



Difesa in post-raccolta tra restrizioni normative e nuove tecnologie

Davide Spadaro e Maria Lodovica Gullino

19 novembre 2021

AGROINNOVA

Università di Torino



Le perdite di produzione nella filiera ortofrutticola



45%

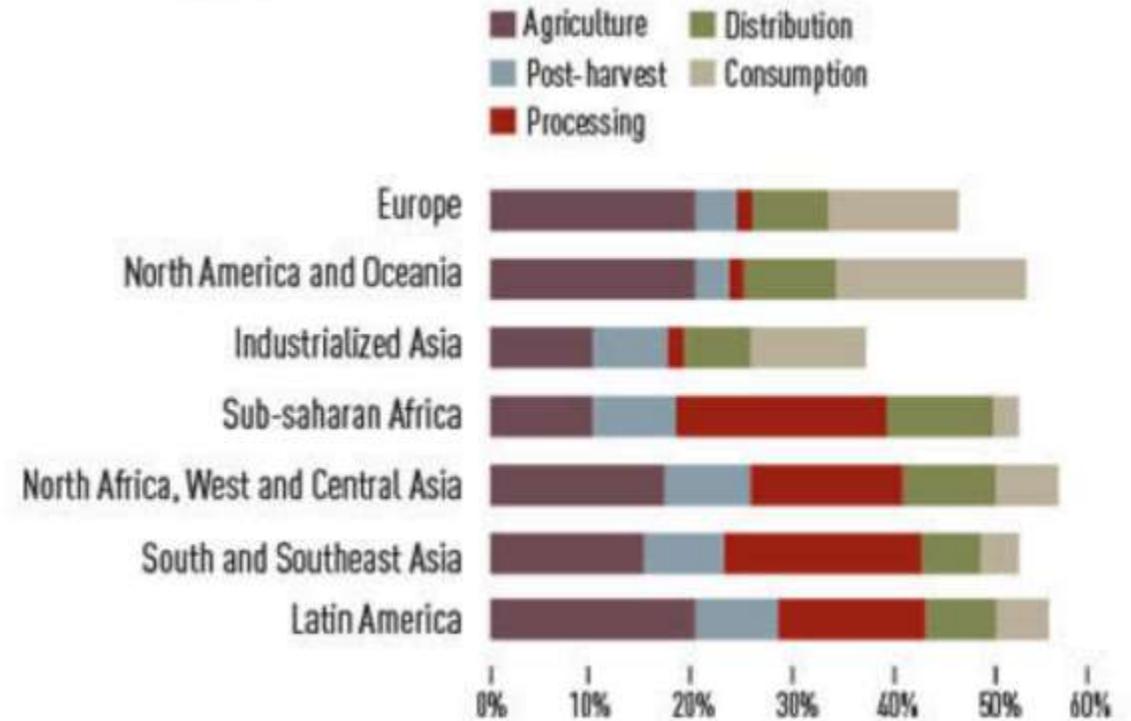
FRUIT & VEGETABLES FOOD LOSSES

Along with roots and tubers, fruit and vegetables have the highest wastage rates of any food products; almost half of all the fruit and vegetables produced are wasted.



3.7 trillion apples

©FAO 2012



Patogeni post-raccolta



Muffa blu: *Penicillium expansum*



Monilinia spp.: marciume bruno



Cadophora luteo-olivacea:
maculatura epidermica



Muffa grigia:
Botrytis cinerea



Venturia inaequalis: ticchiolatura da magazzino



Neofabraea alba:
marciume lenticellare

Nuovi patogeni su mele



Ramularia mali: marciume lenticellare secco
Mele 'Ambrosia'



Patina bianca
Mele 'Red Delicious', 'Ambrosia', 'Gala' e 'Red Chief'

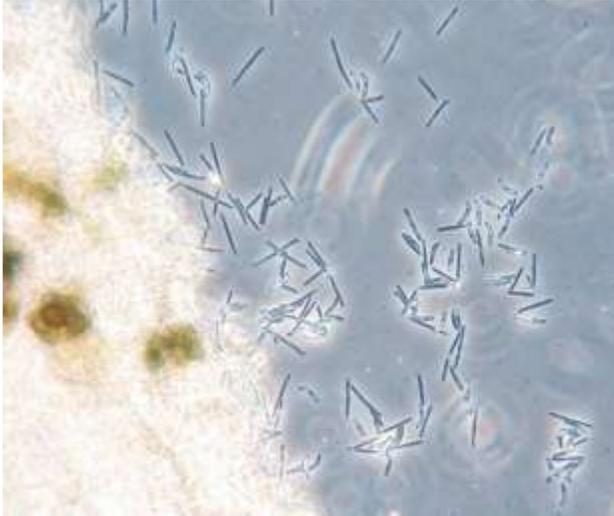


Venturia asperata: ticchiolatura
Mele 'Story Inored'



Monilinia polystroma: marciume bruno
Mele 'Jeromine'

Patina bianca



Sterigmi e ballistospore



Difetto cosmetico
Film bianco superficiale ceroso e opaco
sulla cuticola

Compare poco prima della raccolta



Mela 'Brookfield'



Basidiomiceti lieviformi saprofitici
Ordini: Entylomatales e Golubeviales (*G. pallescens* e *T. washingtonensis*)

Ritrovato in Paesi Bassi, Italia, Germania e Croazia.

Patina bianca: monitoraggio e isolamento

Monitoraggio mensile da maggio a settembre su meleti suscettibili.



CORTECCIA



FOGLIE



FRUTTI



INFESTANTI

2019 e 2020

2020

Funghi lenti
Metodo di caduta delle ballistospore
(RBCA)



Monitoraggio per area geografica



Piemonte

Trento

Bolzano



T. washingtoniensis

10

4

14

E. belangeri

1

11

4

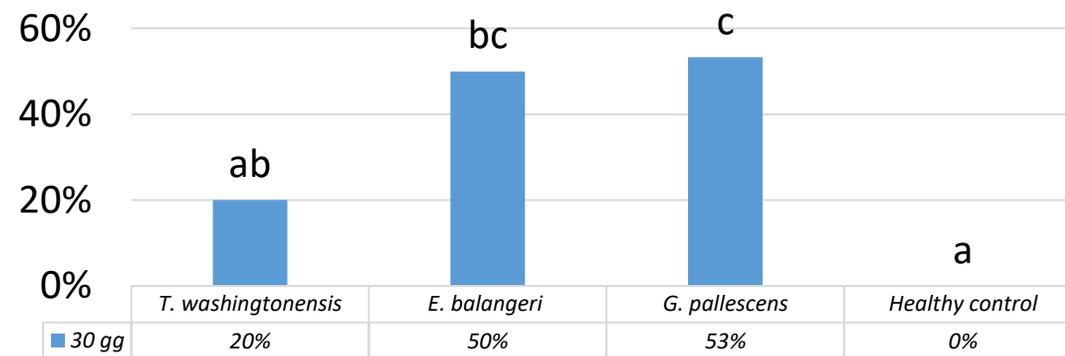
G. pallescens

19

1

0

Incidenza di patina bianca (%) su mele 'Story Inored'



Marciume lenticellare secco



Mele 'Ambrosia'

Patogeno latente

Infezioni in frutteto, latenza

Regione pianeggianti umide

Piemonte, Trento e Bolzano

Causato da ***Ramularia mali***

Famiglia: Mycosphaerellaceae

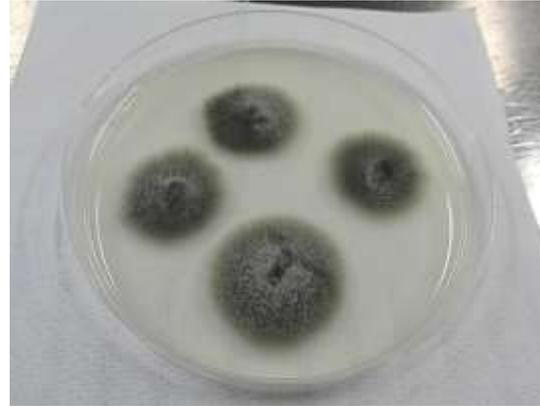
Ordine: Capnodiales

Classe: Dothideomycetes

Macchia nera del pero e marciume nero delle pere



Alternaria spp.



18 *A. arborescens* species complex (AASC)

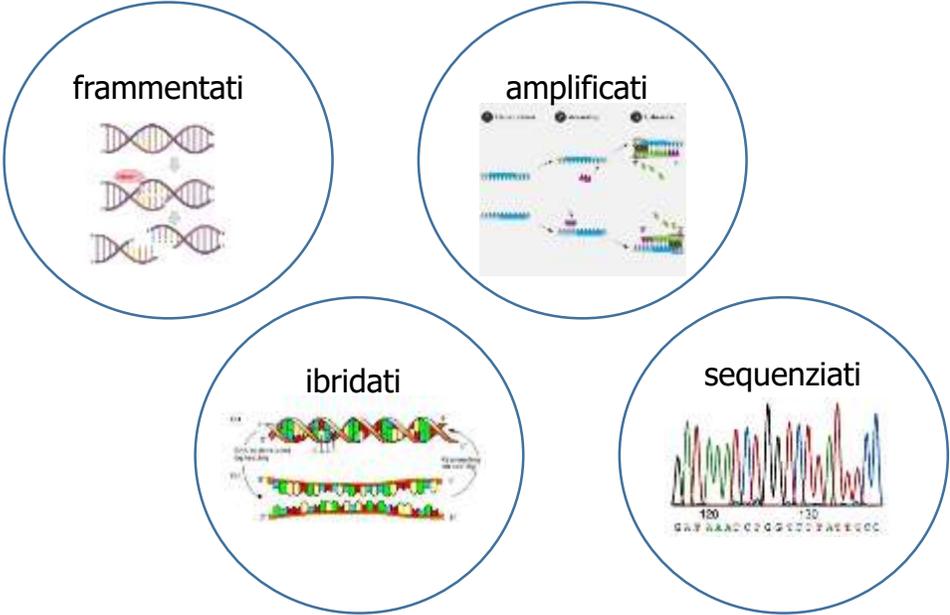
28 *A. alternata*



Gestione delle malattie in post-raccolta



Diagnosi molecolare



PCR specifica per patogeni post-raccolta



Obiettivo: confermare la specie

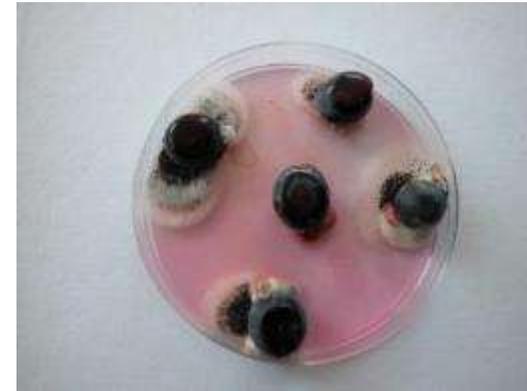
Primer disegnati su una regione amplificata e sequenziata
Primer SCAR (*sequence characterized amplified region*)

Possono essere specie-specifici



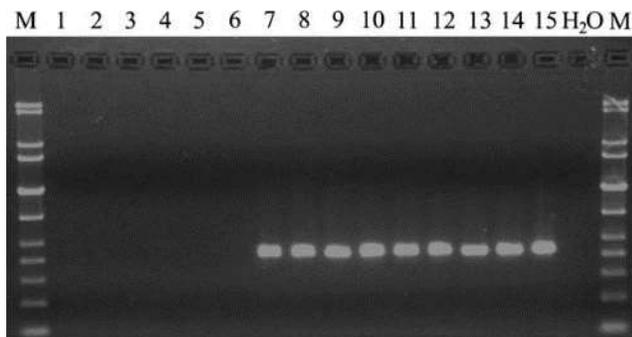
SCAR primer disegnati su ITS
per
Cadophora luteo-olivacea su
kiwi e pere

Spadaro et al. 2011, *Phytopath. Med.*



SCAR primer disegnati su OTA-PKS
per
Aspergillus carbonarius su vite

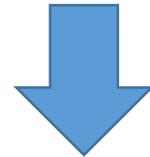
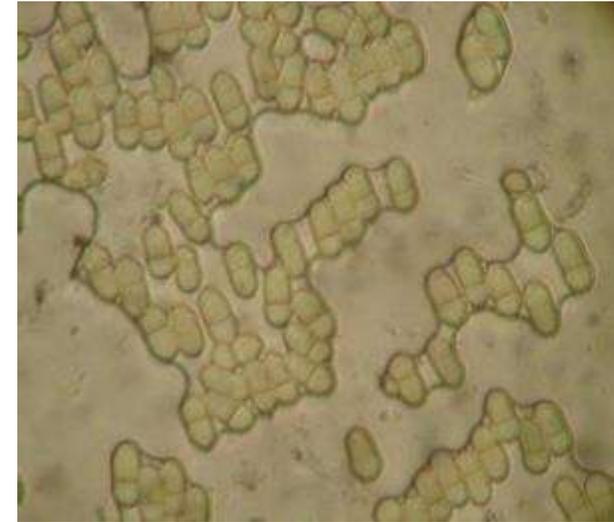
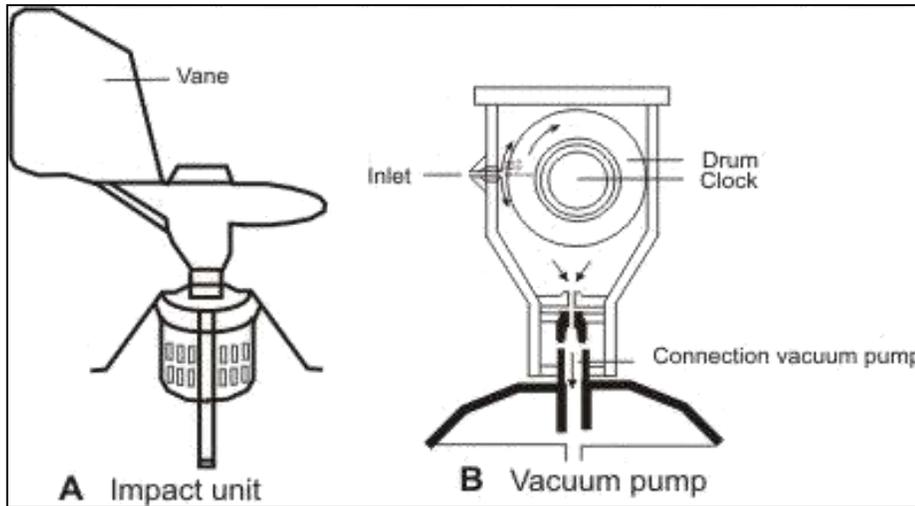
Spadaro et al. 2011, *Ann. Microb.*



Captaspore per ticchiolatura

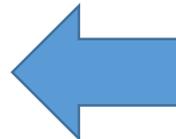


Venturia inaequalis

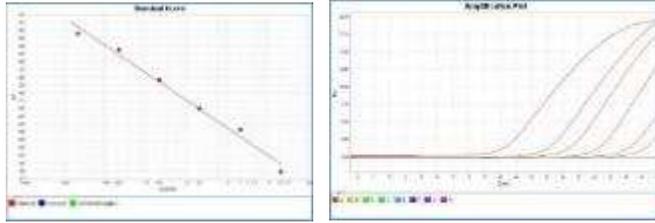


Nastro adesivo
OK per microscopio
Problemi di estrazione

Tubi Eppendorf
OK per analisi del DNA

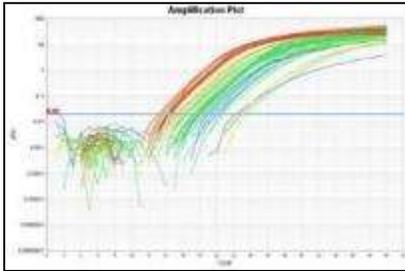


Sonda Taqman qPCR per *Venturia inaequalis*



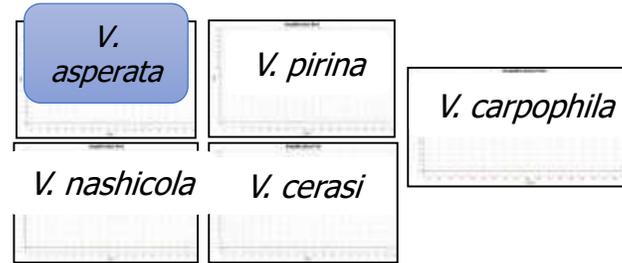
LOD: 20 fg

(Meno di una cellula di *V. inaequalis*)



Amplificazione da campioni sintomatici ed asintomatici

Altre specie di *Venturia* tra cui *V. asperata*.

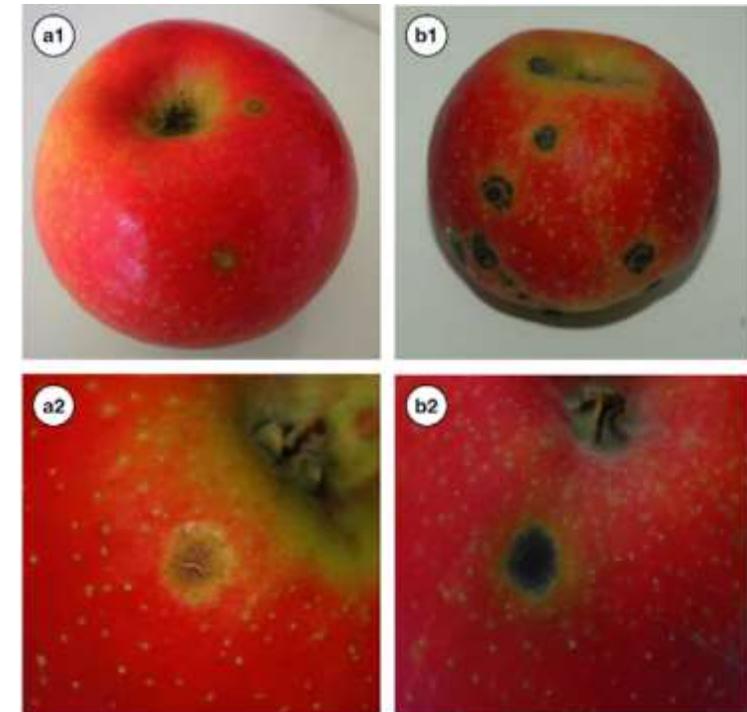


Elevata sensibilità e specificità

Assenza di amplificazione per

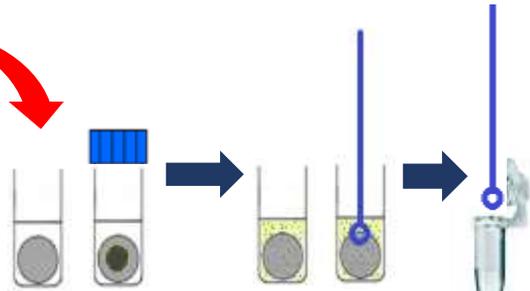


Altri patogeni del melo



Validazione: foglie, frutti e captaspore

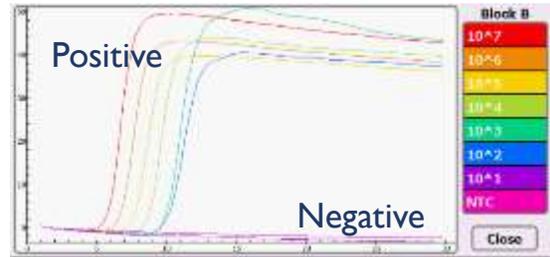
LAMP per *Monilinia* spp. e per *Venturia inaequalis*



LAMP assay			
Specie	Isolate name	Tp (min:s)	Anneal (°C)
<i>Venturia inaequalis</i>	2.16 B9	29:28±01:40	89.72±0.13
<i>V. inaequalis</i>	2.16 B1	26:67±01:30	89.38±0.03
<i>V. inaequalis</i>	2.16 B6	24:04±00:49	89.08±0.03
<i>V. inaequalis</i>	2.16 B7	26:37±00:52	89.06±0.15
<i>V. inaequalis</i>	2.16 B5	23:48±00:58	89.36±0.39

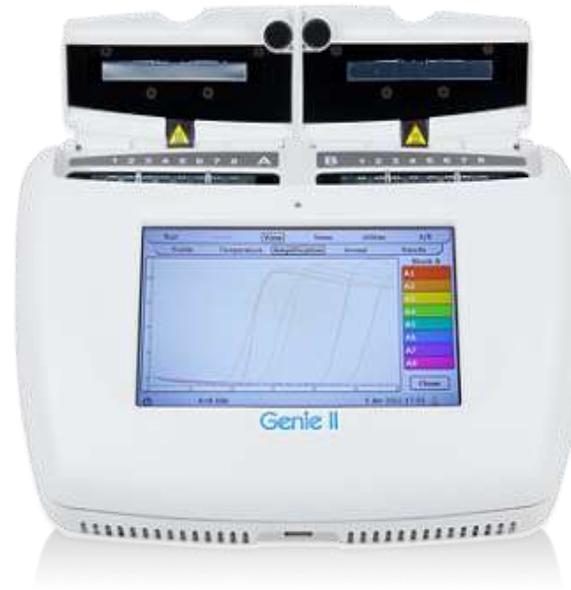


Saggi con
nettarine
inoculate con
M. laxa e *M.
fructicola*



Validata con:

- Foglie di melo artificialmente inoculate;
- Foglie di melo naturalmente infette.



Temperature	Day inoculated	Day tested	day after inoculum	disease index average	Tp (h:min:s)-Crude extraction method
20°C	16/08/2017	18/08/2017	3	0	00:11:31±00:01:55
	16/08/2017	21/08/2017	5	0	00:10:03±00:03:02
	16/08/2017	23/08/2017	8	0.67	00:10:56±00:00:10
	16/08/2017	25/08/2017	10	1	00:07:06±00:04:25
	16/08/2017	28/08/2017	13	4	00:09:02±00:01:32
	16/08/2017	30/08/2017	15		
4°C	16/08/2017	01/09/2017	18		
	16/08/2017	18/08/2017	3	0	00:18:52±00:14:48
	16/08/2017	21/08/2017	5	0	00:12:13±00:08:21
	16/08/2017	23/08/2017	8	0	00:12:11±00:01:25
	16/08/2017	25/08/2017	10	1	00:10:28±00:00:23
	16/08/2017	28/08/2017	13	0	00:19:50±00:08:54
	16/08/2017	30/08/2017	15	1.33	00:10:23±00:02:00
	16/08/2017	01/09/2017	18		
	16/08/2017	03/09/2017	20		

Il microbioma delle mele

Studio del microbioma di mele 'Ambrosia' (TS e convenzionale) e 'Opal' (TR e biologica), in frutteto e in post-raccolta



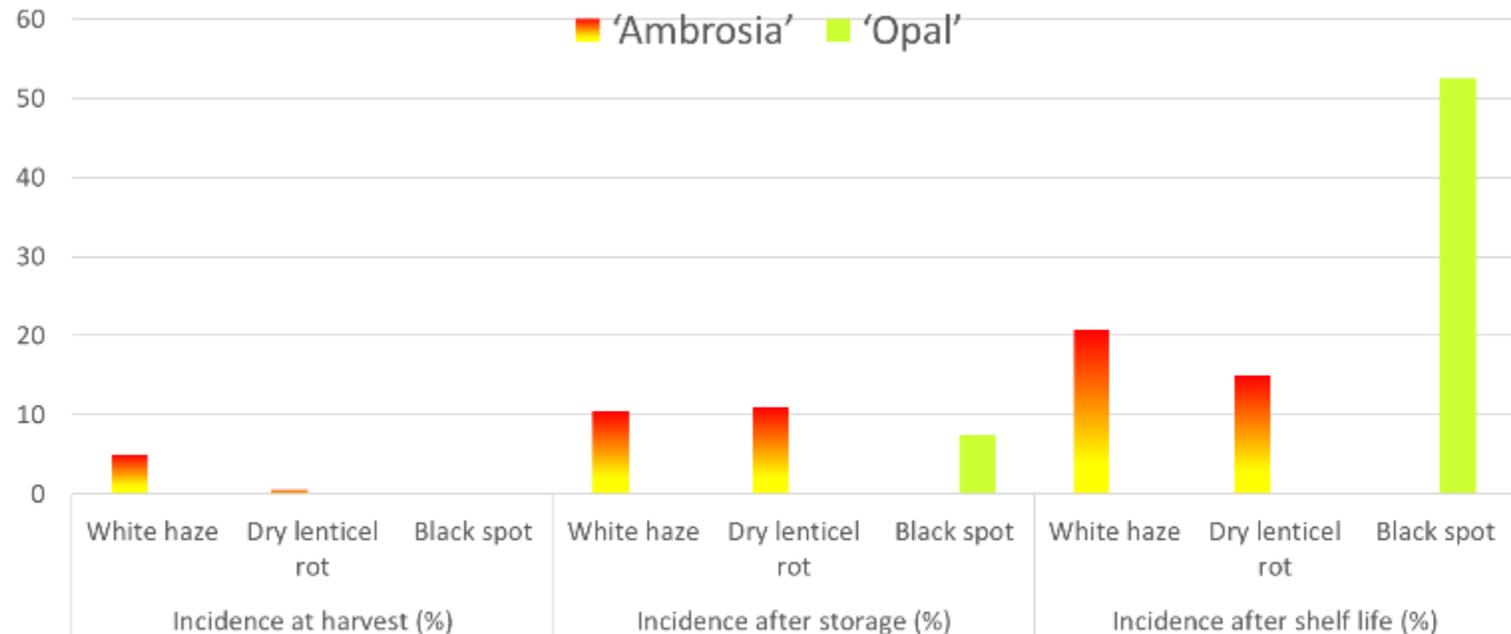
2 comunità microbiche: epifitico ed endofitico
6 tempi: 4 pre-raccolta, 1 in conservazione, 1 in shelf-life

5 replicazioni biologiche

Libreria di amplificati con primer ITS

Sequenziamento pair end con MiSeq

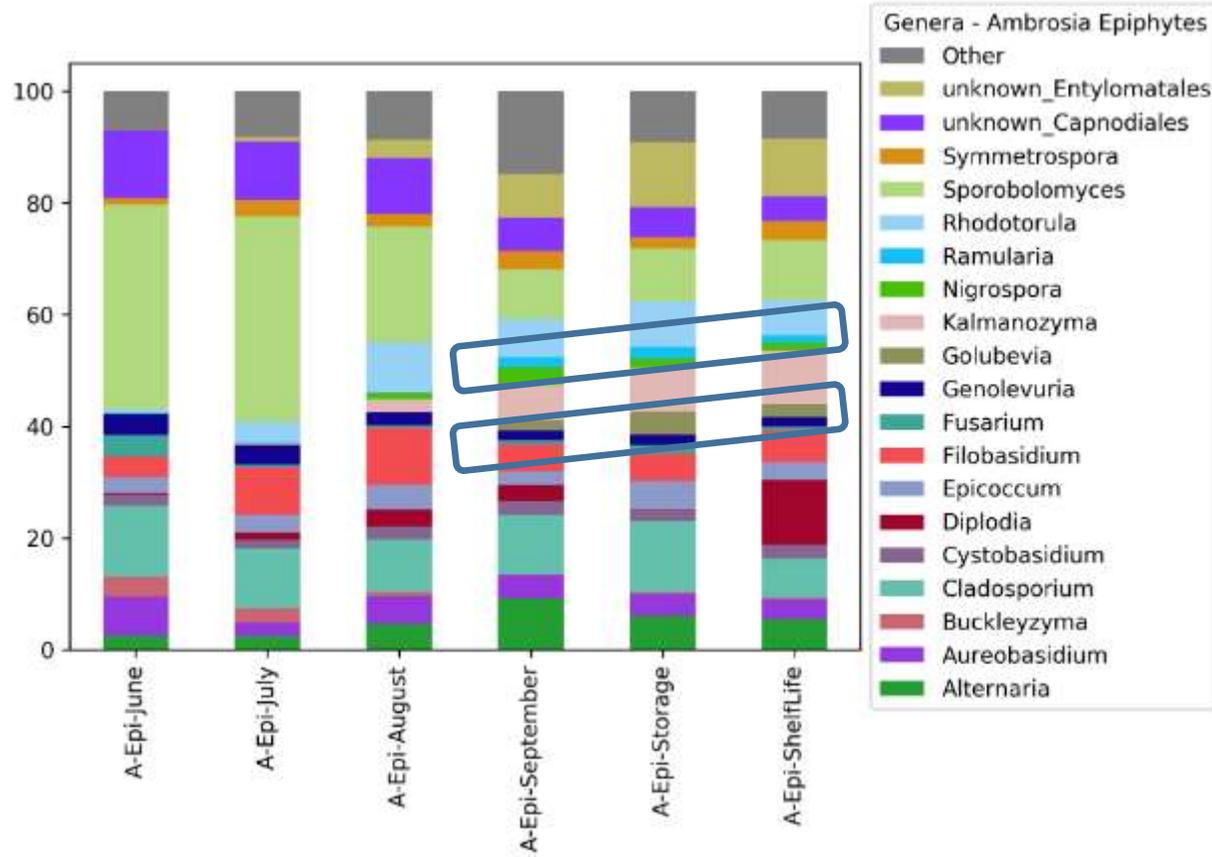
Incidenza alla raccolta,
dopo 60 g conservazione
e dopo 10 g shelf life



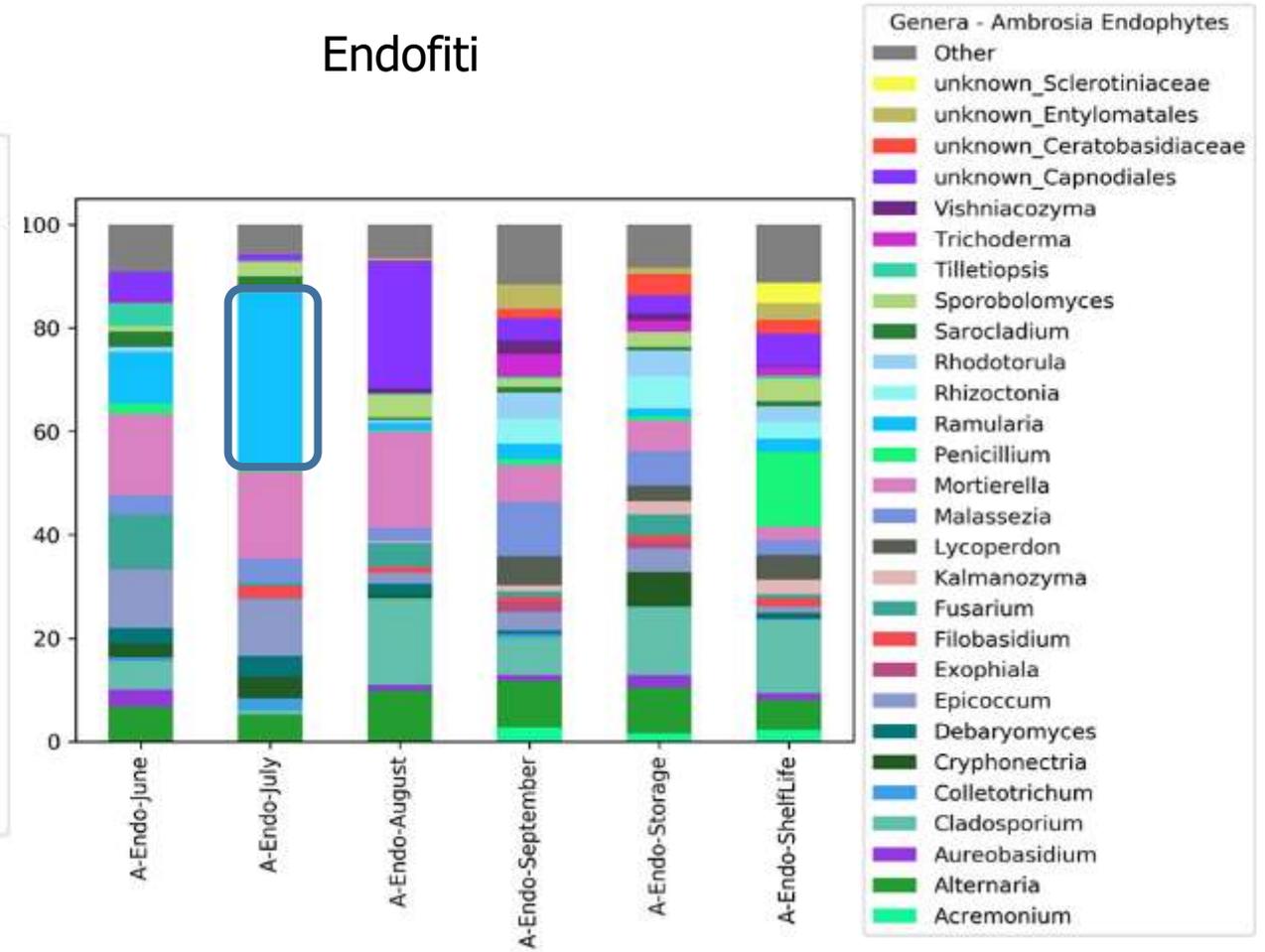
I microbiomi epifitico e endofitico



Epifiti

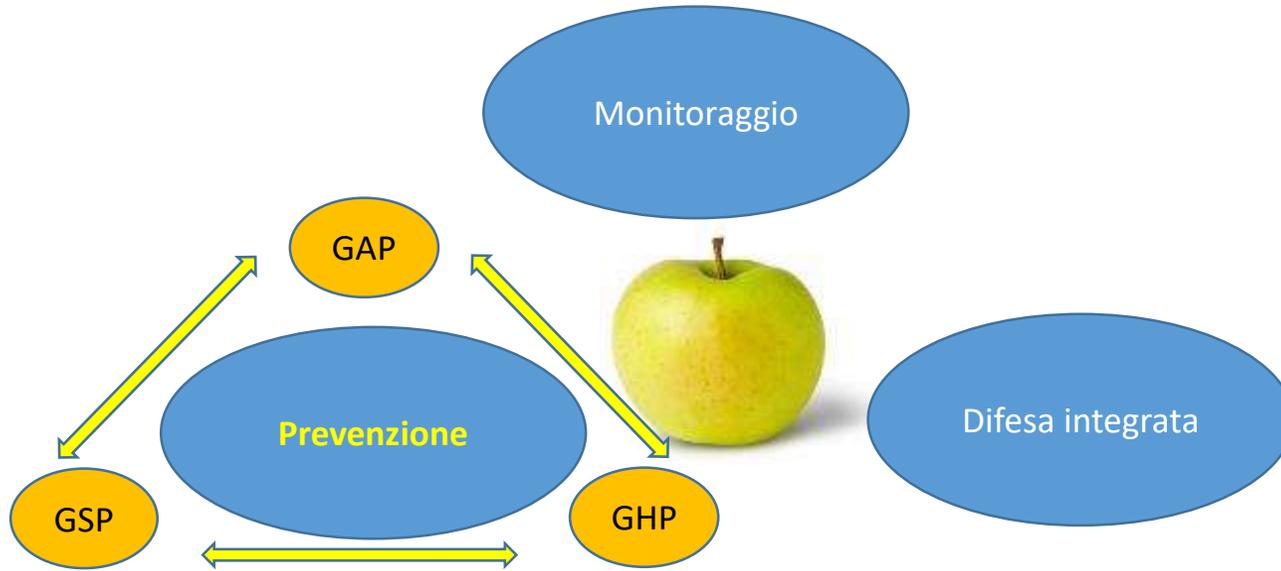


Endofiti



Mele 'Ambrosia'

Gestione delle malattie in post-raccolta



1. Raffreddamento
2. Basse temperature
3. Controllo dell'UR
4. Atmosfera controllata

Atmosfere controllate e atmosfera dinamica



CA: O₂ maggiore dell'1%

ULO: O₂ minore dell'1% (alterazione aroma e rischio fermentazione alcolica)

ILOS: initial low oxygen stress

RLOS: repeated low oxygen stress

DCA: atmosfera monitorata da sensori:

- Sensore della fluorescenza della clorofilla (altamente sensibile a O₂ stress)
- Sensore del quoziente della respirazione (RQ=CO₂ prodotta/O₂ consumata)
- Sensore dell'etanolo (fermentazione, deve essere minore 1 ppm)

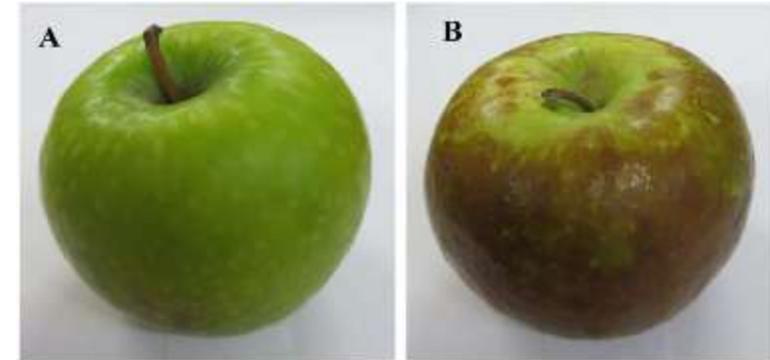


Fig. 1. Pictures showing 'Granny Smith' apples with no superficial scald (a) and severely scalded (b).

Riduzione riscaldamento superficiale, ma danni da basso ossigeno e alterazioni caratteristiche organolettiche

Effects of dynamic controlled atmospheres on physiological disorders of apples.

Physiological disorder	Effect of treatment on physiological disorders	Cultivar	References
Superficial scald	Unlike CA, DCA stored fruit had a complete scald control after 9 months of storage	Cortland	DeLong et al. (2007)
	After 6 month storage, scald incidence was completely absent on DCA treated fruit compared to fruit only stored in CA	Granny Smith	Zanella et al. (2005); Bessemans et al. (2016);
	DCA stored fruit had low scald incidence compared to RA stored fruit	Granny Smith	Torres and Hernández (2014); Mditshwa et al. (2017a, 2017b)
Watercore	DCA reduced watercore incidence compared to CA storage	Fuji Suprema	Weber et al. (2017)
Internal browning	DCA was more effective in reducing watercore compared to 1-MCP treated fruit	Gloster	Köpcke (2015)
	DCA significantly reduced internal browning	Braeburn	Lafer (2007)
	DCA significantly reduced internal browning compared to CA or ULO or ULO + ILOS stored fruit	Royal Gala and Galaxy	Thewes et al. (2015)
Coreflush	Internal browning was significantly reduced by storing fruit DCA unlike in CA (1.2 kPa O ₂ ; 2 kPa CO ₂) storage.	Royal Gala	Weber et al. (2015)
	DCA increased internal browning	Elstar Elswout	Köpcke (2015)
	1-MCP treated fruit had lower incidence of coreflush compared to DCA stored fruit	Granny Smith	Zanella (2003)
	Compared to 1-MCP, DCA stored fruit had lower coreflush incidence	Elstar Elswout	Köpcke (2015)

Mditshwa et al. 2018

Sistemi di rilascio controllato per gas e VOCs



Sistemi di rilascio controllato per composti attivi, come sostanze antimicrobiche, antiossidanti e regolatori della crescita.

Biossido di zolfo (SO_2) e biossido di cloro (ClO_2) per inibire crescita funghi

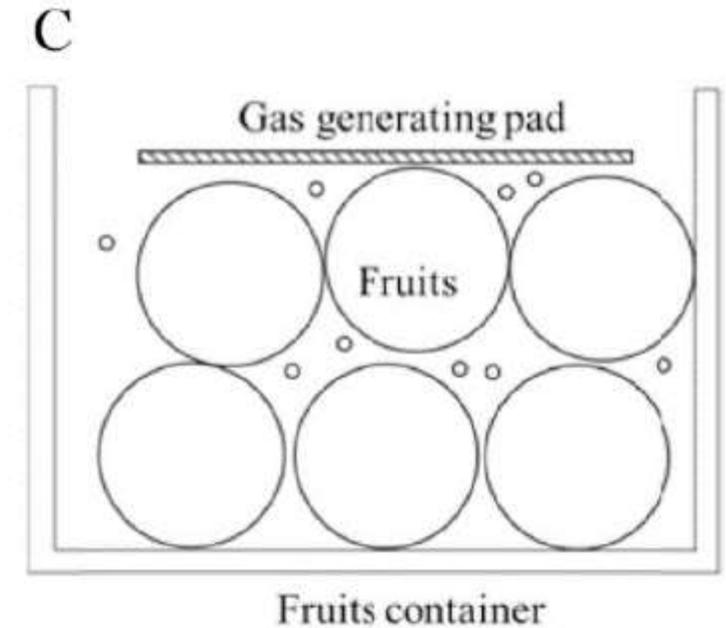
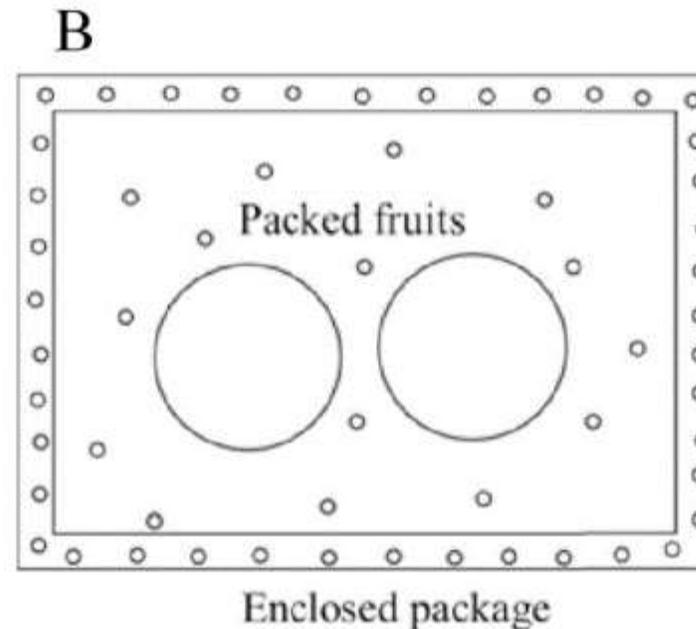
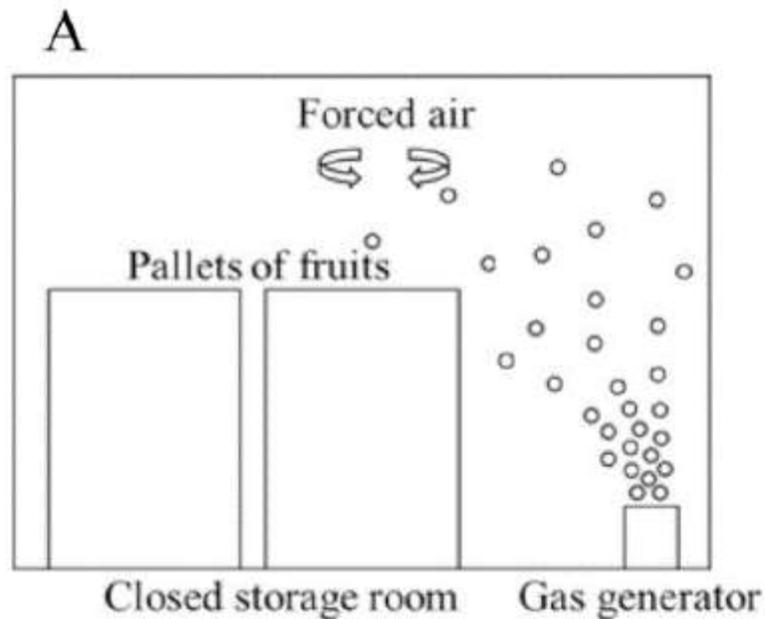
AITC: allilisotiocianato

1-MCP e etilene per manipolare la maturazione

Generatore di gas in cella di conservazione

Imballaggio chiuso

Pannello generante in contenitori per la frutta



○ Active compounds

Chen et al. 2020

Sistemi di rilascio controllato per gas e VOCs



Structural property of selected solid matrices and their matching active compounds.

Solid matrix	Chemical structure ^a	Property of solid matrix	Active compounds
α -cyclodextrin	<p>Chemical structure Simulated model n=6</p>	Internal cavity diameter 4.5 Å	1-MCP Ethylene AITC ClO ₂
β -cyclodextrin	<p>Chemical structure Simulated model n=7</p>	Internal cavity diameter 6.2 Å	Garlic oil AITC Thyme
Mg formate MOF	<p>Interconnected MgO₆ octahedra</p>	Pore size 3.5 Å	1-MCP
Cucurbit[6]uril	<p>Chemical structure Simulated model n=6</p>	Internal cavity diameter 3.9 Å	
HKUST-1 MOF (Cu 1,3,5-Benzene tricarboxylic acid)	<p>Two-dimensional view Teal: Cu, red: O, gray: C Cu-paddlewheel SBUs in black dashed circle and large and small pores shown in green and yellow spheres</p>	Pore size 6 and 9 Å	AITC

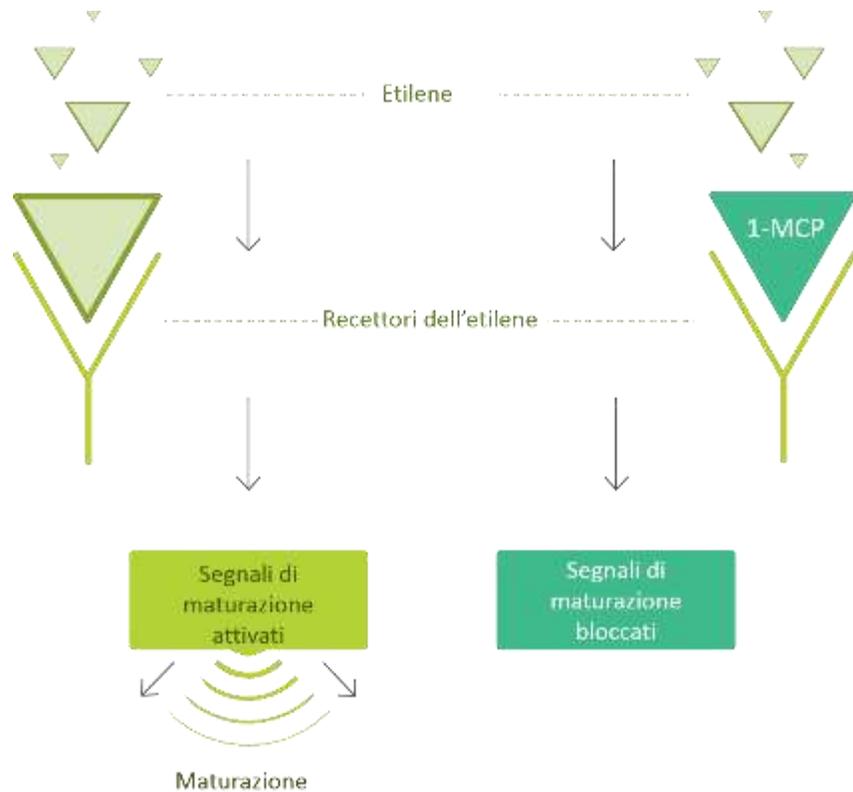
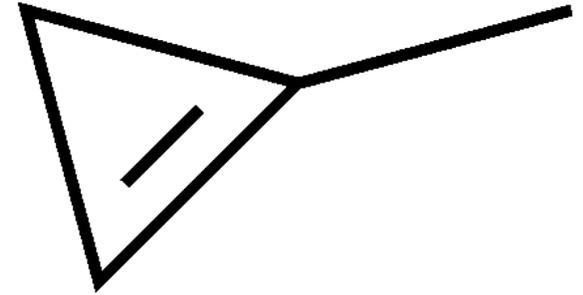
P.A.	Prodotto commerciale	Forma
1-MCP	SmartFresh	Polvere e tavolette basate su alfa-ciclodestrine
ClO ₂	Microsphere	Film LDPE contenente clorito di Na
ClO ₂	FruitGuard	Polvere per trattamento gassoso
SO ₂	DeccoGrapage	Pannello generante
Etilene	Easy-Ripe	Generatore

1-MCP

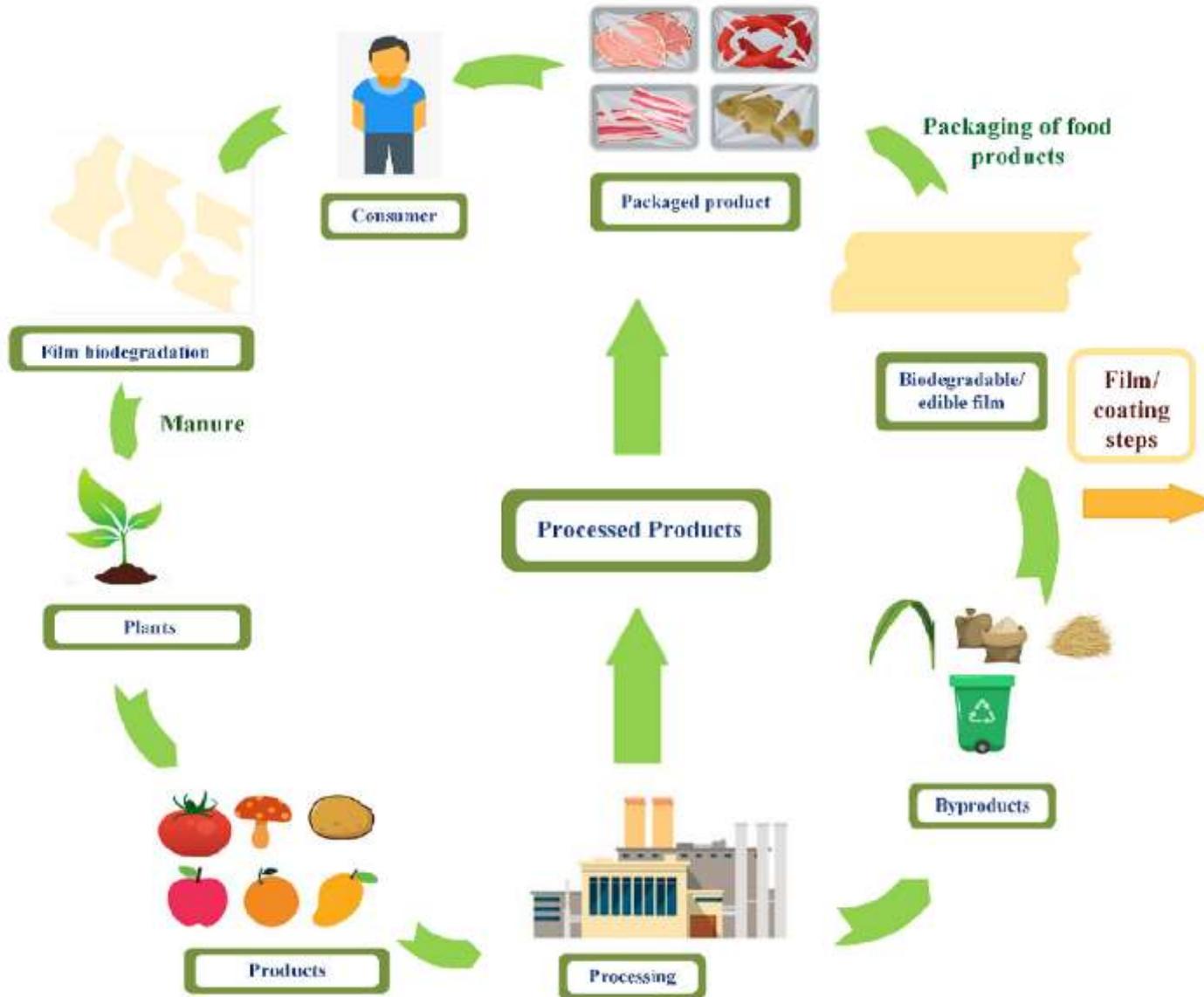


1-metilciclopropene, simile all'etilene
Smart Fresh, lanciato da Agrofresh
USA dal 2002, Italia dal 2005

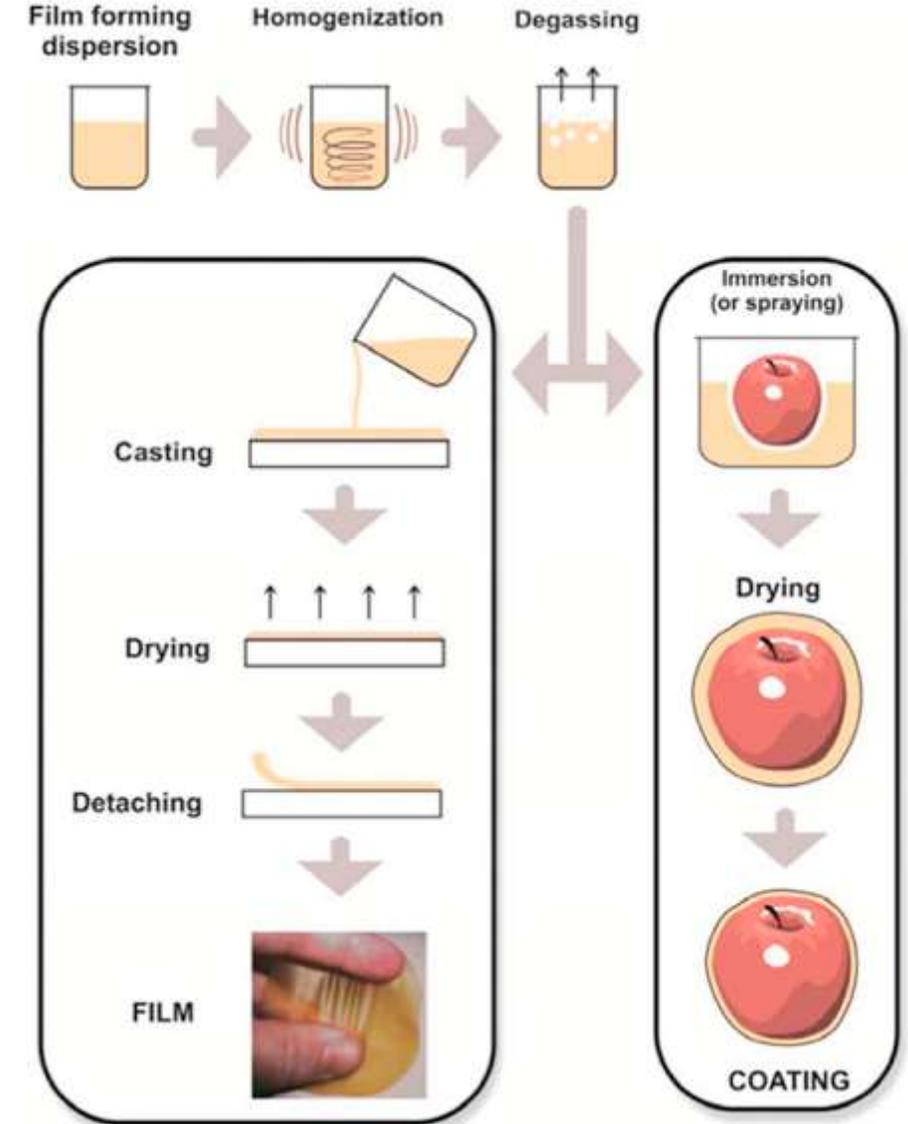
Registrato per frutta invernale: mele, kiwi, pere, kaki e susine
**Dal 2020 anche per frutta estiva:
albicocche, pesche/nettarine e meloni.**



Rivestimenti edibili e film biodegradabili

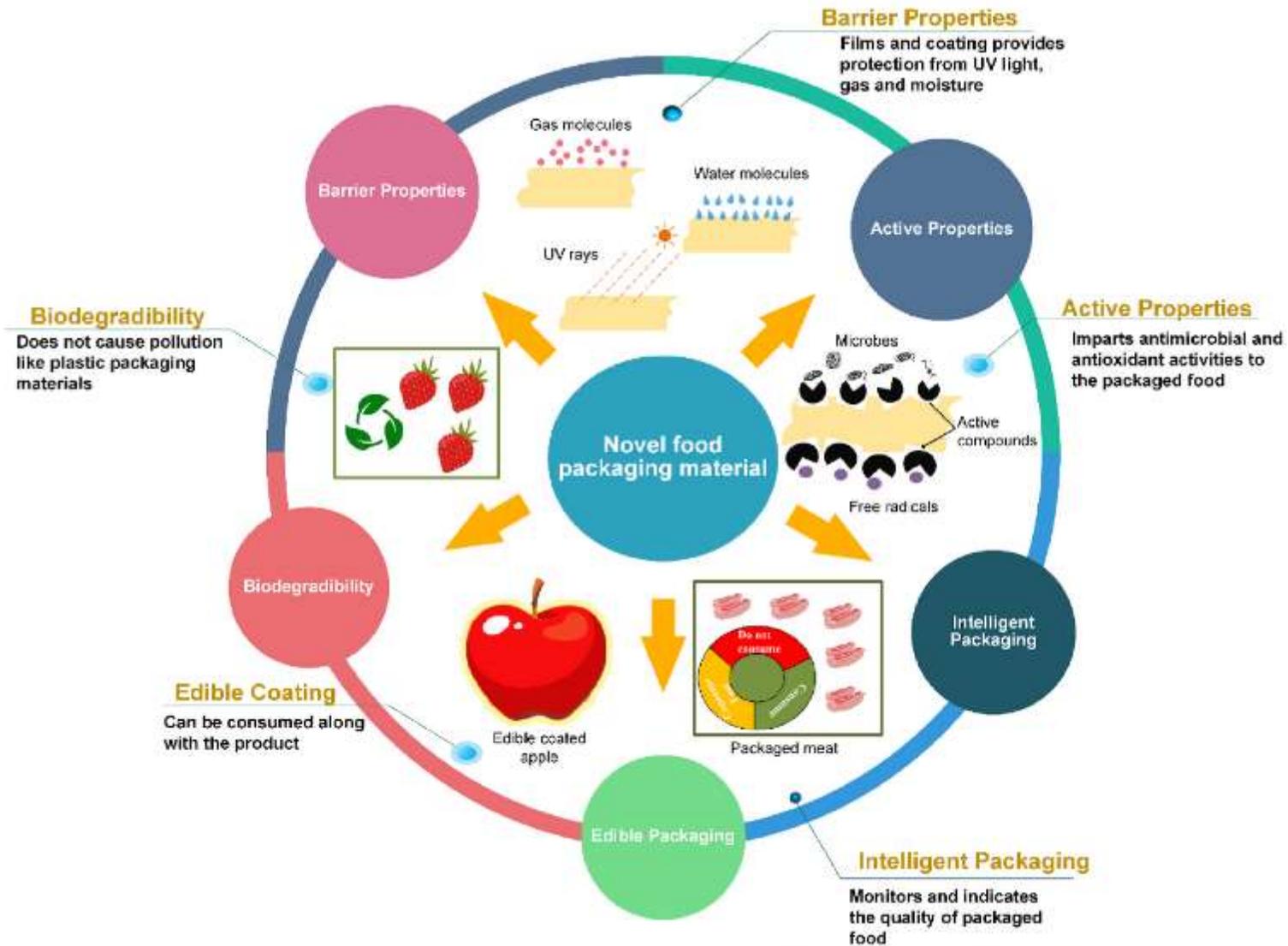


Santhosh et al. 2021



Mohamed et al 2020

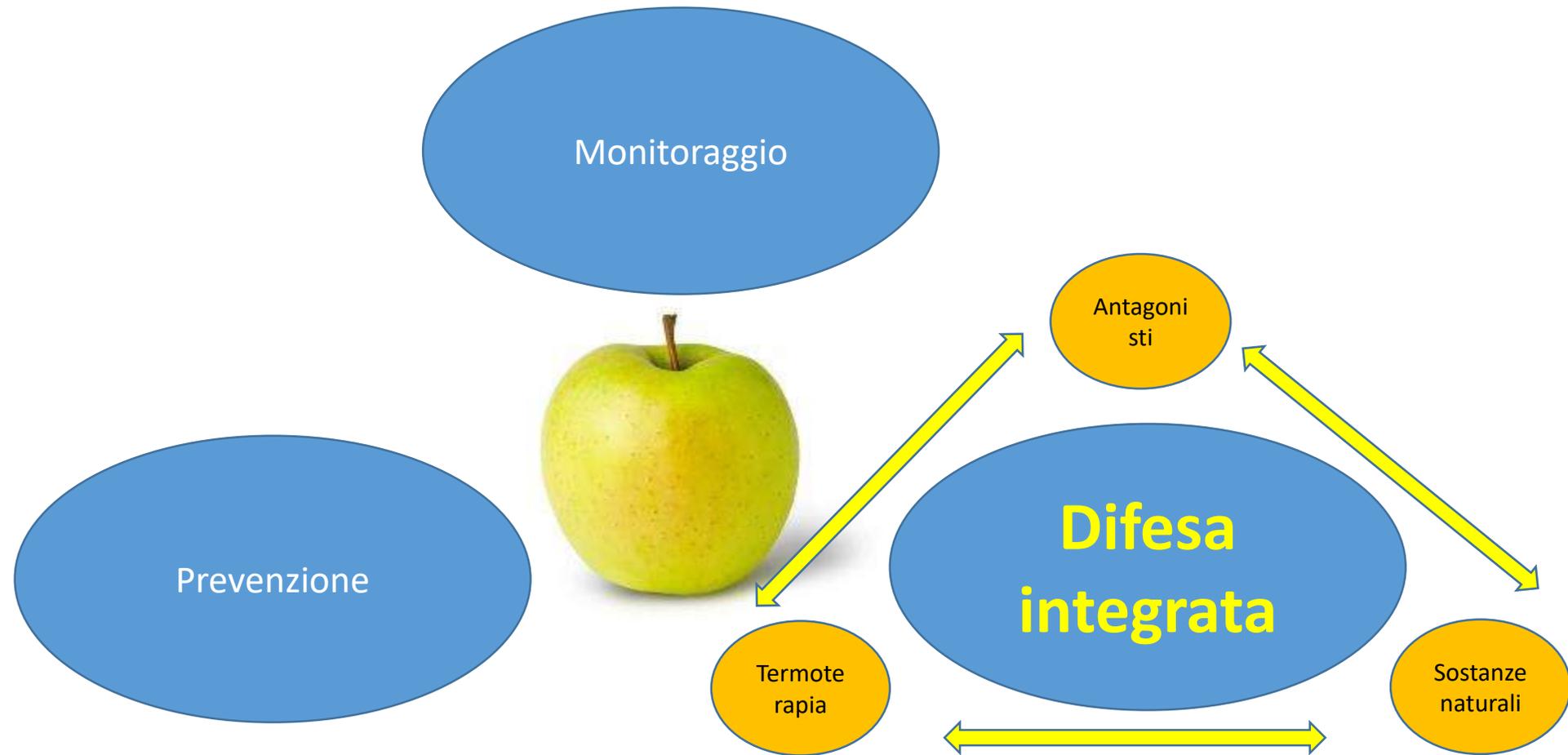
Imballaggi funzionalizzati



Oli essenziali
Eugenolo
Cinnamaldeide
Acido ferulico
Acido gallico
Ossido di zinco
Biossido di titanio

Fig. 3. Functions of novel food packaging materials. Adapted from (Kumar, Mukherjee, & Dutta, 2020).

Gestione delle malattie in post-raccolta



Agrofarmaci per il post-raccolta



Pesticides	Activity	Fruit & Vegetable	LMR
Thiabendazole	Fungicida	Agrumi, pomacee	5 ppm
Imazalil	Fungicida	Agrumi, pomacee	5 ppm agrumi 2 ppm pomace
Fenexamid	Fungicida	Actinidia, drupacee	5 ppm
Fludioxonil	Fungicida	Actinidia, drupacee, pomacee, agrumi	10 ppm agrumi 5 ppm actinida 0.5 ppm susine
Pyrimethanil (+ olio di chiodi di garofano)	Fungicida	Pomacee, drupacee, agrumi	10 ppm agrumi 5 ppm pomace
Sulphur dioxide	Fungicida	Uva	10 ppm
Sodium metabisulfite	Fungicida	Uva	10 ppm
Potassium sorbate	Fungicida/ Additivo	Agrumi	20 ppm
Eugenol	Antiriscaldo/ Additivo	Tutti	Non stabilito
1-Methylcyclopropene (1-MCP)	Regolatore di crescita /Antiriscaldo	Pomacee, susine, actinidia, kaki, meloni, pomodori	Non stabilito
Mint oil	Antigerogliamento	Patate, cipolle, aglio	3 ppm

Penicillium, Botrytis
Penicillium

Botrytis

Monilinia, Botrytis,
Rhizopus, Penicillium

Penicillium, Botrytis

Penicillium, Geotrichum

✓ Salute umana

✓ Inquinamento ambientale

✓ Ceppi di patogeni resistenti

✓ Mancanza di reregistrazione



Il quadro legislativo relativo agli agrofarmaci

Regolamento 1107/2009: registrazione di agrofarmaci

Direttiva 2009/128/CE: uso sostenibile degli agrofarmaci, attuata dal Decreto legislativo 150/2012

Difesa integrata (IPM) obbligatoria dal 2014

Regolamento (CE) 834/2007: agricoltura biologica

Regolamento 396/2005 entrato in vigore il 1° settembre 2008:
stabilisce i **limiti massimi di residui (LMR)** di prodotti fitosanitari

Direttiva 2006/125/CE sul baby-food

Residuo zero: quando i residui di prodotti fitosanitari di sintesi chimica sono inferiori o uguali a 0,01 mg/kg (10 ppb), che è il limite di quantificazione analitica per la maggior parte degli agrofarmaci.



'European Green Deal', dicembre 2019,
La strategia 'Farm to Fork' per sviluppare sistemi agroalimentari sostenibili, propone una riduzione del 50% dell'uso di agrofarmaci entro il 2030.



La termoterapia: funzionamento



Acqua o aria calda
Temperatura > 40°C (45-60°C)
Tempo: 1-60 minuti

Effetti

pastorizzazione

induzione di resistenza:

- aumento lignina nei tessuti,
- HSP,
- PRP,
- fitoalessine.

- Mantenimento delle caratteristiche organolettiche
- Facilità di impiego
- Mancanza di residui
- Mancanza di tossicità
- Integrazione con altre strategie

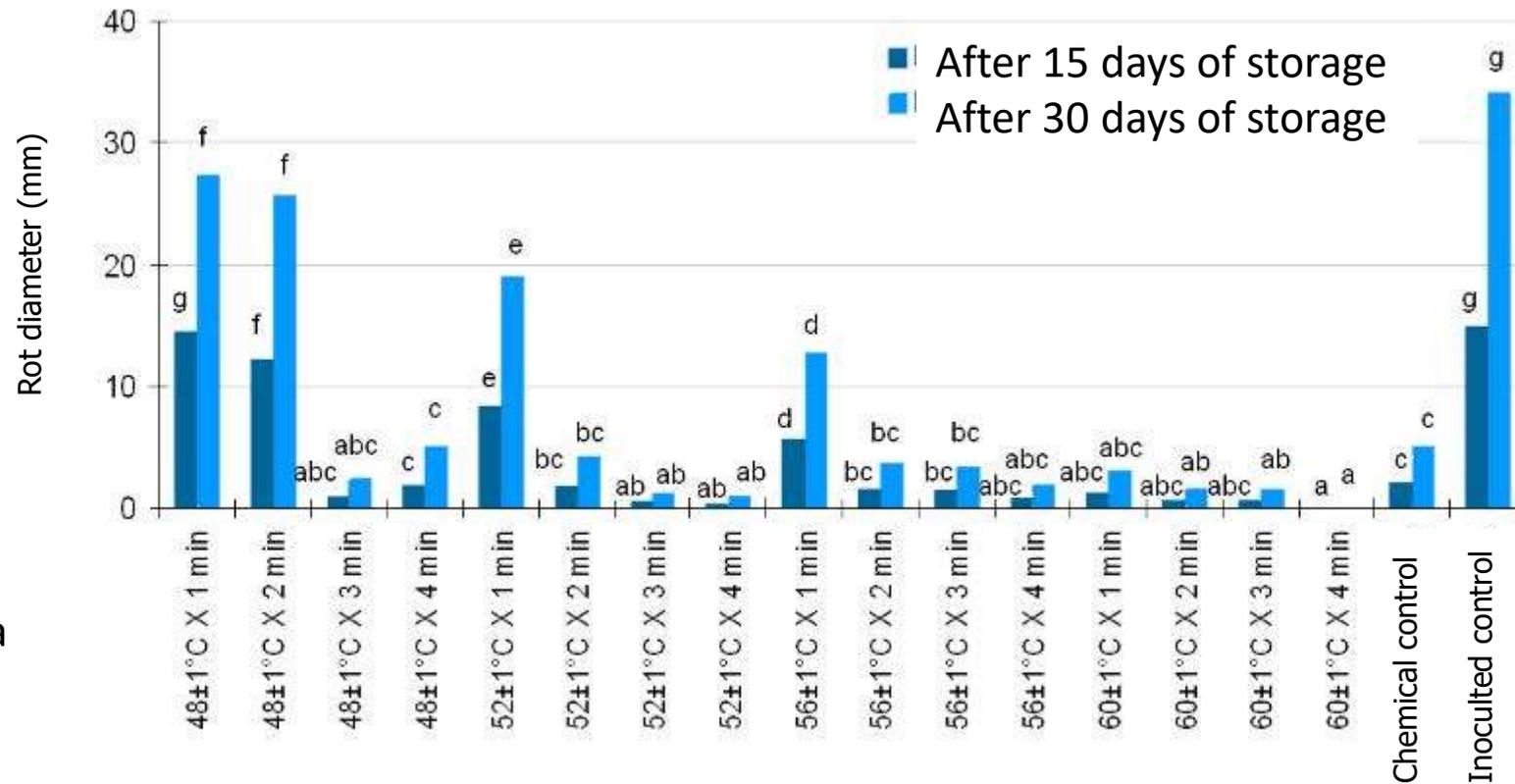


Termoterapia su susine



Effetto di immersioni con acqua calda contro *Monilinia laxa* su susine cv Angeleno conservate a 1°C per 30 giorni

Durata e temperatura del trattamento sono fattori chiave.



Max:
48-52°C per 3 min
Assenza di fitotossicità

Danni da fitotossicità

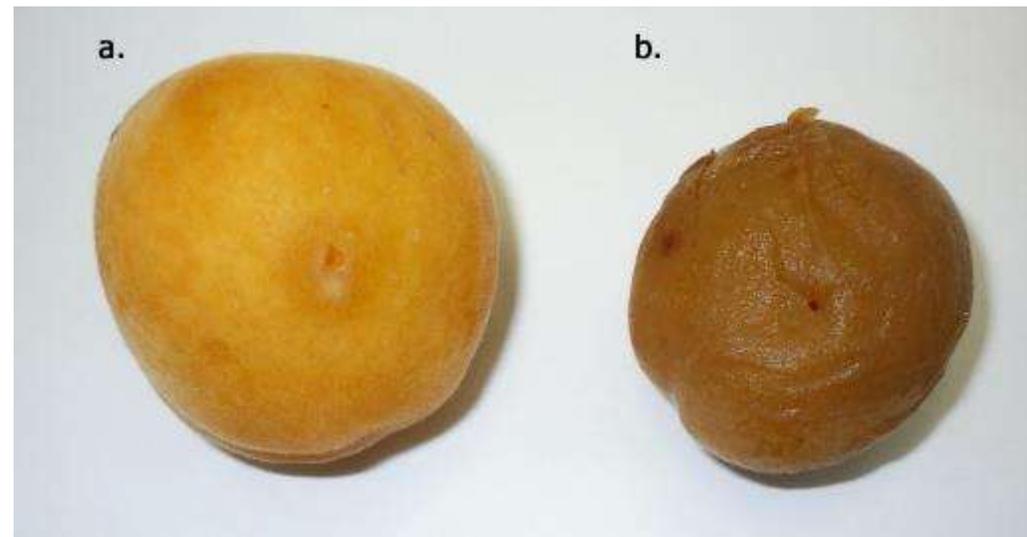


Danni da aria calda



Danni da acqua calda

Albicocche cv Ninfa inoculate con *Monilinia laxa*.



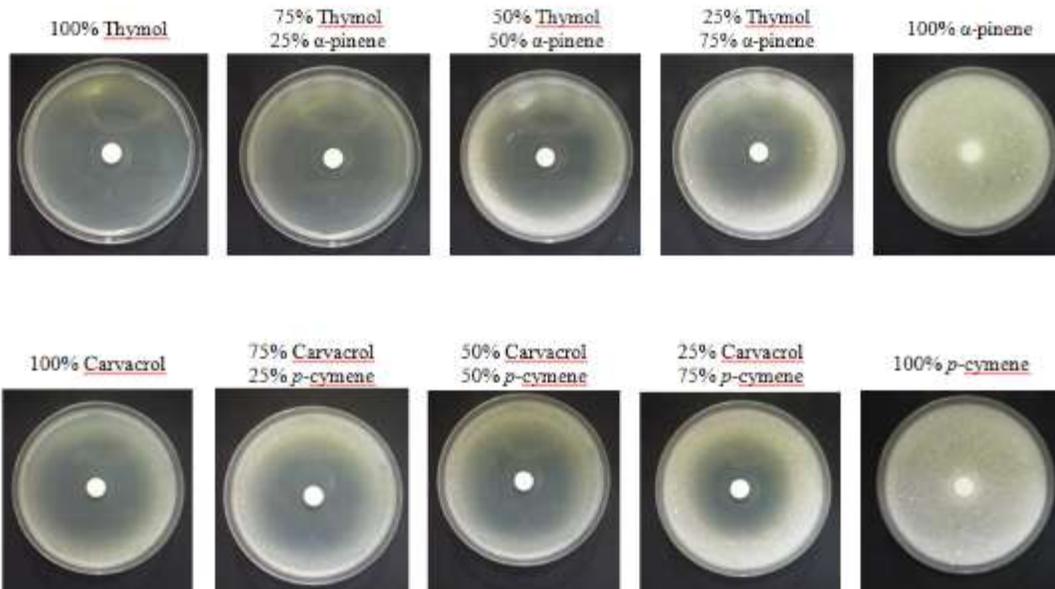
- a. Frutti immersi in acqua a $48 \pm 1^\circ\text{C}$ per 3 minuti.
- b. Frutti immersi in acqua a $56 \pm 1^\circ\text{C}$ per 3 minuti.

Uso di sostanze naturali



Oli essenziali presenti in 50 famiglie botaniche
Ordini: Lamiales, Asterales, Rutales

Fiori, foglie, radici, legno, rizoma, frutti, corteccia, semi
Estrazione da materiale vegetale aromatico, ricco in essenze.



Composti	Santoreggia (%)	Timo (%)
pinene <alfa>	9.35	19.78
camphene	0.48	0.42
pinene <beta>	0.59	0.52
myrcene	0.7	0.04
carene <delta 2>	0.31	0.32
cymene <para>	16.05	3.62
Limonene	1.48	0.92
Eucalyptol	3.2	1.03
Terpinene <gamma>	-	0.63
Linalool	3.51	8.33
Camphor	0.2	-
bornylacetate	0.64	-
thymol	14.2	53.7
carvacrol	45.14	3.1
copaene <alfa>	0.1	-
Caryophyllene <Z>	1.43	2.11
Caryophyllene <E>	-	0.2
selinene <alfa>	1.4	-
caryophyllene oxide	-	0.41
Total identified compounds (%)	98.78	95.13

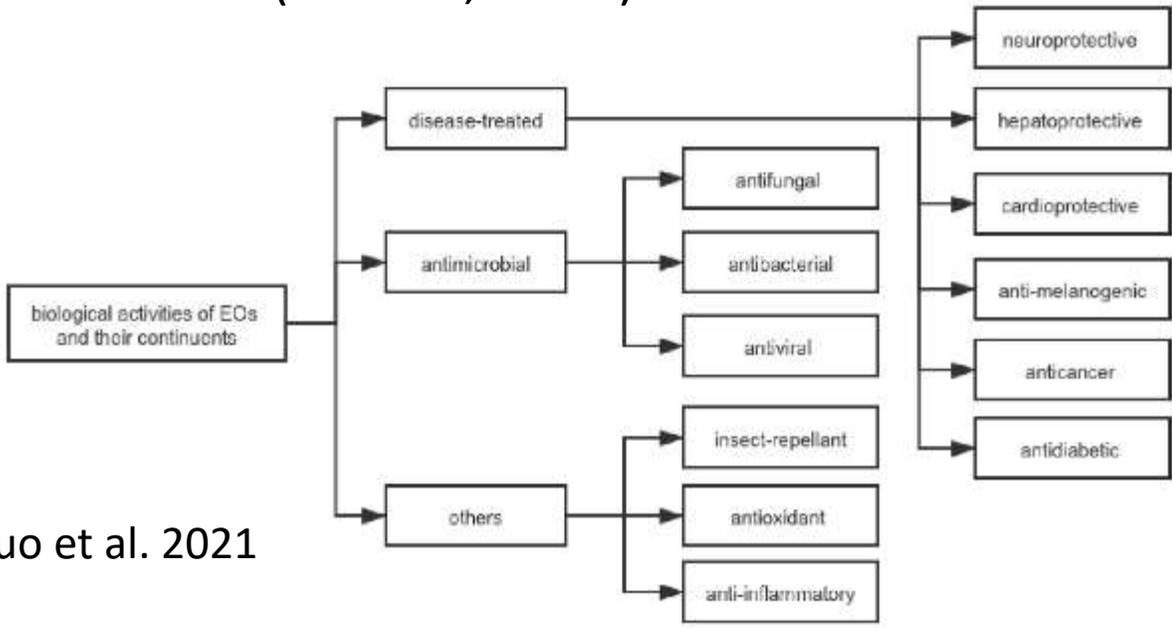
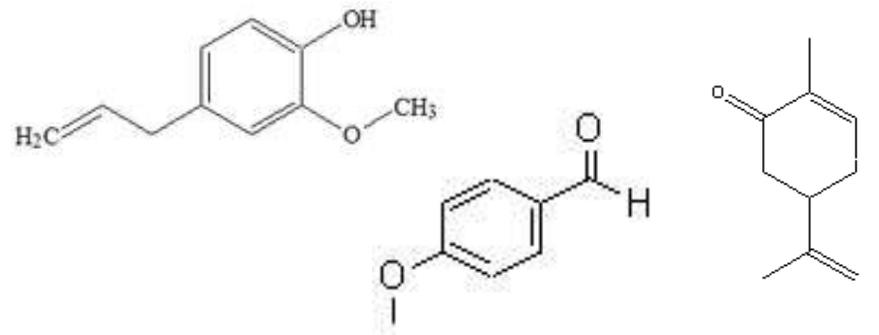
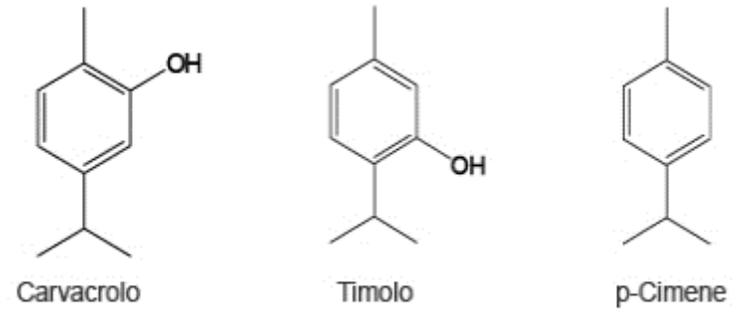
Attività antimicrobica degli oli essenziali



OE: miscele di composti organici volatili

Attività antibiotica e antifungina associate a fenoli monoterprenici

- ☐ timolo (timo)
- ☐ carvacrolo (origano, timo, santoreggia, maggiorana)
- ☐ eugenolo (chiodi di garofano, noce moscata, cannella)
- ☐ *p*-anisaldeide (anice)
- ☐ carvone (cumino, anice)



Guo et al. 2021

Fig. 1. Biological activities of essential oils and their constituents.

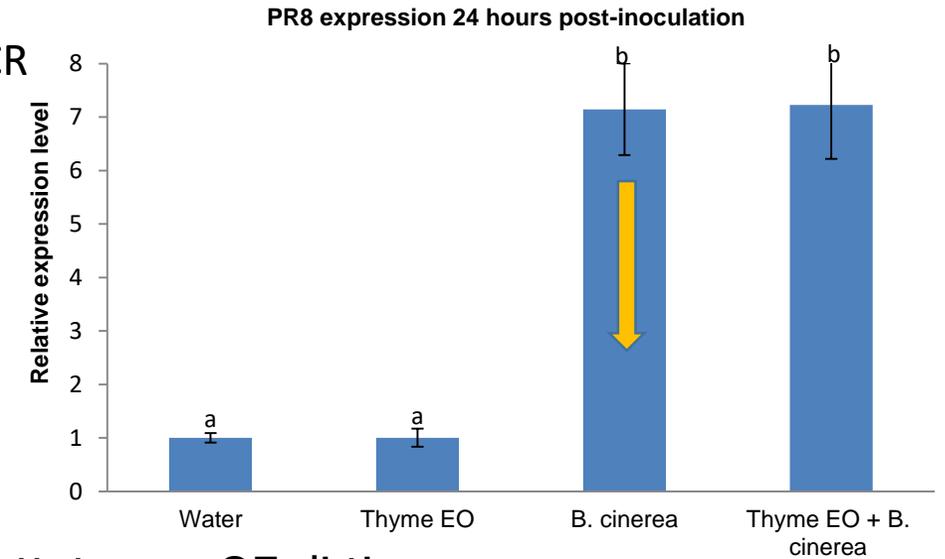
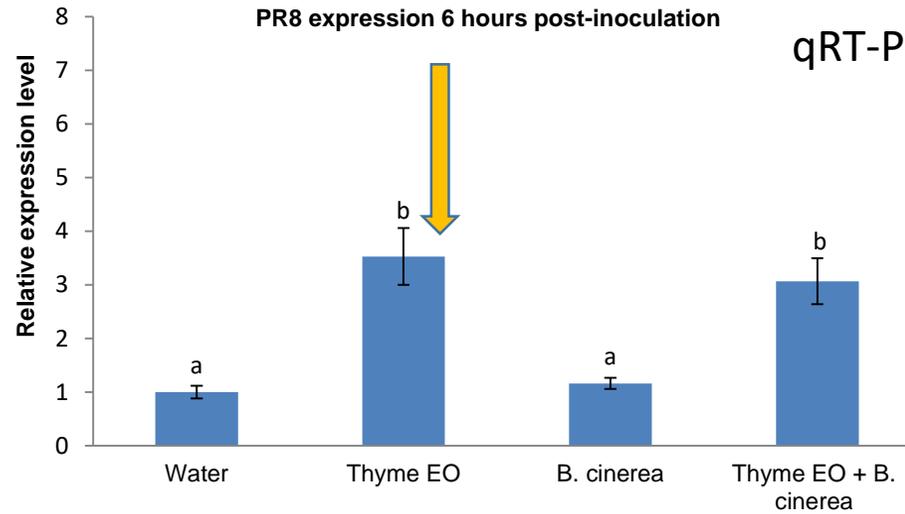
Meccanismo di azione

Entrano nel doppio strato lipidico della membrana cellulari dei batteri e dei mitocondri di funghi.

Batteri: perdita di ioni

Funghi: compromissione della respirazione

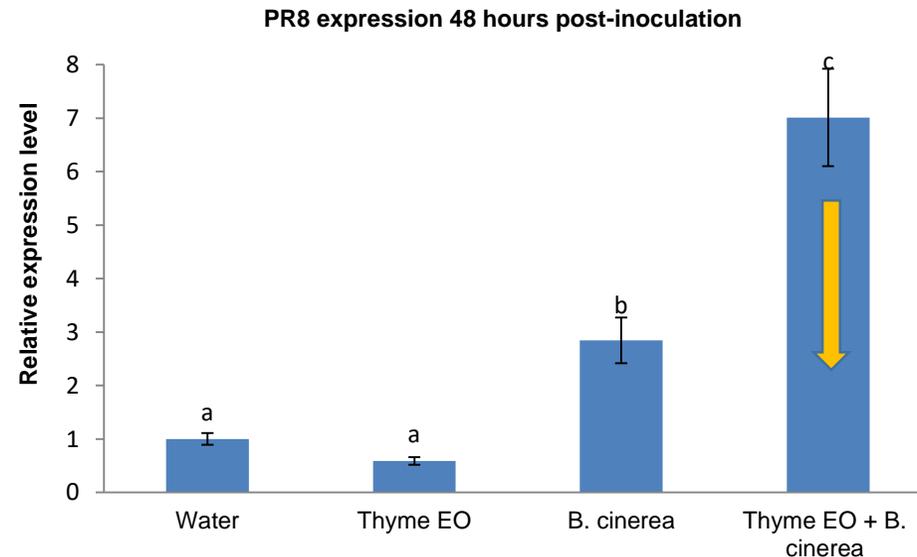
Induzione di resistenza nell'ospite



Il gene PR8 è altamente indotto in mele trattate con OE di timo.
Il timo induce resistenza a *B. cinerea* stimolando le risposte di difesa della mela.

Mele 'Red Fuji'

Banani et al. (2018)

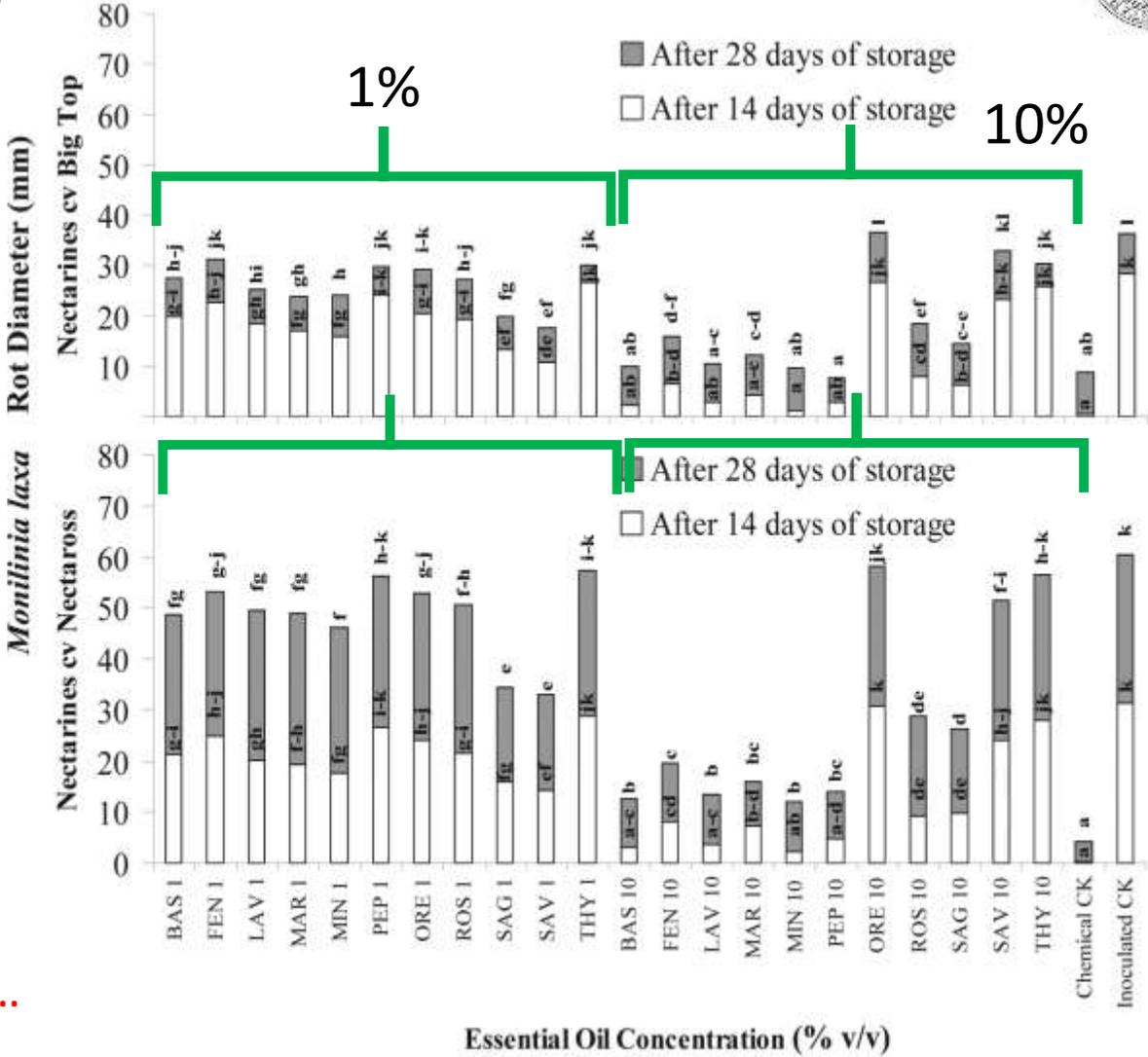


PR8 attivato dal patogeno e dall'antagonista.

Efficacia per irrorazione



Lopez-Reyes *et al.* (2013)



10% più efficace dell'1% ma...

Efficacia contro *Monilinia laxa* su nectarine conservate a 1°C per 28 g. OE applicato per irrorazione all'1% o al 10% (v/v).

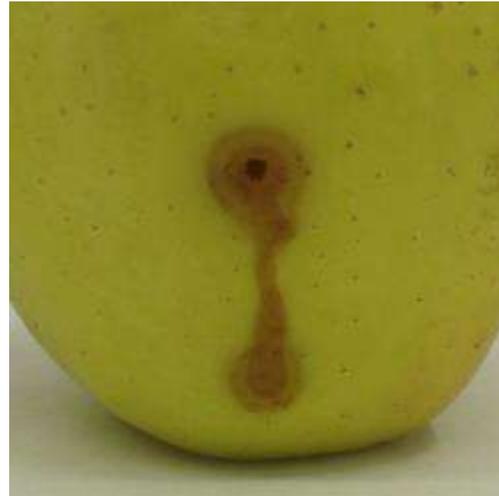


Problematiche: fitotossicità e odori sgradevoli



OE timo al 10% su:

- mele 'Granny Smith'
- mele 'Golden Delicious'
- nettarina 'Big Top'



Soluzioni

- Concentrazioni inferiori
- Integrazione con BCA o termoterapia
- Uso in pre-raccolta
- Fumigazione

Integrazione: termoterapia e oli essenziali



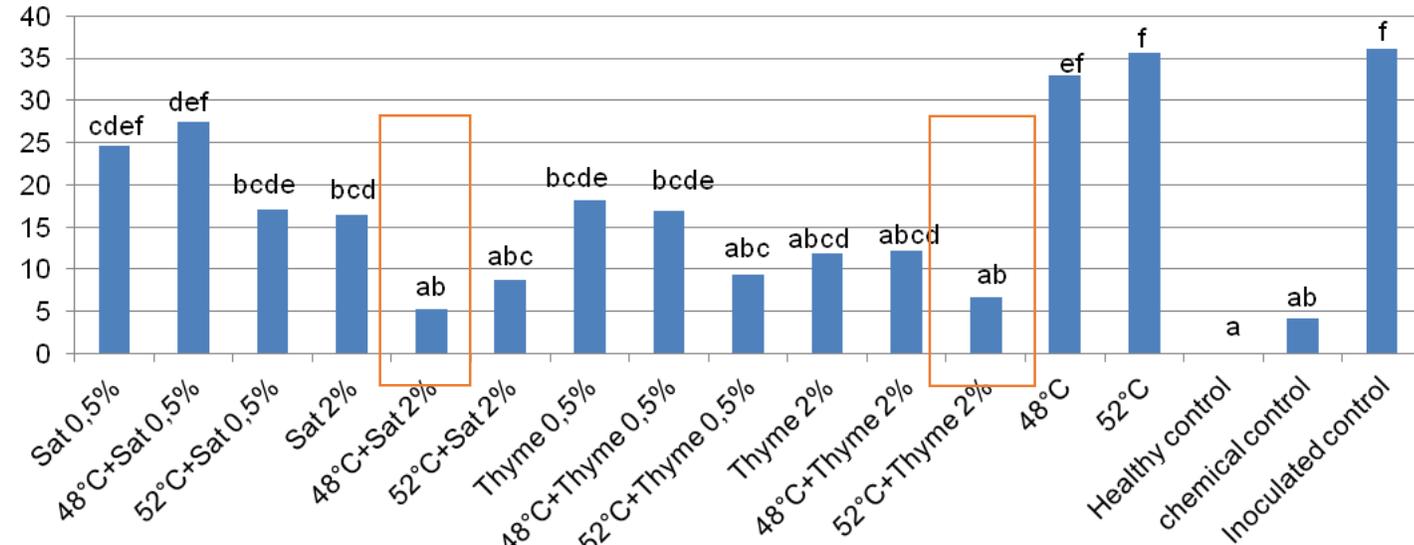
Acqua calda prima di emulsione con OE

Effetto sinergico

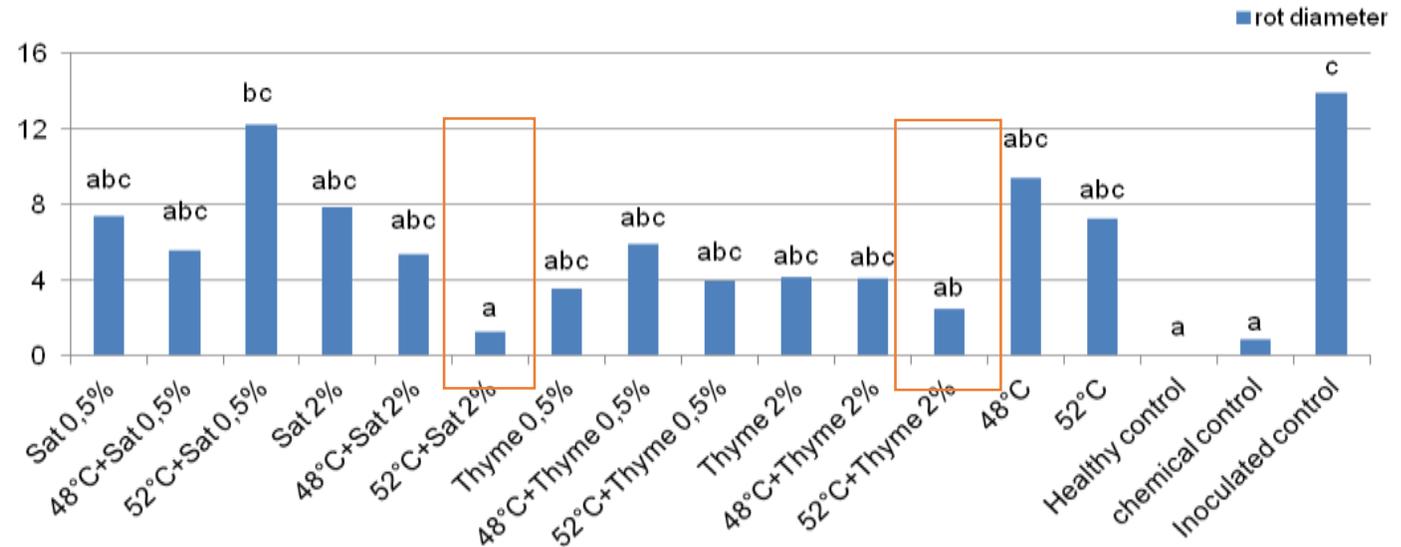


Acqua calda inefficace da sola

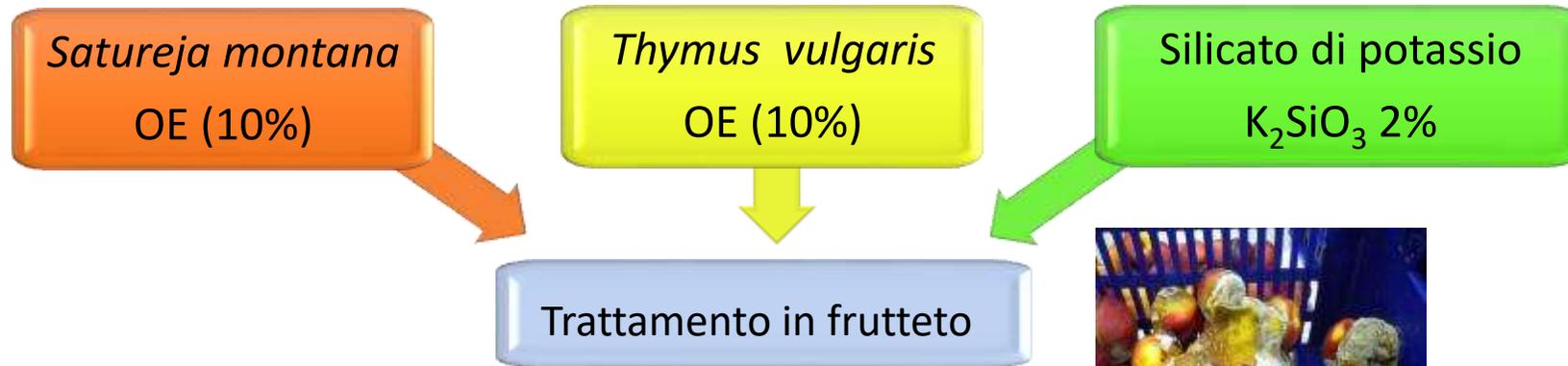
Rot diameter (mm) of *Monilia laxa* (shelf life)



Rot diameter (mm) of *M. fructicola* (shelf life)

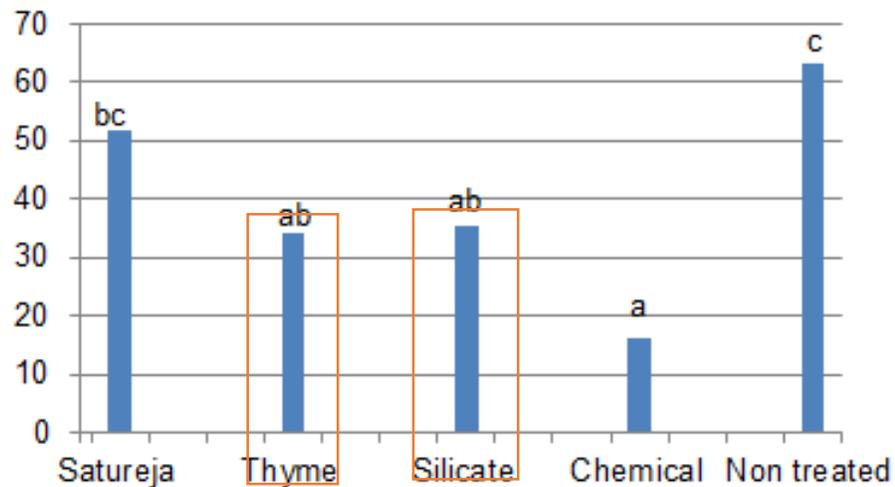


Impiego in pre-raccolta



Marciume bruno delle pesche

Incidence of *Monilia* at 28 days of storage (2nd harvest)



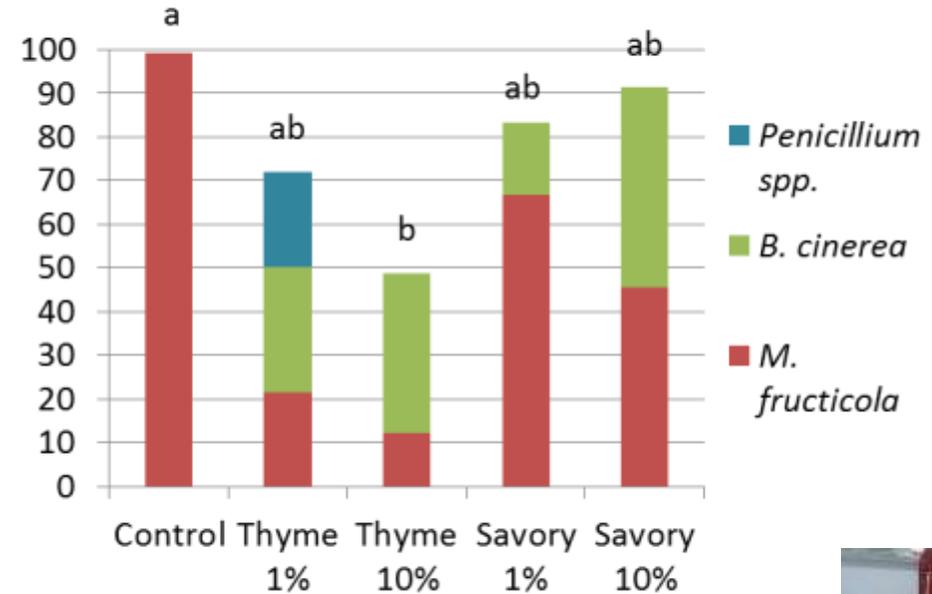
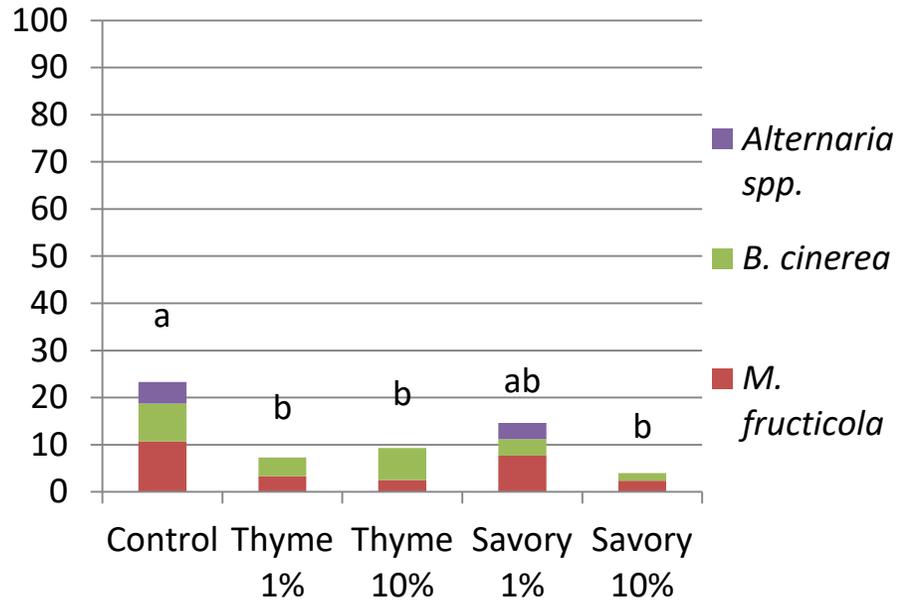
Caratteristiche organolettiche

OE timo ha dimezzato l'incidenza di marciume bruno su pesche senza fitotossicità e odori sgradevoli.

Fumigazione con oli essenziali



Incidenza di marciumi (%) su nettarine Sweet Red (sinistra) e su pesche Vista Rich (destra)



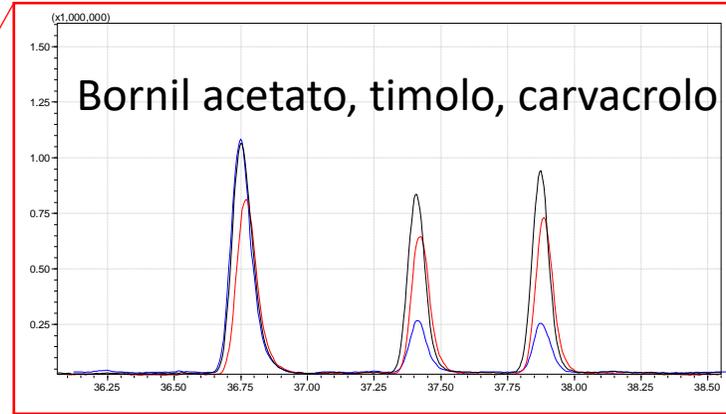
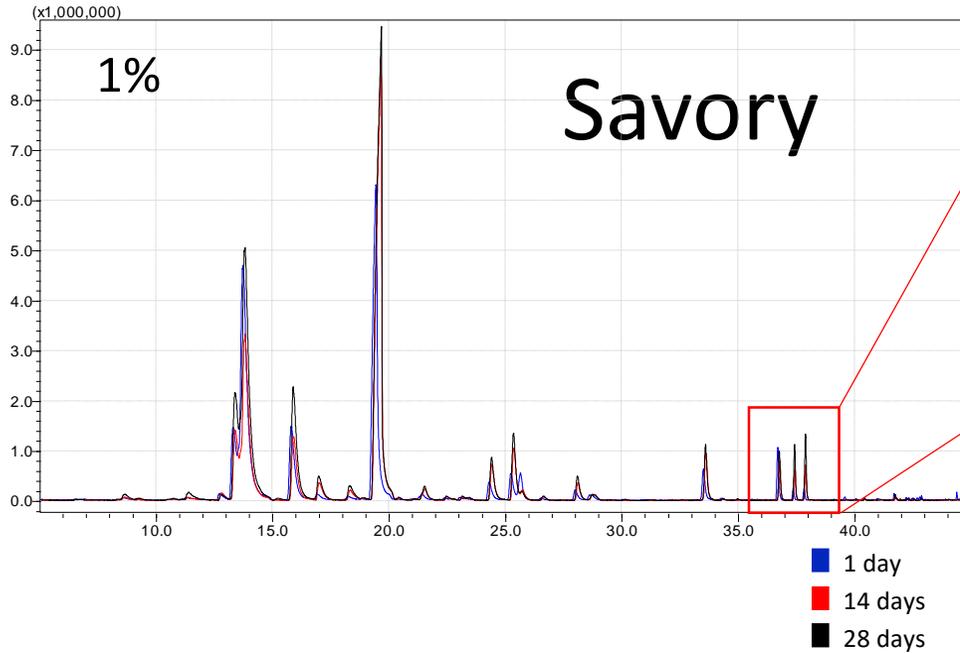
Diffusori a lento rilascio: OE gelificati

Infezione naturale
28 giorni di conservazione

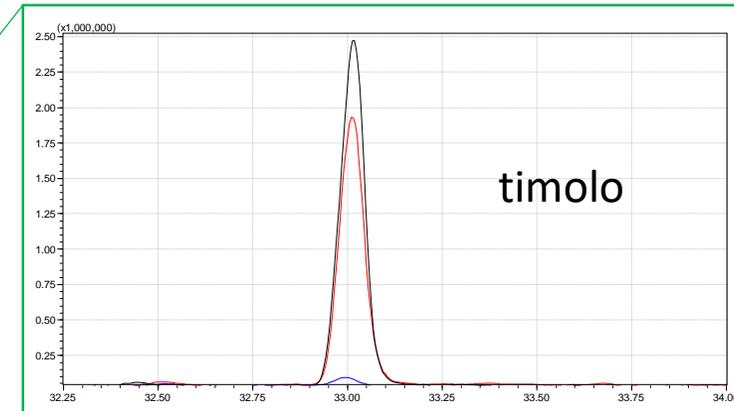
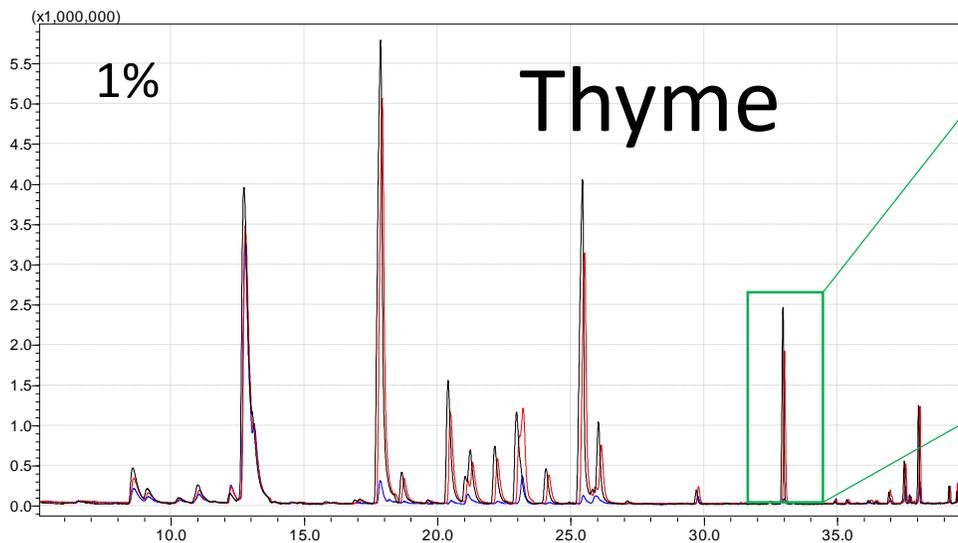




Lento rilascio di sostanze antimicrobiche



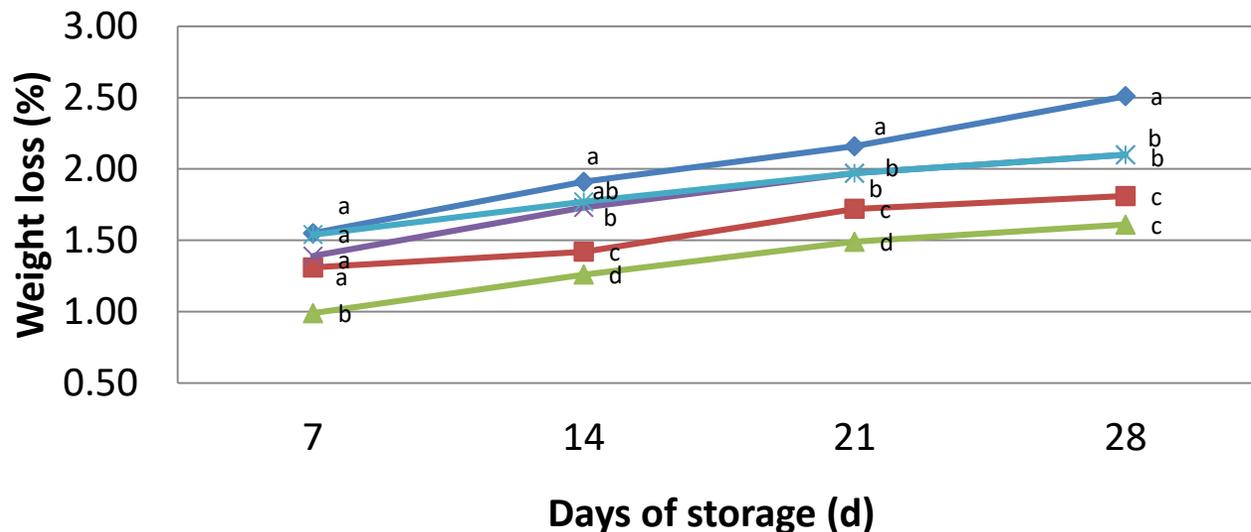
La concentrazione in sostanze antimicrobiche cresce nell'atmosfera durante la conservazione.





Benefici della biofumigazione con oli essenziali

OE possono aumentare la durata commerciale dei frutti.

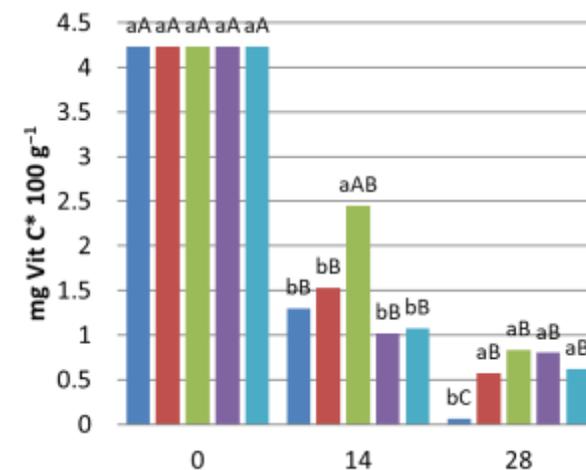
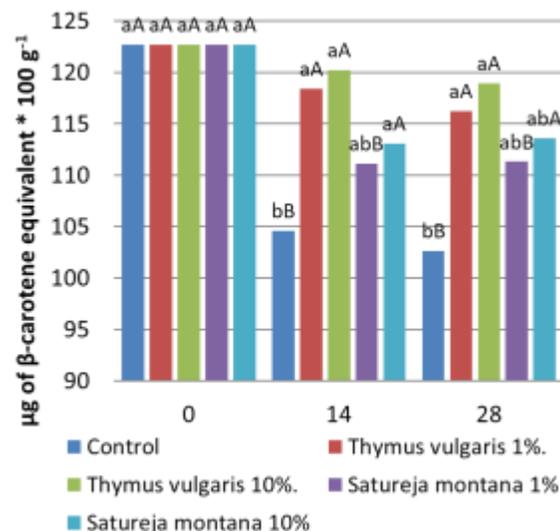


- Control
- Thymus vulgaris 1%
- Thymus vulgaris 10%
- Satureja montana 1%
- Satureja montana 10%

Ridotta perdita in carotenoidi e in acido ascorbico.
Attività antiossidante e di eliminazione di radicali liberi.

Minore perdita di peso in pesche Vista Rich durante la conservazione.

Rivestimento sulla superficie dei frutti che reduce la traspirazione, a causa della chiusura degli stomi.

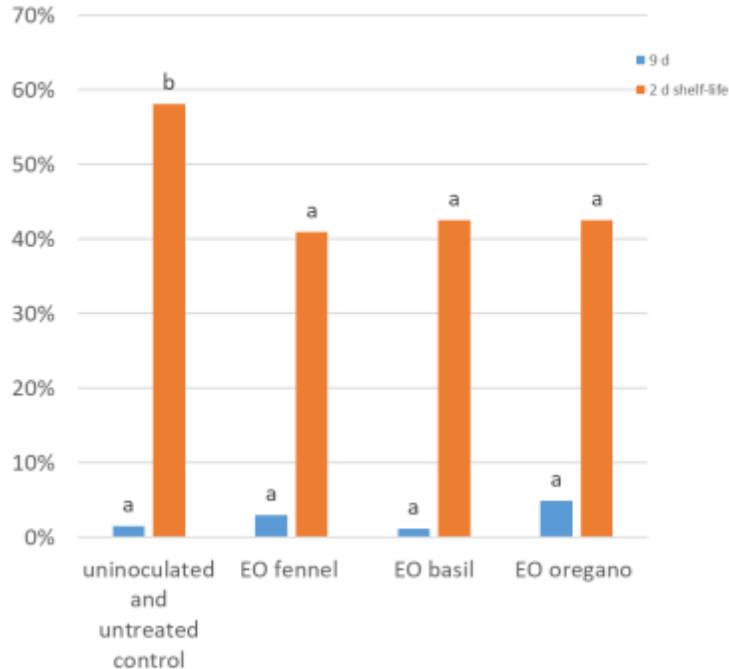


Biofumigazione con oli essenziali

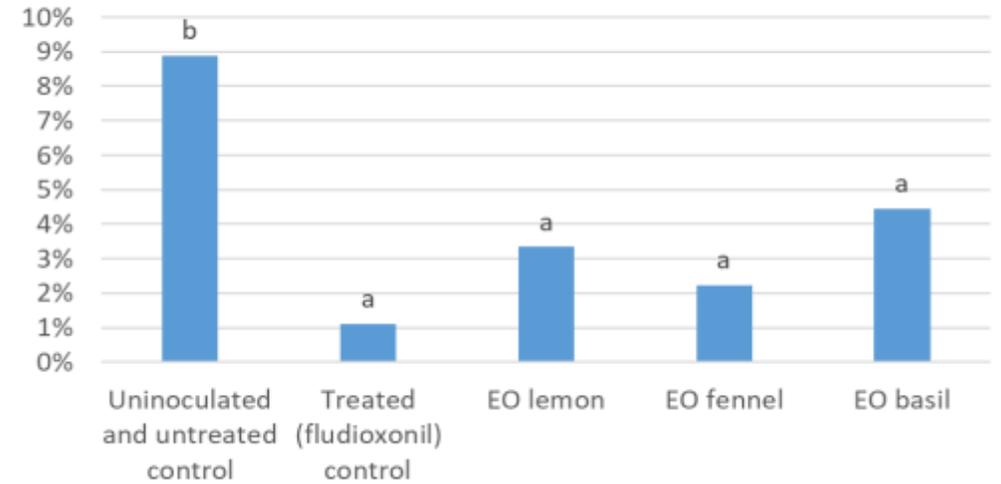


Fragole 'Laetitia'
OE al 5%

Incidence of rot (%)

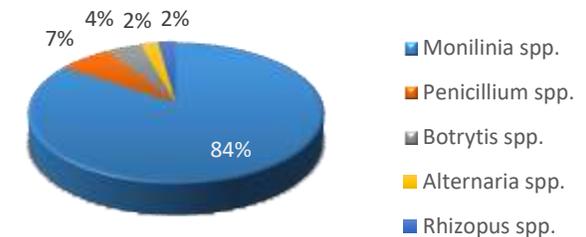


Incidence of rots (%) on nectarines after 28 days of storage



Nettarine 'Big Top' - OE al 2%

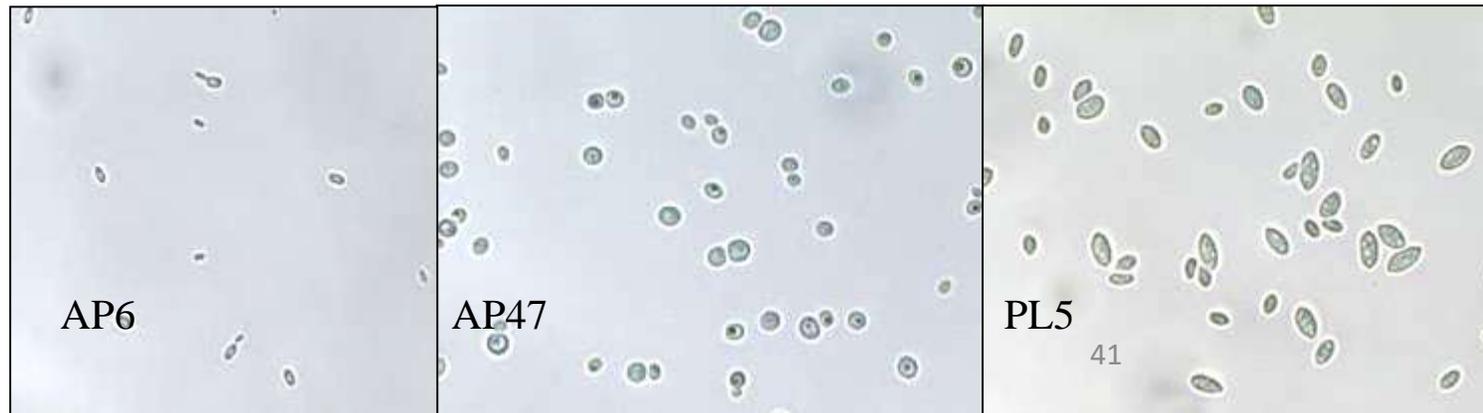
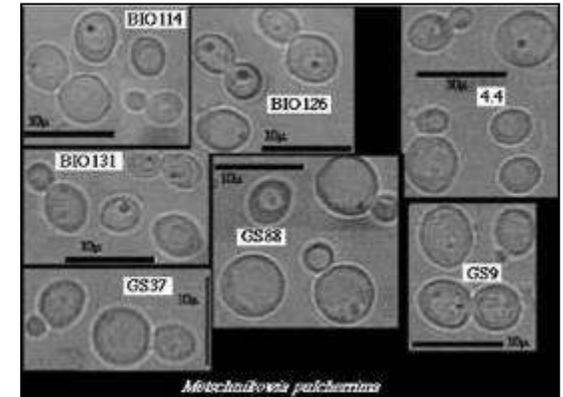
Senza inoculazione





Lieviti

- Tolleranti a condizioni estreme (bassa T, essiccazione, ampie variazioni di UR, basso ossigeno, variazioni di pH, radiazione UV)
- Adattati al microambiente del frutto (elevata [zucchero], elevata pressione osmotica, basso pH)
- Prodotti in elevate quantità in fermentatori su substrati economici
- Non producono allergeni o micotossine
- Semplici richieste nutrizionali per colonizzare la superficie dell'ospite per lunghi periodi



Biofungicidi per il post-raccolta



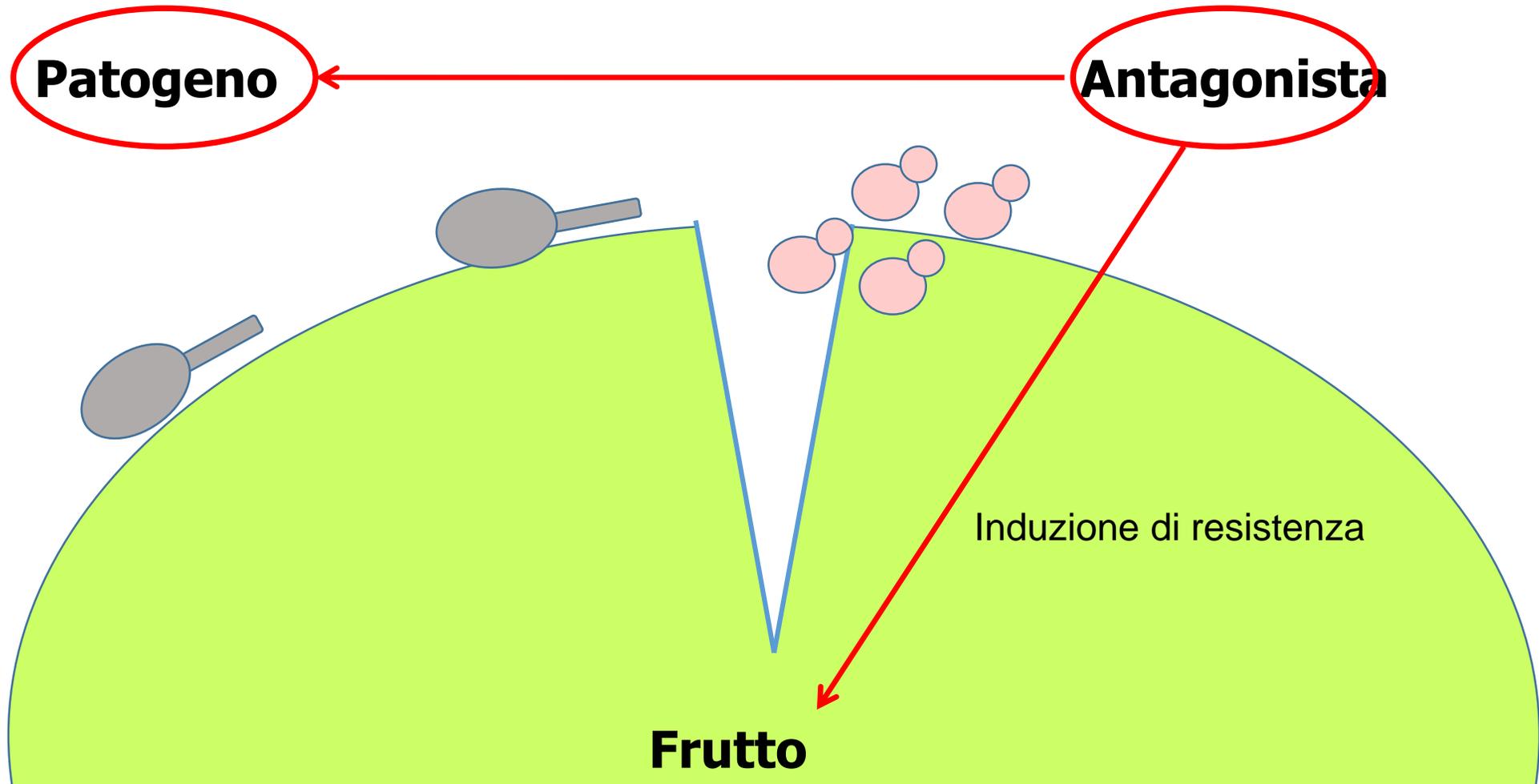
Microrganismo	Formulato commerciale	Attività nei confronti di	Colture o prodotti
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Aureo Shield, Botector, Blossom Protect	<i>Penicillium, Botrytis, Monilinia</i>	Agrumi, vite, fragola, pomodoro, melanzana, melo, drupacee (campo)
<i>Candida oleophila</i>	Nexy	<i>Botrytis, Penicillium</i>	pomacee
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Noli	<i>Botrytis, Monilinia</i>	vite, drupacee, fragola, piccolo frutti (campo)
<i>Pseudomonas syringae</i>	Biosave*	<i>Penicillium, Botrytis, Mucor</i>	pomacee, agrumi, ciliegia, patata, patata dolce



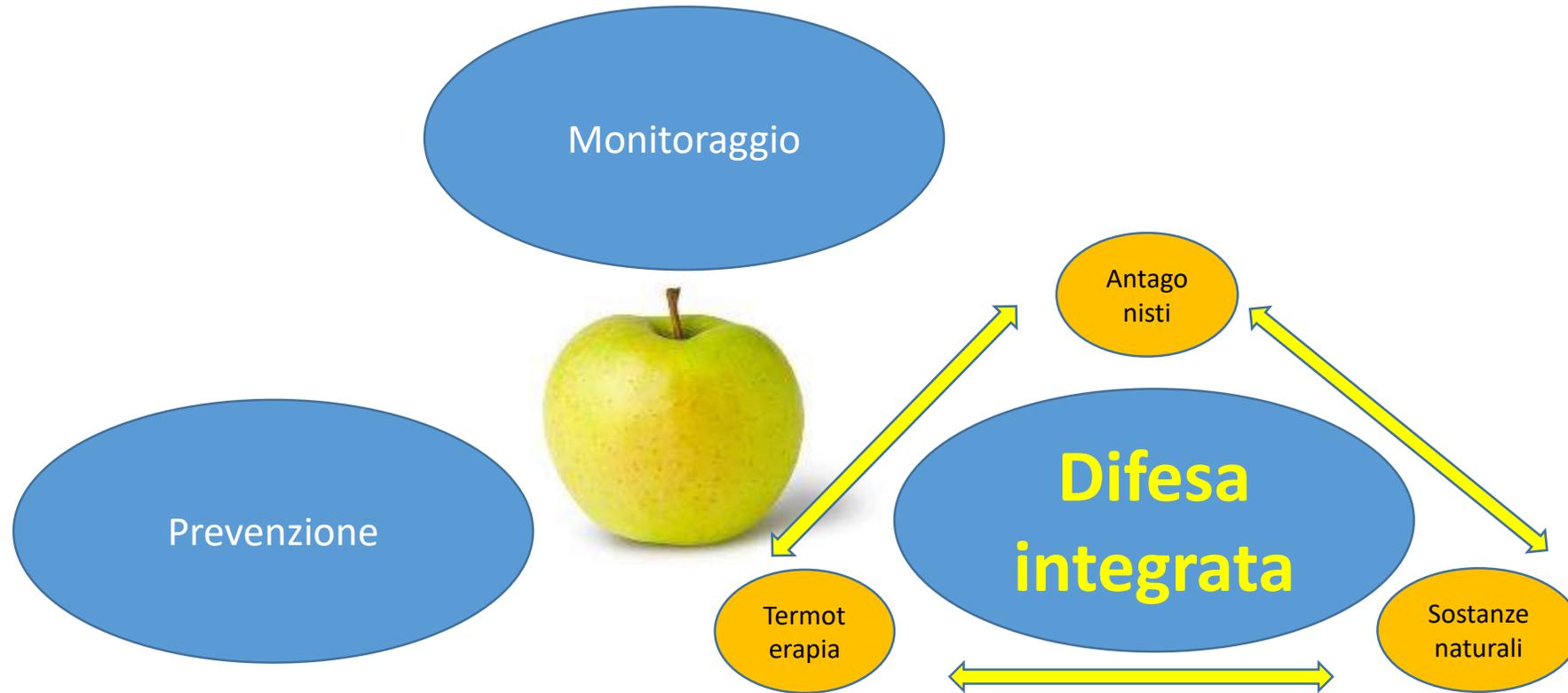
Meccanismo degli antagonisti



Competizione
Antibiosi
Parassitismo sul fungo



Approccio integrato



- Atmosfera dinamica
- Rivestimenti edibili e film biodegradabili
- Metodi di rilevamento molecolari
- Oli essenziali: biofumigazione, lento rilascio nei rivestimenti o nei film
- Antagonisti: effetto del microbioma, impiego di miscele

Ringraziamenti



Maria Lodovica Gullino
Angelo Garibaldi



Vladimiro Guarnaccia
Sara Franco Ortega
Pilar Bustos Lopez
Simona Prencipe
Giada Schiavon
Marco Rosati
Marco Garello



Michael Wisniewski



WESTERDIJK
FUNGAL BIO
DIVERSITY
INSTITUTE

Teun Boekhout



FONDAZIONE
CASSA DI RISPARMIO DI SALUZZO



Luca Nari
Lorenzo Berra



Carlo Ricciardi



Neil Boonham
Jenny Tomlinson



Samir Droby



Lagnasco
Group

