattia nel postraccolta (Figura 16).

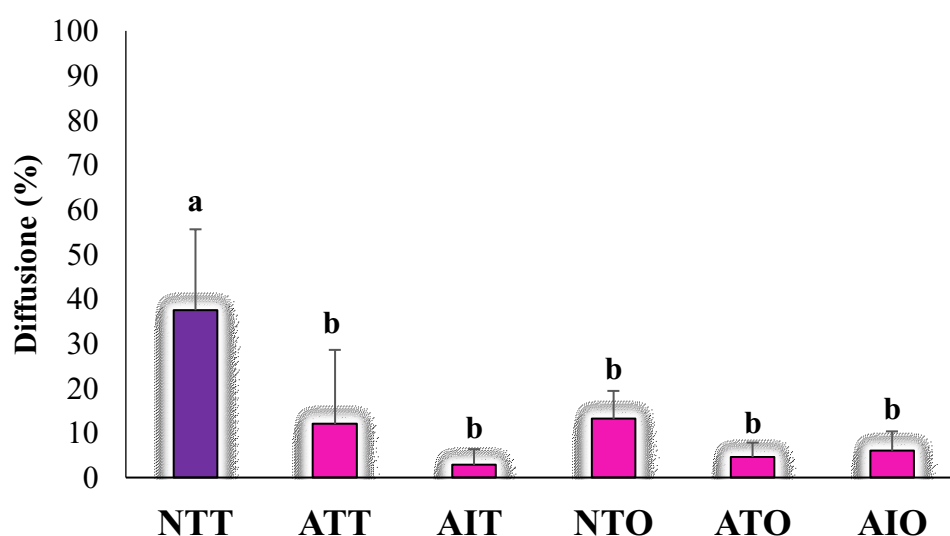


Figura 16 – Diffusione di moniliosi dopo 7 giorni dalla cessazione delle strategie di prolungamento della shelf life, mantenute per 20 giorni postraccolta, osservata su pesche, cultivar Extreme 486, raccolte presso l’azienda ‘Acciari’. Il grafico rappresenta la media + SD di 5 ripetizioni, 35 pesche a ripetizione. Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test di intervallo multipli, Tukey $P \leq 0,05$). NTT = testimone non trattato + frigoconservazione tradizionale (FT); ATT = ‘atomizzatore tradizionale + FT’; AIT = ‘atomizzatore innovativo + FT’; NTO = testimone non trattato + frigoconservazione in atmosfera controllata con ozono (FO); ATO = ‘atomizzatore tradizionale + FO’; AIO = ‘atomizzatore innovativo +FO’

Dopo 9 giorni di shelf life tutte le tesi hanno mantenuto una diffusione percentuale della malattia significativamente inferiore rispetto a NTT. In dettaglio è emerso che questa tesi ha dato valori di diffusione pari al 50,2%, significativamente maggiori a tutte le altre tesi, ed in particolare ai campioni della tesi ATO, con valori di diffusione del 6,3%; e di quelli della tesi AIT, con diffusione pari al 7,4%. Inoltre, è interessante osservare come i campioni della tesi ATT abbiano dato una diffusione del 18,3%, come della tesi NTO (Figura 17).

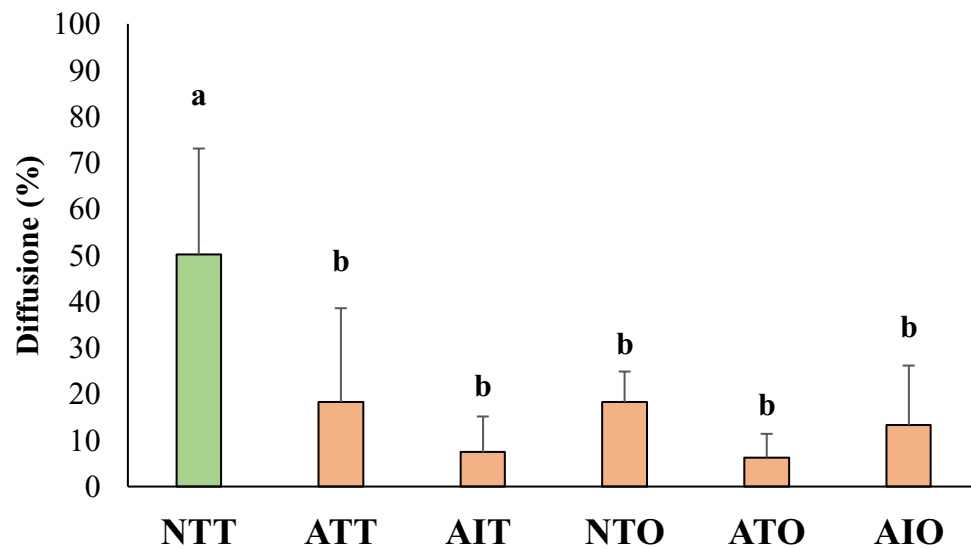


Figura 17 – Diffusione di moniliosi dopo 20 giorni di frigoconservazione e 9 giorni di shelf life, osservata su pesche, cultivar Extreme 486, raccolte presso l’azienda ‘Acciari’. Il grafico rappresenta la media + SD di 5 ripetizioni, 35 pesche a ripetizione. Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test di intervallo multipli, Tukey $P \leq 0.05$). NTT = testimone non trattato + FT; ATT = ‘atomizzatore tradizionale + FT’; AIT = ‘atomizzatore innovativo + FT’; NTO = testimone non trattato + FO; ATO = ‘atomizzatore tradizionale + FO’; AIO = ‘ atomizzatore innovativo + FO’

4.2 PROVA SPERIMENTALE 2: IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI SPORE AERODIFFUSE DI *MONILINIA* SPP. IN PESCHETO

4.2.1 Validazione del DNA estratto

L'analisi PCR effettuata con i primers universali ITS 1-4 ha evidenziato che da tutte le membrane relative al captaspore analizzate è stato isolato DNA relativo al DNA ribosomale di specie fungine. Per tutti i campioni si è osservato un amplificato di 1100 – 1200 bp (Figura 18).

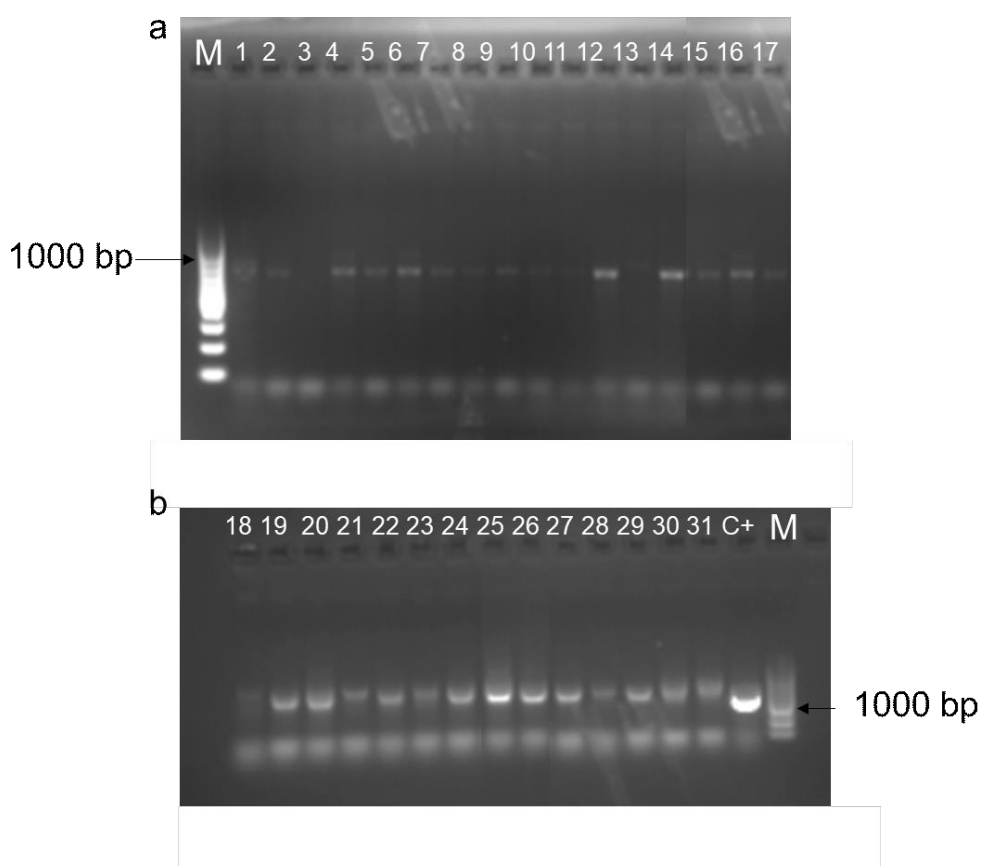


Figura 18 - Elettroforesi su gel di agarosio relativa all'amplificazione del DNA sottoposto ad analisi PCR con i primers universali ITS 1-4, isolato dalle membrane prelevate dal captaspore posizionato nel frutteto presso l'azienda 'Mazzoni'. C+ = *M. laxa*. M: Ladder 100 paia di basi (bp) Plus Opti-DNA Marker.

4.2.2 PCR convenzionale in Multiplex

L'indagine molecolare effettuata utilizzando le coppie di primers specifiche per le specie di *M. fructigena*, *M. fructicola* e *M. laxa*, mediante PCR convenzionale in Multiplex, non è stata in grado di rilevare la presenza di nessuna delle tre specie dal DNA estratto dalle membrane del captaspore. Solo il DNA estratto dai campioni positivi ha evidenziato un amplificato specifico alle specie di *Monilinia* (Figura 19).

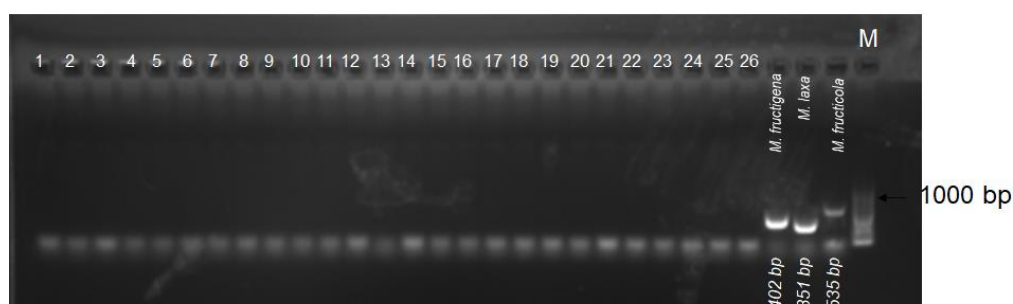


Figura 19 - Elettroforesi su gel di agarosio relativa all'amplificazione del DNA di alcuni campioni con PCR Multiplex e primers specifici alle specie *M. fructicola* = 'B2P6 BI'; *M. fructigena* = 'B3P1'; *M. laxa* = 'B2P2', estratto da membrane campionate dal captaspore collocato nel pescheto presso l'azienda 'Mazzoni', M: 100 bp Plus Opti-DNA Marker

4.2.3 PCR quantitativa Real Time (qPCR)

L'analisi qPCR effettuata testando le coppie di primers specifiche per le specie di *M. fructigena*, *M. fructicola* e *M. laxa*, ha evidenziato una curva di fusione degli amplificati specifica per ognuna delle specie. In dettaglio la coppia di primers relativa alla specie *M. fructigena* ha amplificato un singolo amplicone alla temperatura di fusione (TM), di 81,0°C, la coppia di primers specifici a *M. fructicola* hanno amplificato un amplicone con TM di 80°C, mentre la specie *M.*

laxa ha amplificato un amplicone con T_M 83,5 °C. Nessun frammento specifico è stato rilevato durante l'amplificazione (Figura 20).

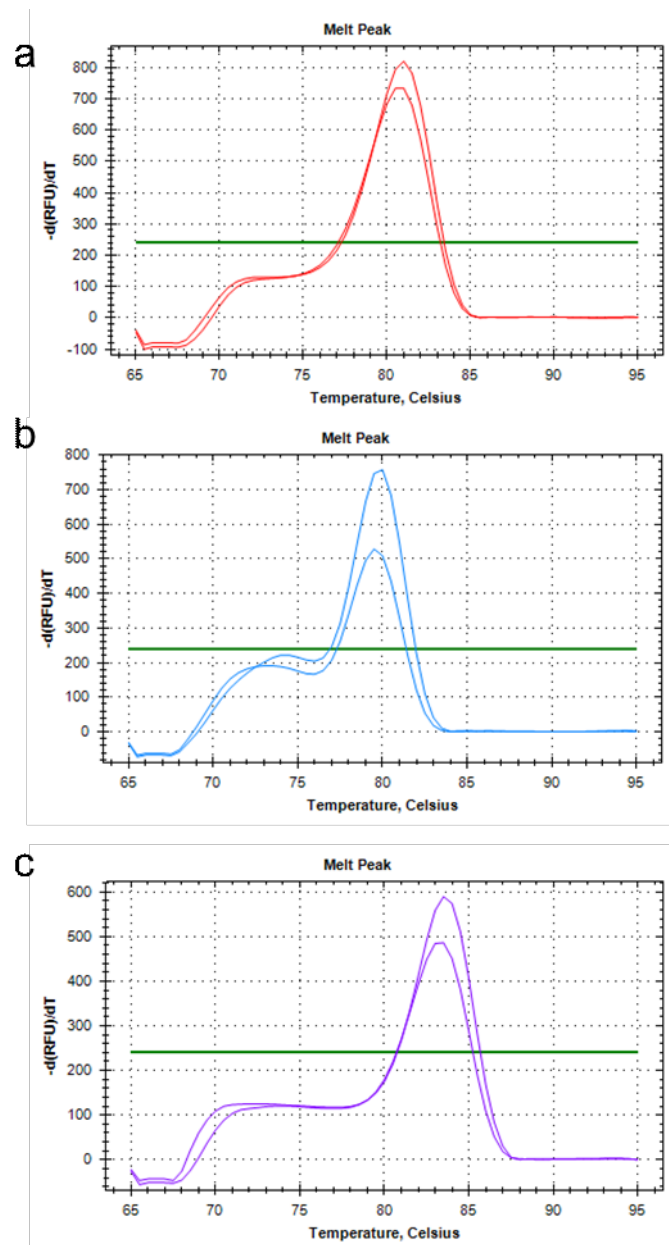


Figura 20 - Curve di fusione degli amplificati in qPCR ottenute dall'analisi dell'isolato 'B3P1' di *M. fructigena* (a); l'isolato 'B2P6 BI' di *M. fructicola* (b), l'isolato 'B2P2' di *M. laxa* (c).

L'analisi effettuata sui campioni estratti dal captaspore ha rilevato la presenza delle tre specie di *Monilinia* nelle membrane analizzate (Tabella 1).

Tabella 1 – Specie di *Monilinia* rilevate nelle membrane del captaspore mediante qPCR. La tabella mostra la settimana in cui ogni membrana è rimasta in campo per il rilievo delle spore aerodiffuse e le specie rilevate su ogni membrana indicate dal Ciclo soglia (Ct) \pm SD, (n = 2), rilevato in qPCR; nr = non rilevato.

	<i>Rilevamento captaspore</i>		<i>M. laxa</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. fructigena</i>
	Installazione	Rimozione	(Ct)	(Ct)	(Ct)
Marzo	18/03/2021	25/03/2021	nr	nr	nr
	25/03/2021	01/04/2021	nr	24.89 \pm 0.7	32.8 \pm 1.2
	01/04/2021	08/04/2021	33.0 \pm 0.5	34.4 \pm 0.2	nr
Aprile	08/04/2021	15/04/2021	nr	nr	nr
	15/04/2021	22/04/2021	33.0 \pm 0.5	32.5 \pm 0.6	nr
	22/04/2021	29/04/2021	nr	nr	nr
	29/04/2021	06/05/2021	nr	nr	nr
Maggio	06/05/2021	13/05/2021	nr	nr	nr
	13/05/2021	20/05/2021	nr	nr	nr
	20/05/2021	27/05/2021	nr	nr	nr
Giugno	27/05/2021	03/06/2021	nr	nr	nr
	03/06/2021	10/06/2021	36.7 \pm 0.4	37.2 \pm 0.8	36.2 \pm 1.3
	10/06/2021	17/06/2021	38.2 \pm 0.3	28.28 \pm 0.5	31.2 \pm 1.1
	17/06/2021	15/06/2021	37.2 \pm 0.9	nr	nr
	25/06/2021	02/07/2021	nr	nr	nr
Luglio	02/07/2021	08/07/2021	nr	nr	nr
	08/07/2021	15/07/2021	nr	nr	nr
	15/07/2021	22/07/2021	32.1 \pm 0.2	nr	nr
	22/07/2021	29/07/2021	nr	nr	nr
	29/07/2021	05/08/2021	33.1 \pm 0.8	32.4 \pm 0.7	30.5 \pm 0.6
Agosto	05/08/2021	12/08/2021	33.3 \pm 1.1	35.4 \pm 0.2	nr
	12/08/2021	19/08/2021	nr	nr	nr
	19/08/2021	26/08/2021	nr	nr	nr
	26/08/2021	02/09/2021	38.1 \pm 1.1	33.0 \pm 0.9	nr

Settembre	02/09/2021	09/09/2021	nr	27.0 ± 0.2	nr
	09/09/2021	16/09/2021	nr	-	nr
	16/09/2021	23/09/2021	35.1 ± 1.3	34.3 ± 0.6	nr
	23/09/2021	30/09/2021	29.6 ± 0.8	33.9 ± 0.7	nr
	30/09/2021	07/10/2021	34.9 ± 0.6	33.2 ± 0.8	nr
Ottobre	07/10/2021	14/10/2021	nr	nr	nr
	14/10/2021	21/10/2021	nr	37.0 ± 0.6	nr
	21/10/2021	28/10/2021	34.1 ± 0.7	27.4 ± 1.9	nr

M. laxa risulta presente su 13 dei 32 campioni, principalmente concentrata nelle prime settimane di aprile e giugno, e da luglio fino a fine ottobre. *M. fruticola* è stata osservata su 14 dei 32 campioni, più nello specifico dall'ultima settimana di marzo alla terza settimana di aprile, nelle prime settimane di giugno e da fine luglio a fine ottobre; infine *M. fructigena* è stata individuata su 4 dei 32 campioni analizzati, nell'ultima settimana di marzo, nelle prime settimane di giugno e tra l'ultima settimana di luglio ed i primi di agosto.

4.2.4 Droplet Digital PCR (ddPCR)

Un'indagine preliminare mediante la tecnologia ddPCR è stata effettuata su un numero selezionato di campioni limitatamente alle specie *M. fruticola* e *M. laxa* maggiormente rilevate nel frutteto. Lo studio mostra che i dati ottenuti sono

comparabili con quelli ottenuti per i medesimi campioni usando la tecnica qPCR (Figura 21).

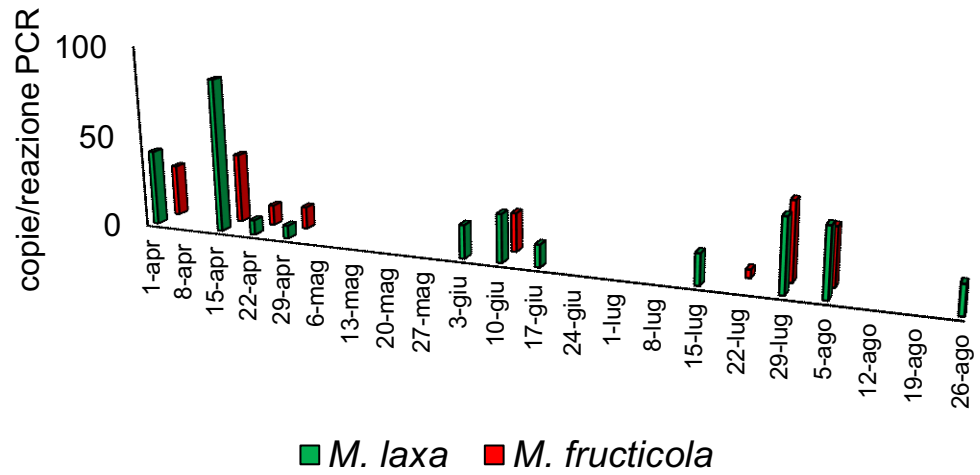


Figura 21 - Analisi ddPCR: viene mostrato il numero di copie di DNA relativo alle specie di *M. laxa* e *M. fructicola* rilevato sulle membrane del captaspore.

5 DISCUSSIONE

Il marciume bruno è riconosciuto quale una delle più dannose malattie crittogamiche a livello mondiale che causa elevate perdite delle produzioni nelle fasi di pre e postraccolta. Considerando l'attuale direzione che sta prendendo il settore agricolo negli ultimi anni in merito ad un'agricoltura il più possibile sostenibile ed ottimizzata nell'utilizzo delle risorse, riuscire a ridurre queste perdite, tramite l'applicazione di soluzioni innovative a basso impatto ambientale ed economico, non solo rientrerebbe a pieno in quest'ottica, ma permetterebbe alle aziende agricole di ottenere risorse importanti per fronteggiare questo periodo di crisi economica, portando allo stesso tempo alla riduzione di sprechi eticamente inammissibili. In questo contesto si inserisce questo lavoro di tesi che prende in considerazione diversi aspetti utili alle strategie di lotta integrata contro il marciume bruno, causato principalmente dalle specie *M. laxa*, *M. fructicola* e *M. fructigena*. A queste va aggiunta *M. polystroma*, che attualmente interessa principalmente i paesi asiatici (Petróczy et al., 2012; Rungjindamai et al., 2014; Abate et al., 2018). Attualmente non esistono metodi di lotta completamente efficaci per contrastare la malattia. Inoltre, il quasi completo divieto di utilizzo di fungicidi di sintesi in postraccolta ed una sempre più crescente sensibilità da parte dei consumatori nei confronti delle produzioni biologiche hanno spinto a ricercare delle alternative ai fungicidi di sintesi per una gestione sostenibile di questa malattia. A tale proposito, risultati incoraggianti relativi all'efficacia di prodotti alternativi nel contenimento delle fitopatie sono stati osservati sia in preraccolta che in postraccolta su un numero considerevole di specie (Feliziani et al 2015; Shao et al., 2015; Hosseini et al., 2020; Palou e Smilanick, 2020).

Questo lavoro di tesi, sviluppato nell'ambito del progetto PSR della Regione Marche "Prevenzione delle malattie postraccolta delle drupacee per la riduzione degli sprechi di ortofrutticoli freschi (ZeroSprechi)", i cui dettagli sono disponibili alla pagina www.zerosprechi.info, si è sviluppato in differenti prove sperimentali, con l'obiettivo di proporre soluzioni innovative che abbiano come finalità la riduzione dei trattamenti in campo e l'utilizzo di sistemi di controllo eco-compatibili, interagendo con aziende agricole caratterizzate dal seguire un disciplinare di produzione di tipo integrato. In primo luogo, è stata effettuata la valutazione di un atomizzatore innovativo per la somministrazione dei fitofarmaci che, comparato con il tradizionale, ha una maggiore capacità di limitare la deriva del prodotto in campo. L'analisi effettuata in postraccolta ha evidenziato che non c'è differenza in merito alla diffusione del marciume bruno in relazione ai due atomizzatori. Questo suggerisce che l'atomizzatore innovativo può garantire una prestazione comparabile al tradizionale, ma con un impatto ambientale ridotto. Inoltre, è risultata differente la diffusione della malattia tra i campioni trattati ed il campione non trattato. Questo implica che una riduzione dell'inoculo presente sul frutto in preraccolta determina una riduzione della diffusione della malattia nel postraccolta.

L'efficacia dell'ozono nella conservazione della frutta in postraccolta è stata analizzata su diversi lavori riguardanti kiwi (Minas et al., 2014), fragola (Pérez et al., 1999), melone (Yin et al., 2013) e pero (Alencar et al., 2014). In questo lavoro abbiamo testato su pesco due differenti periodi di frigoconservazione in presenza di ozono per 10 e 20 giorni. I risultati hanno evidenziato che nel test a 10 giorni, l'ozono non è stato in grado di ridurre la diffusione della malattia, mentre un'azione prolungata a 20 giorni si è dimostrata efficace nel contenere la

moniliosi. L'osservazione dei dati ottenuti dalle prove a 10 e a 20 giorni suggerisce che probabilmente l'ozono gassoso esplica meglio la sua attività disinfettante ed antimicrobica in tempi di conservazione medio lunghi, piuttosto che su tempistiche brevi. In particolare, è stata osservata una differenza significativa nella diffusione percentuale della malattia, tra la tesi NTT e tutte le altre tesi, compresa NTO. L'indagine ha considerato pesche trattate con fitofarmaci in preraccolta. In questo caso, il trattamento con ozono non ha prodotto una ulteriore riduzione della malattia ma ha mostrato comunque la sua efficacia nel contenere la malattia. Una speculazione in merito a quanto osservato suggerisce che l'ozono possa avere un'azione più marcata in presenza di una quantità di inoculo iniziale maggiore.

L'elevata pericolosità di alcune malattie rende quasi sempre impossibile subordinare i trattamenti alla comparsa dei sintomi e obbliga ad una valutazione previsionale che può essere utile all'applicazione di strategie preventive meno impattanti dal punto di vista ambientale, e spesso più mirate ed efficaci nel controllo delle suddette patologie. Tra queste è sicuramente opportuno includere il marciume bruno. Detto ciò, un dato fondamentale nello svolgimento di queste valutazioni previsionali è la presenza effettiva o meno in campo delle forme infettive del patogeno. In questa direzione si è sviluppato questo lavoro di tesi, con l'obiettivo di sfruttare strumenti di analisi molecolare quali la PCR convenzionale in Multiplex, la qPCR e la ddPCR per valutare la presenza di spore aerodiffuse di *M. laxa*, *M. fructicola* ed *M. fructigena* prelevate grazie all'impiego di captaspore collocati in frutteto. L'analisi effettuata con la PCR convenzionale in Multiplex non ha consentito il rilevamento di alcun agente di moniliosi. Ciò probabilmente è dovuto ad una bassa sensibilità della tecnica di

analisi dovuta alle quantità estremamente ridotte di DNA del patogeno presenti sulle membrane. A questo proposito l'analisi effettuata con la qPCR e la ddPCR, tecniche di analisi molecolare caratterizzate da una sensibilità maggiore rispetto alla precedente, hanno invece permesso l'individuazione delle tre specie di *Monilinia* oggetto di questa indagine. Lo studio dimostra l'importanza delle innovazioni tecnologiche in ambito molecolare sempre più utilizzate nella diagnostica dei patogeni delle piante nei differenti contesti ambientali (Bustin et al., 2009; Landi et al., 2019, 2021; Murolo et al., 2022). Le analisi hanno fornito risultati collimanti tra le tecniche utilizzate, evidenziando la presenza di *M. laxa*, *M. fructicola* e *M. fructigena* tra fine marzo e metà aprile, periodo corrisponde alla fase fenologica di fioritura. Questa coincidenza potrebbe rappresentare la conferma che sia possibile per queste specie infettare anche i fiori dei loro ospiti vegetali già nel periodo primaverile, determinando successive riduzioni dell'allegagione, cascole anticipate e formazione eventuale di conidi e conidiofori, fino a formazione di cancri rameali nelle casistiche più gravi (Holb, 2008; Di Francesco et al., 2018). Inoltre, l'analisi ha individuato l'intervallo da fine luglio a fine ottobre quale periodo di massima concentrazione delle spore di *M. fructicola* e *M. laxa*, come suggerito da lavori precedenti effettuati su *M. fructicola* (Fagioli et al., 2016). Va sottolineato che questo periodo corrisponde a quello della maturazione delle pesche, nettarine e albicocche presenti nel frutteto. Questo suggerisce una predilezione dei patogeni nell'infettare i frutti, dove appunto la malattia si sviluppa maggiormente, causando le principali perdite in preraccolta, ed è più marcato il fenomeno dell'emissione di conidi e conidiofori, con massima sporulazione (Liberato e Miles, 2006). Differentemente dalle altre specie, *M. fructigena* è stata rilevata solo nel mese di

giugno. Questa minor presenza può essere giustificata dall'assenza dell'ospite principale del patogeno, e cioè di specie appartenenti alla sottofamiglia delle pomacee, tuttavia studi precedenti hanno evidenziato la minor virulenza di questa specie rispetto alle altre analizzate (Cox et al., 2018; Di Francesco et al., 2018), suggerendo una possibile correlazione tra minor virulenza e minor presenza della specie in campo.

6 CONCLUSIONI

Le conclusioni di questo lavoro evidenziano l'efficacia dell'ozono gassoso sul contenimento del marciume bruno delle drupacee in postraccolta. La diversa efficacia osservata in relazione al tempo di esposizione suggerisce la necessità di ottimizzare tempi e/o concentrazioni al fine di trovare un equilibrio tra efficacia ed eventuali fenomeni di fitotossicità. Le analisi molecolari hanno permesso di individuare la presenza del patogeno, fornendo dati potenzialmente utilizzabili all'interno di modelli previsionali sulla base dei quali, in un prossimo futuro, potrebbe essere possibile sviluppare strategie preventive meno impattanti da un punto di vista ambientale e magari anche economico, considerando la possibile riduzione nel numero di interventi in campo, ma più efficaci nel contenere la malattia con un impatto sulla riduzione delle perdite in postraccolta.

In generale, obiettivo indiretto di questo lavoro potrebbe essere evidenziare come sia auspicabile una miglior comunicazione tra le aziende agricole e gli enti che si occupano di diagnostica e di ricerca in campo fitopatologico, in modo tale da sviluppare strategie più puntuali ed efficaci nel controllo delle patologie. In una società dove è sempre più sentita la problematica ambientale, non è più sufficiente la sola esperienza degli agricoltori, che deve essere integrata in maniera complementare dalle conoscenze ottenibili solamente tramite la ricerca scientifica e la sperimentazione. Questa è la strada per riuscire a gestire in maniera sostenibile le avversità del settore, come si è cercato di fare in questo studio specifico per il marciume bruno delle drupacee in pre e postraccolta.

7 BIBLIOGRAFIA

- Abate, D., Pastore, C., Gerin, D., De Miccolis Angelini, R.M., Rotolo, C., Pollastro, S., Faretra, F., 2018. Characterization of *Monilinia* spp. on stone fruit in South Italy. *Plant Disease* 102, 1708-1717.
- Alencar, E.R., Faroni, L.R., Pinto, M.S., Da Costa, A.R., Carvalho, A.F., 2014. Effectiveness of ozone on postharvest conservation of pear (*Pyrus communis* L.). *Journal of Food Processing and Technology* 5(4), 317.
- Anonimo, 2004. *Monilinia fructigena* (brown rot). *Crop protection compendium*. CAB International, Wallingford, UK.
- Batra, L.R., 1991. World species of *Monilinia* (Fungi): their ecology, biosystematics and control. *Mycologia Memoir* 16, 246.
- Bustin, S., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611–622.
- Byrde, R.J.W., Willetts, H.J., 1977. The brown rot fungi of fruit. Their biology and control. *Pergamon Press, Oxford, UK*.
- Casals, C., Elmer, P.A.G., Viñas, I., Teixidó, N., Sisquella, M., Usall, J., 2012. The combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 to control brown rot infections caused by *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biology and Technology* 64(1), 126–132.
- Côté, M., Tardif, F., Meldrum, A., 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease* 88, 1219-1225.

- Cox, K.D., Villani, S.M., Poniatowska, A., Schnabel, G., Holb, I., Fajardo, J., 2018. Recovery plan for *Monilinia polystroma* causing Asiatic brown rot of stone fruit. *Plant Health Progress* 19, 107-124.
- Di Francesco, A., Mari, M., 2018. *Monilinia* species of fruit decay: a comparison between biological and epidemiological data. *Italian Journal of Mycology* 47, 2531-7342.
- Emery, K.M., Michailides, T.J., Scherm, H., 2000. Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia. *Plant Disease* 84(8), 853-857.
- Fagioli, F., Allegri, A., Antonacci, L., Bugiani, R., Pelliconi, F., Rossi, R., 2016. Efficacia del posizionamento di trattamenti fungicidi per il contenimento di *Monilinia fructicola*. *Giornate Fitopatologiche* 2, 421-426
- Feliziani, E., Landi, L., Romanazzi, G., 2015. Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. *Carbohydrate Polymers* 132, 111– 117.
- Glowacz, M., Colgan, R., Rees, D., 2015. The use of ozone to extend the shelf-life and maintain quality of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(4), 662-671.
- Glowacz, M., Rees, D., 2016. The practicality of using ozone with fruit and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(14), 4637-4643.
- Hailu, G., Derbew, B., 2015. Extent, causes and reduction strategies of postharvest losses of fresh fruits and vegetables—A review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 5(5), 49–64.
- Holb, I.J., 2006. Possibilities of brown rot management in organic stone fruit

- production in Hungary. *International Journal of Horticultural Science* 12, 87-91.
- Holb, I.J., 2008. Monitoring conidial density of *Monilinia fructigena* in the air in relation to brown rot development in integrated and organic apple orchards. *European Journal of Plant Pathology* 120(4), 397-408.
- Holb, I.J., Szőke, S., Abonvi, F., 2012. Temporal development and relationship amongst brown rot blossom blight, fruit blight and fruit rot in integrated and organic sour cherry orchards. *Plant Pathology* 62(4), 727-960.
- Hong, C., Holtz, B.A., Morgan, D.P., Michailides, T.J., 1997. Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. *Plant Disease* 81, 519-524.
- Hosseini, S., Amini, J., Saba, M.K., Karimi, K., Pertot, I., 2020. Preharvest and postharvest application of garlic and rosemary essential oils for controlling anthracnose and quality assessment of strawberry fruit during cold storage. *Frontiers in Microbiology* 11, 1855.
- Hrustić, J., Mihajlović, M., Grahovac, M., Delibašić, G., Bulajić, A., Krstić, B., Tanović, B., 2012. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species. *Pesticidi i Fitomedicina* 27(4), 283-297.
- Huggett, J.F., Foy, C.A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J.A., Haynes, R., Hellemans, J., Kubista, M., Mueller, R.D., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., Bustin, S.A., 2013. The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 59(6), 892-902.
- Huyskens-Keil, S., Hassenberg, K., Herppich, W., 2012. Impact of postharvest UV-C and ozone treatment on textural properties of white asparagus

- (*Asparagus officinalis* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 84, 229-234.
- Kim, J.G., Yousef, A.E., Khadre, M.A., 2003. Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in Food and Nutrition Research* 45, 167-218.
- Kim, J., Do, Park, M.Y., Jeon, B.J., Kim, B.S., 2019. Disease control efficacy of 32,33-didehydroroflomycoïn produced by *Streptomyces rectiviolaceus* strain DY46 against gray mold of tomato fruit. *Scientific Reports* 9(1), 1–9.
- Lalancette, N., 2015. Brown Rot Management in a Wet Growing Season: Part I. *Plant & Pest Advisory*. Rutgers Cooperative Extension.
- Landi, L., Foglia, R., Murolo, S., Romanazzi, G., 2021. The mycorrhizal status in vineyards affected by esca. *Journal of Fungi* 7, 869.
- Landi, L., Murolo, S., Romanazzi, G., 2019. Detection of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ in roots from Bois noir symptomatic and recovered grapevines. *Scientific Report* 9, 2013.
- Liberato, J.R., Miles, A.K., 2006. Brown rot of stone fruit (*Monilinia* spp.). *Pest and Disease Image Library*.
- Lindroth, R.L., 2010. Impacts of elevated atmospheric CO₂ and O₃ on forests: phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. *Journal of Chemical Ecology* 36(1), 2-21.
- Mahajan, P.V., Caleb, O.J., Singh, Z., Watkins, C.B., Geyer, M., 2014. Postharvest treatments of fresh produce. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*. 372, 20130309.

- Martini, C., Lantos, A., Di Francesco, A., Guidarelli, M., D'Aquino, S., Baraldi, E., 2014. First report of Asiatic brown rot caused by *Monilinia polystroma* on peach in Italy. *Plant Disease* 98, 1585.
- Martini, C., Mari, M., 2014. Chapter 7 - *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (*Monilinia Rot*, *Brown Rot*) (S. B. T.-P. D. Bautista-Baños (ed.); 233–265). *Academic Press*.
- Minas, I.S., Vicente, A.R., Dhanapal, A.P., Manganaris, G.A., Goulas, V., Vasilakakis, M., Crisosto, C.H., Molassiotis, A., 2014. Ozone-induced kiwifruit ripening delay is mediated by ethylene biosynthesis inhibition and cell wall dismantling regulation. *Plant Science* 229, 76–85.
- Murolo, S., Moumni, M., Mancini, V., Allagui, M.B., Landi, L., Romanazzi, G., 2022. Detection and Quantification of *Stagonosporopsis cucurbitacearum* in seeds of *Cucurbita maxima* using droplet digital polymerase chain reaction. *Frontiers in Microbiology*. 12:764447.
- Najafi, M.B.H., Khodaparast, M.H., 2009. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. *Food Control* 20(1), 27–30.
- Obi, V., Barriuso, J., Gogorcena, Y., 2018. Peach brown rot: still in search of an ideal management option. *Agriculture* 8(8), 125.
- Ogawa, J.M., English, H., 1991. Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops. *University of California, Division of Agriculture and Natural Resources Publications*. 3345.
- Ondejková, N., Hudecová, M., Bacigálová, K., 2010. First report on *Monilinia fructicola* in the Slovak Republic. *Plant Protection Science* 46(4), 181-184.
- Palou, L., Crisosto, C.H., Smilanick, J.L., Adaskaveg, J.E., Zoffoli, J.P., 2002. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and

- physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 24(1), 39-48.
- Palou, L., Smilanick, J.L., 2020. Postharvest pathology of fresh horticultural produce. In L. Palou & J. Smilanick (Eds.) (1st ed., pp. 1– 842). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Palou, L.S., Smilanick, J.L., Crisosto, C.H., Mansour, M., Plaza, P., 2003. Ozone gas penetration and control of the sporulation of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* within commercial packages of oranges during cold storage. *Crop Protection* 22, 1131–1134.
- Papavasileiou, A., Testempasis, S., Michailides, T.J., Karaoglanidis, G.S., 2014. Frequency of brown rot fungi on blossoms and fruit in stone fruit orchards in Greece. *Plant Pathology* 64(2), 243-500.
- Perez, A.G., Sanz, C., Rios, J.J., Olias, R., Olias, J.M., 1999. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(4), 1652–1656.
- Petróczy, M., Szigethy, A., Palkovics, L., 2012. *Monilinia* species in Hungary: morphology, culture characteristics, and molecular analysis. *Trees* 26, 153-164.
- Pilo, P., Tiley, A.M.M., Lawless, C., Karki, S.T., Burke, J., Feechan, A., 2022. A rapid fungal DNA extraction method suitable for PCR screening fungal mutants, infected plant tissue and spore trap samples. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 117, 101758.

- Poniatowska, A., Michalecka, M., 2013. Characteristics of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology* 135, 855–865.
- Prabha, V., Barma, R., Singh, R., Madan, A., 2015. Ozone technology in food processing: a review. *Trends in Biosciences* 8, 403-4047.
- Prusky, D., 2011. Reduction of the incidence of postharvest quality losses, and future prospects. *Food Security* 3(4), 463–474.
- Pscheit, J.W., 2020. *Pacific Northwest Pest Management Handbooks*.
- Ritchie, D.F., 2000. Brown rot of stone fruits. *The Plant Health Instructor*.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., 2014. Chapter 4 - *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In S. B. T.-P. D. Bautista-Baños (Ed.). *Postharvest Decay*. 131–146. *Academic Press*.
- 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.
- Rungjindamai, N., Jeffries, P., Xu, X.M., 2014. Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*. *European Journal of Plant Pathology* 140, 1-17.
- Salami, P., Ahmadi, H., Keyhani, A., Sarsaifee, M., 2010. Strawberry post-harvest energy losses in Iran. *Researcher* 4, 67–73.
- Shao, X., Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D., Wang, H., 2015. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest Biology and Technology* 99, 37–43.
- Sisquella, M., Casals, C., Picouet, P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., 2013. Immersion of fruit in water to improve radio frequency treatment to control

- brown rot in stone fruit. *Postharvest Biology and Technology* 80, 31–36.
- Skog, L.J., Chu, C.L., 2001. Effect of ozone on qualities of fruits and vegetables in cold storage. *Canadian Journal of Plant Science* 81(4), 773–778.
- Smilanick, J.L., 2003. Use of ozone in storage and packing facilities. *Washington Tree Fruit Postharvest Conference*, 1-10.
- Suslow, T., 2004. Ozone applications for postharvest disinfection of edible horticultural crops. *UCANR Publications*.
- Toti, M., Carboni, C., Botondi, R., 2018. Postharvest gaseous ozone treatment enhances quality parameters and delays softening in cantaloupe melon during storage at 6° C. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(2), 487–494.
- Van Leeuwen, G.C.M., Baayen, R.P., Holb, I.J., Jeger, M.J., 2002. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycological Research* 106, 444-451.
- Van Leeuwen, G.C.M., Van Kesteren, H.A., 1998. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Canadian Journal of Botany* 76, 2042-2050.
- Wang, K.L.C., Li, H., Ecker, J.R., 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell* 14, S131–S151.
- Whangchai, K., Saengnil, K., Uthaibutra, J., 2006. Effect of ozone in combination with some organic acids on the control of postharvest decay and pericarp browning of longan fruit. *Crop Protection* 25(8), 821-825.
- White, T.J., Burns, S.B.L., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR protocols a guide to methods and applications*. 315-322. Academic press, San Diego.

- Wilson, E.E., Ogawa, J.M. 1979. Fungal, bacterial and certain non-parasitic diseases of fruit and nut crops in California. *Californian Agricultural Science Publications*, Berkeley, California, USA.
- Yin, X.R., Zhang, Y., Zhang, B., Yang, S.L., Shi, Y.N., Ferguson, I.B., Chen, K.S., 2013. Effects of acetylsalicylic acid on kiwifruit ethylene biosynthesis and signaling components. *Postharvest Biology and Technology* 83, 27–33.
- Zhao, Z., Xu, G., Han, Z., Li, Q., Chen, Y., Li, D., 2013. Effect of ozone on the antioxidant capacity of qiushui pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Qiushui) during postharvest storage. *Journal of Food Quality* 36(3), 190-197.
- Zorlugenç, B., Zorlugenç, F.K., Öztekin, S., Evliya, I.B., 2008. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B1 in dried figs. *Food and Chemical Toxicology* 46(12), 3593–3597.
- Zuccolo, M., Kunova, A., Musso, L., Forlani, F., Pinto, A., Vistoli, G., Gervasoni, S., Cortesi, P., Dallavalle, S., 2019. Dual-active antifungal agents containing strobilurin and SDHI-based pharmacophores. *Scientific Reports* 9(1), 11377.

