

## STUDIO EPIDEMIOLOGICO SU *MONILINIA FRUCTICOLA* SU PESCO CON L'UTILIZZO DI CAPTASPORE VOLUMETRICO E PCR QUANTITATIVA

S. RIMONDI, R. BUGIANI, R. ROSSI, L. ANTONIACCI, T. BASCHIERI,  
C. MONTUSCHI

Servizio Fitosanitario - Regione Emilia-Romagna - Via Saliceto, 81 - 40128 Bologna  
srimondi@regione.emilia-romagna.it

### RIASSUNTO

Negli anni dal 2013 al 2015 è stato svolto in tre località della provincia di Ravenna, uno studio epidemiologico con lo scopo di validare un metodo per stimare in campo il potenziale di inoculo di *Monilinia fructicola* e la sua dinamica nel corso della stagione vegetativa. Lo studio è stato eseguito utilizzando un captaspore volumetrico e la PCR quantitativa. Il metodo ha permesso di valutare la quantità di DNA di *M. fructicola* presente nelle spore aero-diffuse. La concentrazione massima si è verificata nella fase fenologica di indurimento del nocciolo e di pre-raccolta. Le concentrazioni più elevate hanno coinciso con piogge o bagnature prolungate o umidità relativa superiore a 70% e temperatura media di 20°C circa. Tale metodologia potrebbe essere impiegata nei servizi territoriali di assistenza tecnica per guidare i trattamenti in funzione della sporulazione del patogeno nell'ottica di una difesa sostenibile alla monilia delle drupacee.

**Parole chiave:** drupacee, epidemiologia, *Monilia* spp., marciume bruno

### SUMMARY

#### EPIDEMIOLOGICAL STUDY ON *MONILINIA FRUCTICOLA* USING VOLUMETRIC SPORETRAPS AND QUANTITATIVE PCR

An epidemiological study in three farms in Ravenna over the years 2013-2015 was carried out with the aim to validate a method to estimate the potential inoculum of *Monilinia fructicola* in the field and its dynamics during the growing season. The study was carried out using three volumetric spore traps placed in three unsprayed peach plots and the quantitative PCR. The method permitted to estimate *M. fructicola* airborne spore as ng/ $\mu$ L of DNA. Maximum DNA concentration was detected during phenological phase of "stone hardening" and pre-harvest. Highest DNA concentrations often coincided with rainfall or prolonged wetness duration or relative humidity above 70% and average temperature of 20°C. Such method could be effectively used in advisory services to guide sprays in relation to major fungal sporulation periods for a more sustainable and effective brown rot control strategy of stonefruits.

**Keywords:** peach, stonefruits, epidemiology, brown rot, *Monilia* spp.

### INTRODUZIONE

La moniliosi è una malattia fungina fra le più comuni in grado di causare danni rilevanti tali da pregiudicare la commercializzazione dei frutti di drupacee e pomacee. *Monilinia fructicola*, *M. laxa* e *M. fructigena* sono le principali specie del genere *Monilinia*. Le tre specie sono molto simili fra loro, sia dal punto di vista sintomatologico che epidemiologico. In Italia *M. fructicola*, è stata rinvenuta per la prima volta nel 2009 in Piemonte e nel 2010 in Emilia-Romagna ed è stata considerata un patogeno da quarantena, regolamentato mediante la direttiva 2000/29/CE, recepita nel nostro paese con il decreto legislativo n. 214 del 19 agosto 2005, fino all'ottobre 2014. *M. fructicola* può infettare, se persistono idonee condizioni di umidità e temperatura, i fiori, i rami e i frutti causando rispettivamente avvizzimenti floreali, disseccamenti dei rami e marciumi sui frutti. La malattia è particolarmente grave se si

verificano alti livelli di inoculo in condizioni di tempo umido o piovoso con temperature diurne miti (20-25 °C) e notti fresche (Watson, 2002).

La formazione di conidi può verificarsi su tutti gli organi infetti e nei paesi dove è presente da tempo, può avere anche una forma perfetta o sessuata oltre la riproduzione asessuata. Il fatto di poter effettuare una riproduzione sessuata può favorire la comparsa di ceppi resistenti ai fungicidi comunemente utilizzati contro la moniliosi. Attualmente in Emilia Romagna, nelle aree da noi monitorate, non è stata osservata la riproduzione sessuata del fungo, ciò comporta un minor rischio di comparsa di ceppi resistenti ai fungicidi. Comunque, la buona pratica agronomica è da preferire ai trattamenti chimici preventivi. L'incidenza di infezioni "latenti" sui frutti immaturi e l'incidenza del marciume bruno sui frutti al momento della raccolta e nella fase di post-raccolta è influenzata dalla quantità di inoculo, dallo stadio fenologico del frutto al momento dell'infezione e dalle condizioni ambientali di temperatura e umidità (Luo e Michailides, 2001 e 2003). In relazione al momento fenologico, il periodo di maggiore suscettibilità alle infezioni "latenti" va dalla fioritura fino a raggiungere il massimo apice nella fase di indurimento del nocciolo.

L'infezione latente è condizionata sia dall'infezione primaria sia dall'infezione secondaria (Luo e Michailides, 2003). L'infezione primaria è data dai conidi che vengono liberati dalle "mummie" formatesi nella stagione precedente. L'infezione secondaria derivano dai conidi presenti sui frutticini. Nella fase di indurimento nocciolo la stima del potenziale di inoculo del patogeno è fondamentale per determinare il momento opportuno per eseguire un eventuale trattamento fungicida.

Questo studio ha come obiettivo la validazione, negli areali peschicoli dell'Emilia-Romagna, di un metodo messo a punto da Luo in USA (Luo *et al.*, 2007). Ciò permetterebbe di individuare le condizioni climatiche predisponenti la sporulazione del patogeno utilizzabile per migliorare il posizionamento dei trattamenti antimonia. Negli anni 2012 e 2013 sono stati eseguiti studi preliminari per mettere a punto la metodologia analitica che negli anni successivi, 2014 e 2015, è stata poi praticamente adottata.

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato eseguito nella provincia di Ravenna in due aziende localizzate a Bagnacavallo e San Bernardino nel 2014 e 2015 e a Faenza nel 2015. Lo studio preliminare è stato realizzato nel 2012 (dati non riportati) e 2013 sempre nelle località di San Bernardino e Bagnacavallo (tabella 1).

Tabella 1. Caratteristiche agronomiche e varietali delle aziende, site in provincia di Ravenna, oggetto di monitoraggio aerobiologico di *M. fructicola*. (F - fioritura; I.N. – indurimento nocciolo; R – raccolta)

Anno	Località	Cultivar	Sesto impianto	Fase fenologica		
				F	I.N.	R
2013*	Bagnacavallo	Red Coast	5x2,5	10/3	8-15/6	10/8
2013*	S.Bernardino, Lugo	Sinphony	4x1,3	10/3	8-15/6	13/8
2014	Bagnacavallo	Red Coast	5x2,5	10/3	8-15/6	21/7
2014	S.Bernardino, Lugo	Sinphony	4x1,3	10/3	8-15/6	25/7
2015	Bagnacavallo	Red Coast	5x2,5	20-30/3	28/5-6/6	29/7
2015	S.P.Laguna, Faenza	Romagna 3000	4x1,3	20-30/3	28/5-6/6	3/9
2015	S.Bernardino, Lugo	Sinphony	5,3x3	20-30/3	28/5-6/6	30/7

\*Aziende oggetto di studio preliminare per la messa a punto del metodo

## Monitoraggio aerobiologico

All'interno di ciascun campo non trattato, dove si intendevano fare le osservazioni, è stato posizionato un captaspore volumetrico Lanzoni modello VP2000. Il monitoraggio aerobiologico è stato eseguito a partire dall'inizio di aprile nel 2013 e 2014, mentre nel 2015 a Faenza è iniziato a metà maggio. I due pescheti di San Bernardino e Bagnacavallo sono stati scelti per la diversa pressione della malattia determinata anche da una diversa conduzione agronomica. Le spore di *M.fructicola* depositate sul nastro del captaspore sono state raccolte ogni 3 giorni e analizzate attraverso il procedimento descritto da Luo nel 2001 (Luo *et al.*, 2001). La fase di indurimento del nocciolo è stata monitorata dalla terza settimana di maggio fino alla seconda settimana di giugno attraverso rilievi bi-settimanali.

## Estrazione e Real Time PCR

Il nastro raccolto è stato diviso in due campioni distinti, quindi tagliato in quadretti e posto in una provetta contenente una soluzione di lavaggio (soluzione acquosa 0,1% di Tween20) per eliminare il silicone che è un inibitore della TaQ polimerasi e posto in incubazione per 20 minuti a 55°C. Successivamente è stato centrifugato in modo da eliminare il liquido di lavaggio e conservare il nastro. È stato quindi aggiunto il buffer di lisi e si è proceduto con l'estrazione del DNA attraverso "Dneasy Plant Mini Kit" (Qiagen) alle cui indicazioni sono state apportate le seguenti modifiche: al buffer di lisi è stata aggiunta la proteinasi K, il campione è stato pre-incubato per almeno 30 minuti a 56°C, a cui è seguita una incubazione a 70°C per 5 minuti per disattivare la proteinasi K.

Sono stati scelti e utilizzati i primer specifici per la *M. fructicola* RTMfF 5'-ATGAGCGCTTCCAGAATGAT-3' / RTMfR 5'- TTCAGAAGCTGTTTGGGA-3' disegnati sul microsatellite M13 (Ma *et al.* 2003). Questi amplificano un frammento di 390 bp specifico per *M. fructicola*. I primer sono stati utilizzati in Real-Time utilizzando la chimica del SYBR Green. L'amplificazione in Real-time permette di avere un dato quantitativo poiché nella fase esponenziale il numero di copie di DNA che si formano sono proporzionali al DNA di partenza. La quantificazione è assoluta e si è basata sulla curva standard ottenuta da campioni la cui concentrazione di DNA è nota. È stato riportato che 0,6 pg di DNA corrispondono a 4 conidi (Van Brouwershaven *et al.*, 2010). Si è partiti da un campione di DNA estratto da una colonia di *M. fructicola* che è stato quantificato allo spettrofotometro e la cui concentrazione di partenza era  $7,8 \cdot 10^2$  ng/microlitri. La curva standard è stata realizzata su 5 diluizioni seriali 1:10 fino alla concentrazione di  $7,8 \cdot 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L. L'amplificazione è stata eseguita sul termociclatore 7500 System (Applied Biosystems, Life technologies), in un volume di 20 microlitri contenente 10 microlitri di Power SYBR Green PCR Master Mix, 0,6 microlitri di ciascun primer e 2 microlitri di DNA. Gli standard utilizzati per la quantificazione assoluta sono stati gli stessi utilizzati nei due anni di indagine.

Il ciclo termico è: 95°C 10 minuti poi 50 cicli a 95°C 15 secondi 60°C 1 minuto, al termine dell'amplificazione per evitare la formazione di prodotti aspecifici, viene aumentata gradualmente la temperatura fino al raggiungimento della temperatura di "melting" (T<sub>m</sub>), cioè la temperatura alla quale la doppia elica del DNA si separa in due eliche, questo per generare una curva di dissociazione (curva di melting) che serve per identificare, qualora ci siano, degli aspecifici.

La quantificazione del numero iniziale di DNA target mediante Real Time PCR si basa sulla determinazione del ciclo soglia: Ct value, quel ciclo al quale la fluorescenza del campione supera il segnale di fondo. Il ciclo soglia dipende dalla concentrazione iniziale del DNA, quindi minore è la concentrazione iniziale maggiore sarà il numero di cicli necessari a raggiungere il ciclo soglia (Ct) e viceversa.

## RISULTATI

Nel 2013 si è potuto osservare come l'andamento della concentrazione di spore aerodiffuse di *M. fructicola*, e pertanto la contaminazione dei giovani frutticini, non avveniva solo in prossimità della raccolta (grafici 1 e 2) ma anche in periodi molto antecedenti. Le concentrazioni diverse sono probabilmente dovute a differenti conduzioni agronomiche. Difatti l'azienda sita a Bagnacavallo aveva una concentrazione di inoculo molto elevata fin dalle primissime fasi e con un picco di concentrazione molto elevato in corrispondenza di un prolungato periodo piovoso alla fine di giugno (grafico 1). L'azienda sita in San Bernardino ha registrato nello stesso periodo un picco anche se la concentrazione è stata di gran lunga inferiore per poi alzarsi in agosto subito dopo la raccolta (grafico 2).

Grafico 1. Dati meteorologici e concentrazione di DNA di *M. fructicola* (pg/ $\mu$ L) rilevati durante la stagione vegetativa dal captaspore posto a Bagnacavallo durante la prova preliminare del 2013 (1 pg/ $\mu$ L = 0,001 ng/ $\mu$ L). Il rettangolo indica la fase di "indurimento nocciolo"

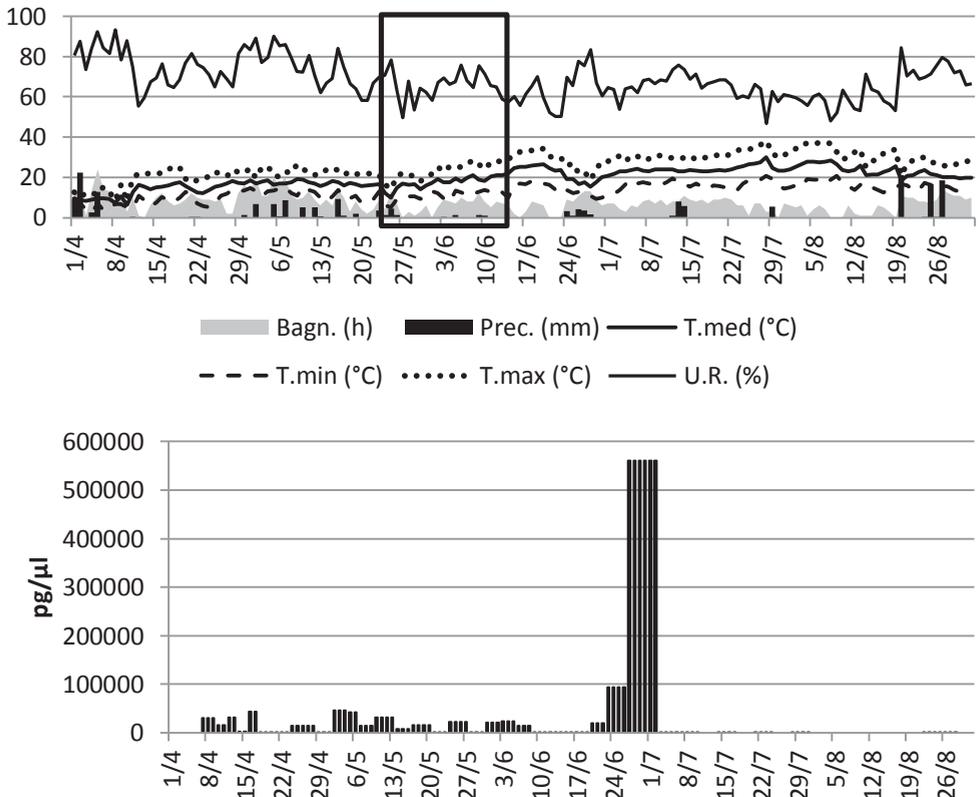


Grafico 2. Dati meteorologici e concentrazione di DNA di *M. fructicola* (pg/μL) rilevati durante la stagione vegetativa dal captaspore posto a San Bernardino durante la prova preliminare del 2013 (1 pg/μL = 0,001 ng/ μL). Il rettangolo indica la fase di “indurimento nocciolo”

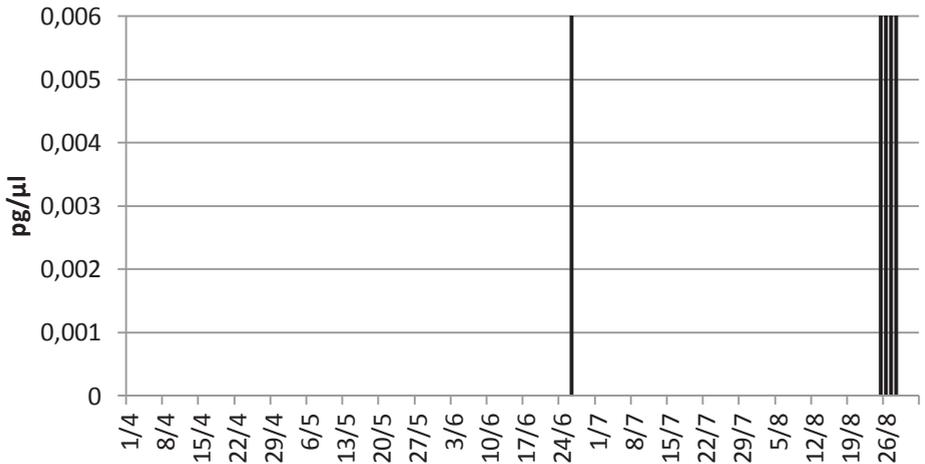
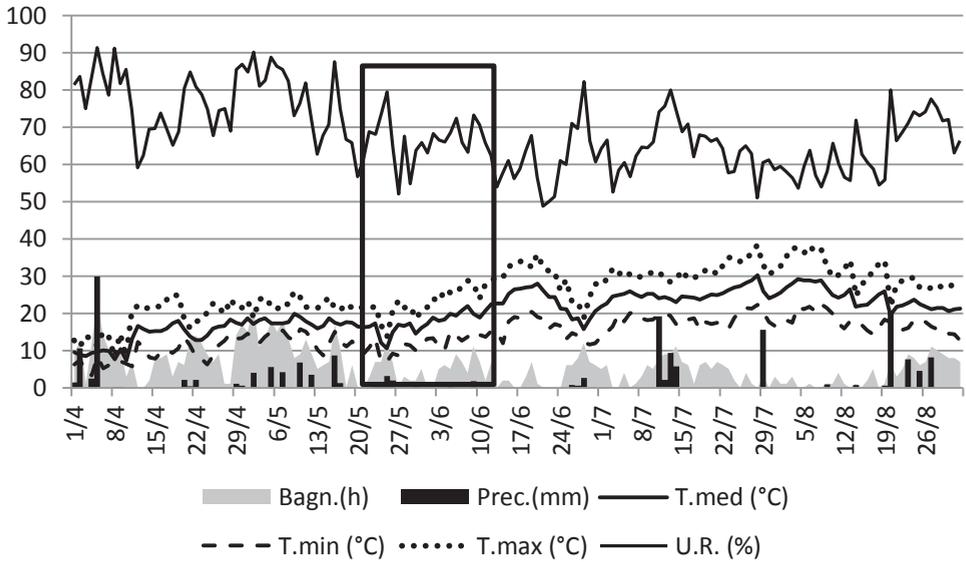


Grafico 3. Dati meteorologici e concentrazione di DNA di *M.fructicola* (pg/ $\mu$ L) rilevati durante la stagione vegetativa dal captaspore posto a Bagnacavallo nel 2014. Il rettangolo indica la fase di “indurimento nocciolo”

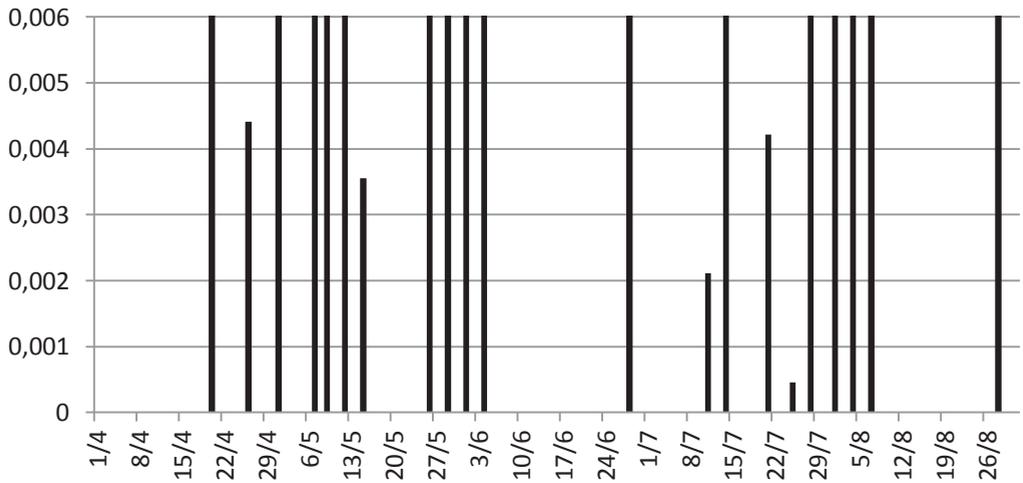
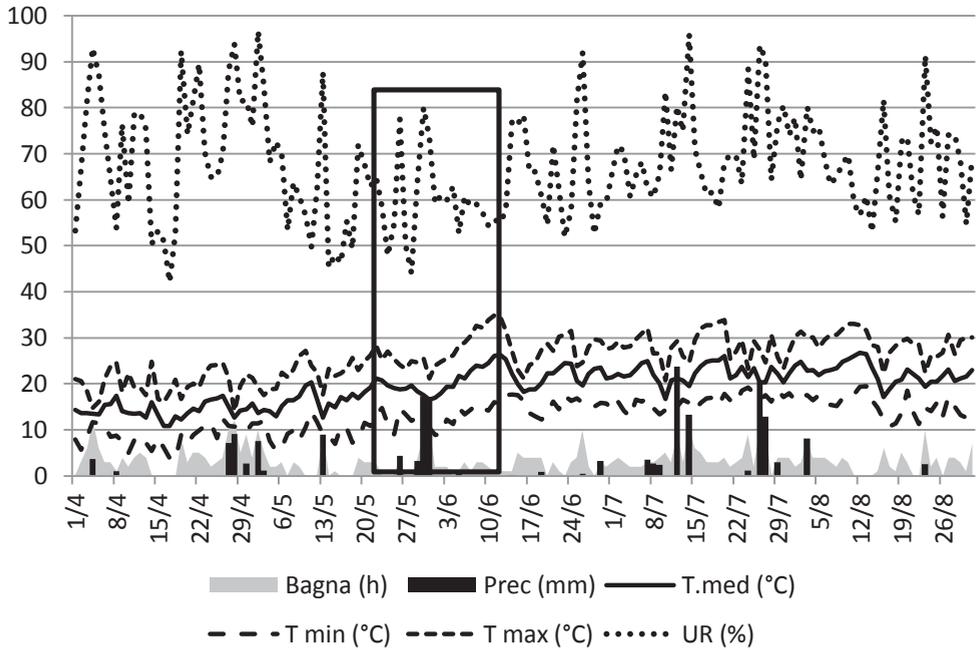


Grafico 4. Dati meteorologici e concentrazione di DNA di *M.fructicola* (pg/μl) rilevati durante la stagione vegetativa dal captaspore posto a San Bernardino nel 2014. Il rettangolo indica la fase di “indurimento nocciolo”

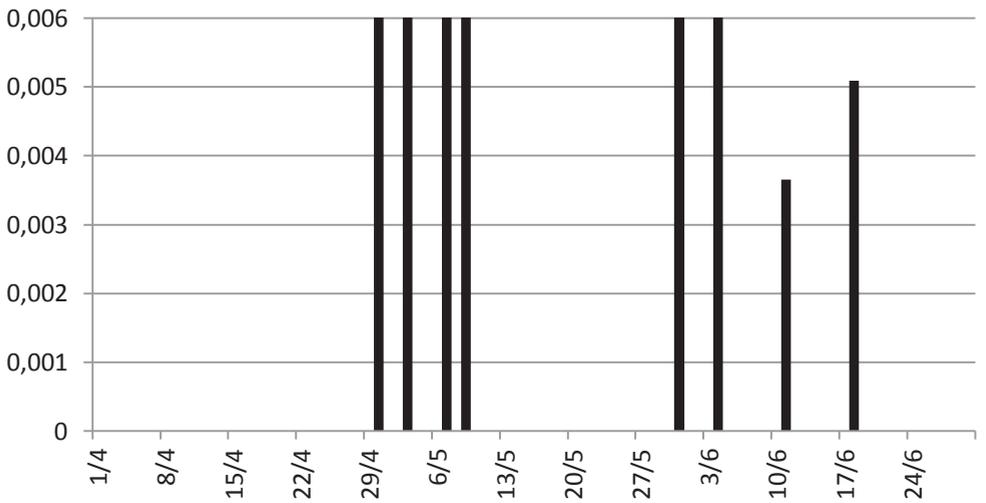
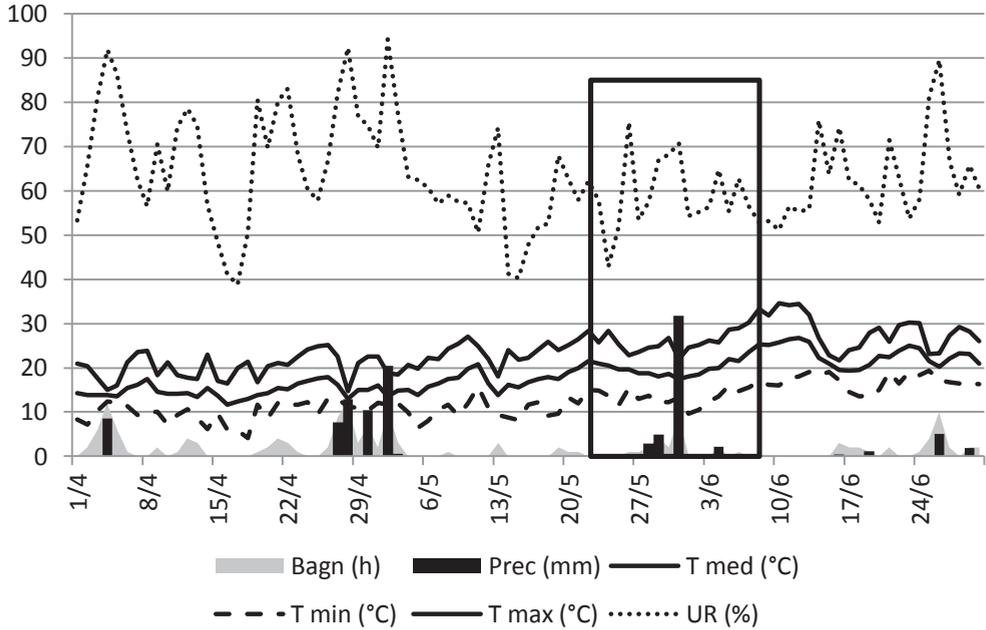


Grafico 5. Dati meteorologici e concentrazione di DNA di *M.fructicola* (pg/ $\mu$ L) rilevati durante la stagione vegetativa dal captaspore posto a Bagnacavallo nel 2015. Il rettangolo indica la fase di “indurimento nocciolo”

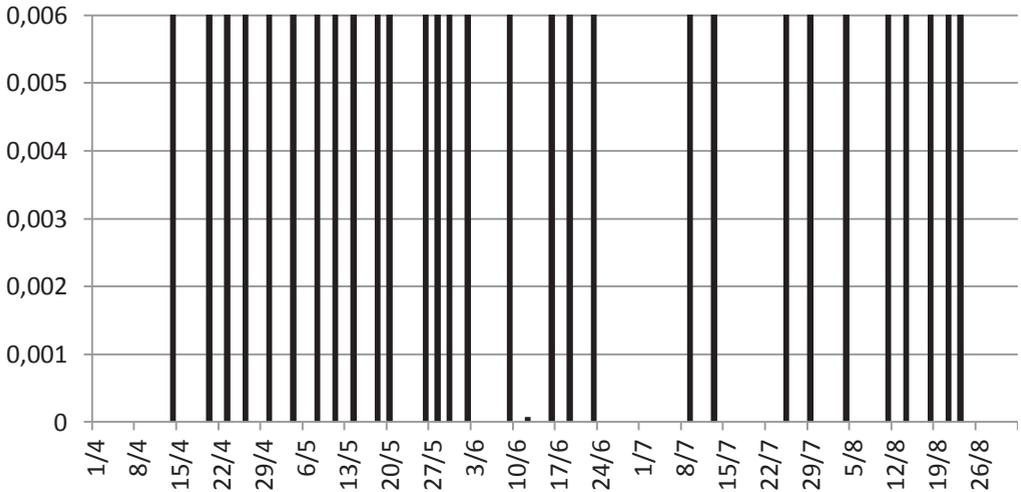
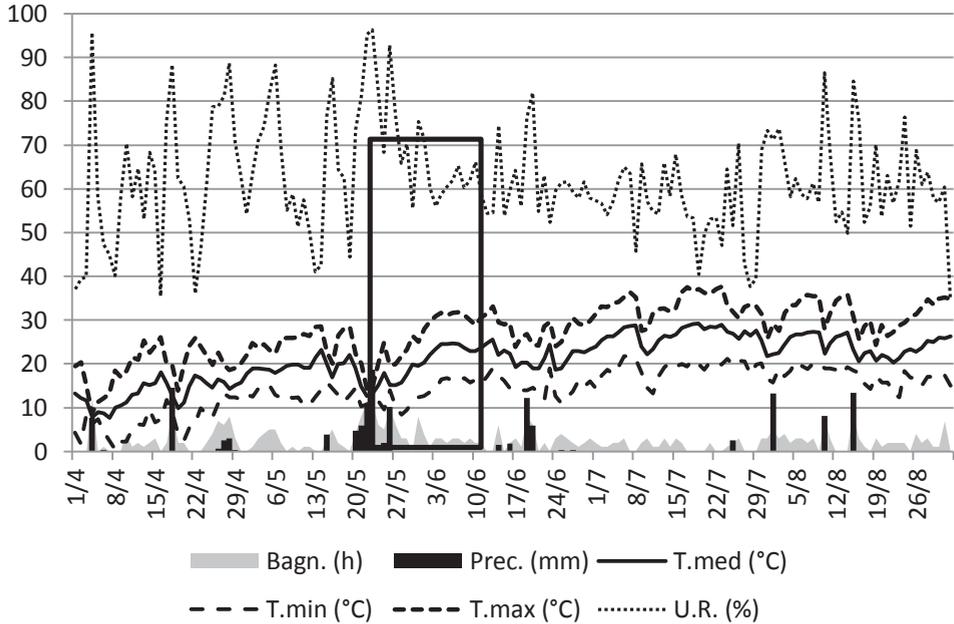


Grafico 6. Dati meteorologici e concentrazione di DNA di *M.fructicola* (pg/μl) rilevati durante la stagione vegetativa dal captaspore posto a San Bernardino nel 2015. Il rettangolo indica la fase di “indurimento nocciolo”

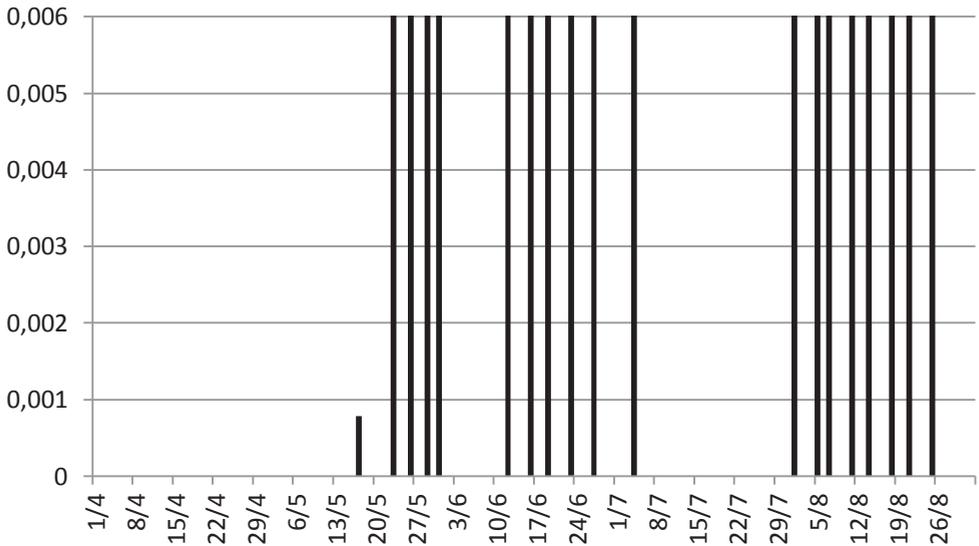
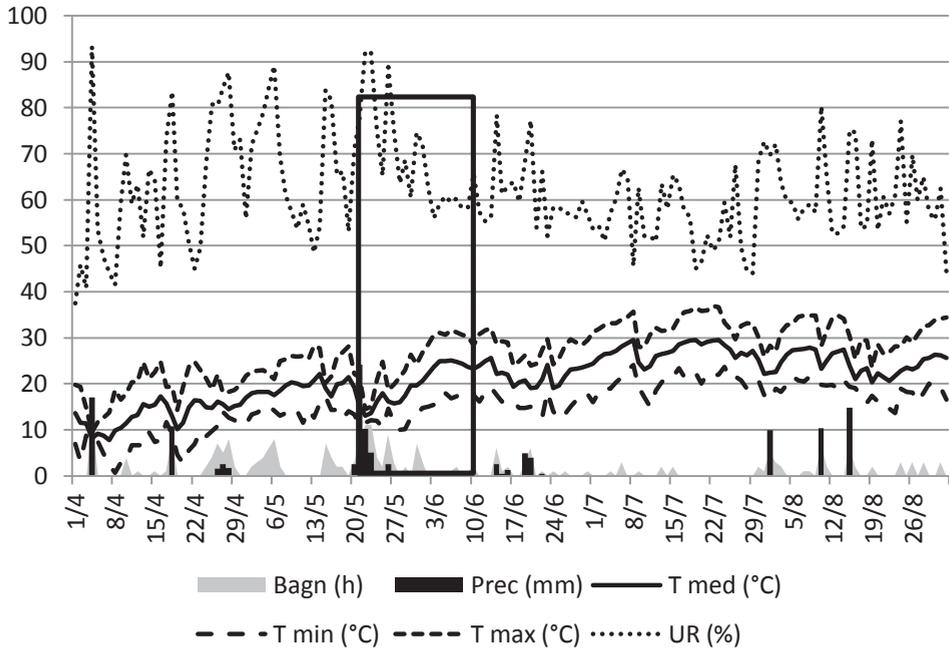
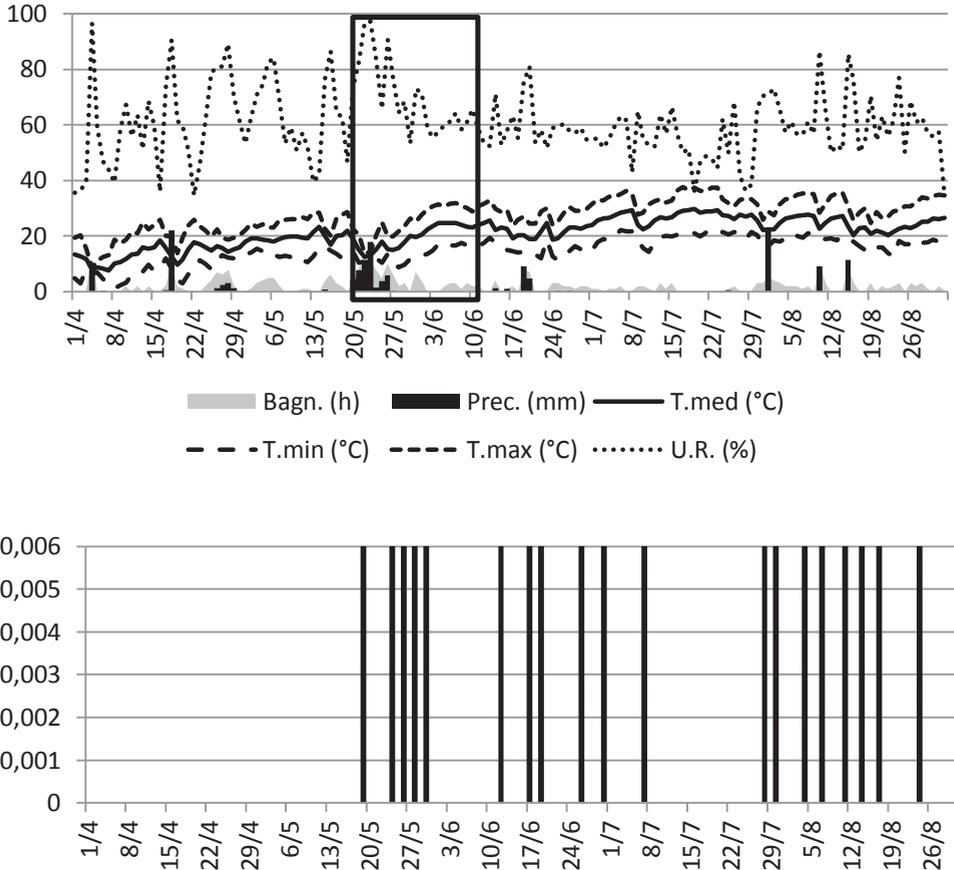


Grafico 7. Dati meteorologici e concentrazione di DNA di *M.fructicola* (pg/μl) rilevati durante la stagione vegetativa dal captaspore posto a Faenza nel 2015. Il rettangolo indica la fase di “indurimento nocciolo”



Il 2014, dalla fase di ingrossamento del frutto fino alla raccolta, è stato caratterizzato da condizioni climatiche particolarmente umide in tutto il mese di maggio, ma le temperature si sono alzate al di sopra del valore medio di 20°C solamente intorno alla ultima settimana di maggio. Giugno si è presentato asciutto, mentre a luglio diversi eventi piovosi hanno di fatto aumentato il rischio moniliosi proprio nella fase di raccolta. Il 2015, al contrario è stato caratterizzato da temperature al di sopra dei 20°C intorno alla prima settimana di maggio e da un ciclo prolungato di piogge a partire dalla terza settimana di maggio fino ai primi di giugno. Altre piogge sono state registrate a metà giugno e fine giugno. Luglio, al contrario, è stato asciutto e caldo. Dalla fine di luglio e per tutto agosto altre piogge hanno di fatto aumentato la pressione del patogeno.

La fase di inizio indurimento del nocciolo è avvenuta in tutte e due gli anni dal 28 di maggio alla prima decade di giugno. Il sistema di analisi del potenziale di inoculo stimato utilizzando captaspore volumetrico e PCR quantitativa è stato validato fornendo dati interessanti. Nel 2014, le concentrazioni più alte di *M. fructicola* sono avvenuti in concomitanza delle piogge che si sono verificate dalla fine di maggio alla prima settimana di giugno nella fase di

indurimento del nocciolo e dalla fine di luglio ad agosto. Tuttavia, i valori che sono stati rilevati sono molto diversi. L'azienda di Bagnacavallo ha infatti registrato concentrazioni di *M. fructicola* di gran lunga superiori a quelli rilevati a San Bernardino. Nel 2015, ancora, i valori più alti di concentrazione del patogeno sono stati rilevati, in tutte e tre le località, alla fine di maggio, nella seconda settimana di giugno e da fine luglio ad agosto. A Faenza e a Bagnacavallo è stata registrata una elevata concentrazione intorno al 6-7 luglio, assente invece a San Bernardino. Questo è avvenuto in discordanza ad eventi piovosi o prolungati periodi di elevata umidità relativa, contrariamente a quanto osservato negli altri casi; ciò è dovuto a irrigazioni di soccorso eseguite, a goccia, in una stagione con temperature al di sopra della norma. In generale, tutti i picchi con le più alte concentrazioni di *M. fructicola* sono avvenuti allorché le temperature prima dell'evento piovoso si sono mantenute per più giorni sopra i 20°C. Durante l'evento piovoso la temperatura media non è scesa mai al di sotto dei 18-20°C, l'umidità relativa media è stata superiore al 70% e la bagnatura fogliare è stata superiore alle 16-18 ore.

### DISCUSSIONE

Questo studio, ha preliminarmente permesso di giungere alle seguenti considerazioni:

- ! Il ricorso all'analisi del DNA di spore di *M. fructicola*, catturate attraverso monitoraggio aerobiologico, ha permesso di quantificare la presenza del patogeno nel corso della stagione ponendola in relazione anche con la fase fenologica di indurimento del nocciolo. Si conferma quindi come, in questa fase, se si verificano eventi climatici favorevoli al patogeno, il potenziale di inoculo dello stesso aumenta, incrementando la possibilità di contaminazione dei frutti.

- ! Le più alte concentrazioni di *M. fructicola* sono state rilevate quando le temperature prima dell'evento piovoso si sono mantenute per più giorni sopra i 20°C. Durante l'evento piovoso la temperatura media non è scesa mai al di sotto dei 18-20°C, l'umidità relativa media è stata superiore al 70% e la bagnatura fogliare è stata superiore alle 16-18 ore. Questo dato se confermato da ulteriori studi nei prossimi anni potrebbe essere utilizzato nei servizi di assistenza tecnica.

- ! La metodologia adottata potrebbe essere utilizzata nei servizi territoriali di assistenza tecnica per ottimizzare e razionalizzare le strategie di intervento contro la moniliosi in campo. Un trattamento eseguito nella fase di indurimento del nocciolo o subito dopo potrebbe essere di aiuto nell'abbassare il potenziale di inoculo del fungo e contribuire a migliorare l'efficacia complessiva della difesa.

- ! E' comunque sempre bene ricordare come la difesa dalla monilia passi anche da una corretta conduzione agronomica del pescheto. Irrigazioni e fertilizzazioni azotate eccessive, rendono rigogliosa la vegetazione ma aumentano la probabilità di contaminazione latente di *M. fructicola* sui frutti. Per contribuire ad abbassare l'inoculo del patogeno, nella fase del diradamento, normalmente eseguita poco prima della fase fenologica di indurimento del nocciolo, sarebbe utile asportare i frutti diradati dal pescheto.

### LAVORI CITATI

- Luo Y., Ma Z., Reyes H.C., Morgan D., Michailides T.J., 2007. Quantification of airborne spores of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards of California using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 145-154.
- Luo Y., Michailides T.J., 2001. Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology*, 91, 864-872.

- Luo Y., Michailides T.J., 2003 Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* 93,102-111.
- Ma Z., Luo Y., Michaelidis T.J. 2003. Nested PCR Assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from Pistachios in California. *Journal of Phytopathology*, 151, 312-322.
- Montuschi C., Ceredi G., Mari M., 2011. *Monilia fructicola* è arrivata anche in Emilia-Romagna, *Agricoltura*, 90-92.
- Van Brouwershaven R.I., Bruil M.L., Van Leeuwen G.C.M., Kox L.F.F. 2010. A real time (Taqman) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops. *Plant pathology*, 59, 548-555.
- Watson W.A. 2002 Influence of temperature and wetting period on inoculum production by *Monilinia fructicola* in peach twig cankers. *Plant Disease* 86, 666-668.