

PRECOCE RILEVAMENTO DI *PENICILLIUM EXPANSUM*, PRODUTTORE DI PATULINA, SU POMACEE MEDIANTE PCR *REAL TIME*

Valentina Tolaini (a), Patrizia De Rossi (b), Antonella Del Fiore (b), Massimo Reverberi (a), Anna Adele Fabbri (a), Corrado Fanelli (a)

(a) Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi "Sapienza", Roma

(b) Dipartimento di Biotecnologie, Agroindustria e Protezione della Salute, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA), Centro Ricerche Casaccia, Roma

Introduzione

Penicillium expansum è l'agente eziologico del marciume verde-azzurro delle pomacee in post-raccolta e la sua infezione è associata con la produzione di Patulina, una micotossina con effetti tossici a livello immunologico, neurologico e gastrointestinale in modelli animali (1). L'utilizzo di frutti colpiti da tale patogeno anche nelle fasi iniziali di infezione incrementa il rischio di contaminazione da Patulina in succhi di frutta e altri prodotti di trasformazione, consumati principalmente da bambini. Per assicurare la qualità e la salubrità di frutti e succhi è quindi fondamentale disporre di un rapido e specifico metodo di rilevamento di tale patogeno, che consenta di accertarne tempestivamente la presenza e di adottare le opportune misure di sanificazione.

L'obiettivo di tale lavoro è stato quello di sviluppare e ottimizzare un saggio basato su *Polymerase Chain Reaction Real Time* (PCR *Real Time*), metodica maggiormente sensibile rispetto alla PCR classica, per il precoce rilevamento di *Penicillium expansum* su mele.

Materiali e metodi

Inoculo di *Penicillium expansum* su mele

Mediante carotatore sterile sono state fatte quattro ferite (\varnothing 6 mm x 3 mm) nella zona circostante il picciolo di mele (cv *Golden delicious*) precedentemente sterilizzate, e sono state inoculate con 15 μ L di una sospensione acquosa contenente 5-10 conidi di *P. expansum*. Le ferite non inoculate hanno costituito il controllo. Le mele sono state incubate a 25°C e 90% di umidità relativa per 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 ore.

Estrazione del DNA

Le ferite di mela, recuperate tramite carotatore sterile, sono state liofilizzate e sottoposte ad estrazione del DNA utilizzando il metodo TRIS-SDS *Lysis Buffer* (2) con alcune modifiche.

È stato inoltre estratto il DNA direttamente da mele acquistate in diversi punti vendita, provenienti sia da agricoltura biologica che convenzionale, integre e prive di alcun segno di marciume.

Polymerase Chain Reaction Real Time

Una coppia di *primer* specie-specifici è stata disegnata sulla sequenza conservata del gene della poligalatturonasi Peps1, enzima coinvolto nella formazione del marciume molle nei tessuti vegetali (3). Tali *primer* ((PG1F 5' – TTG ACA CGC AGT GTT GTT CTG GGA – 3'; PG1R 5' – TGC ACC ACT GGT TCC CGA ATA GC – 3')) amplificano un frammento di 135 bp. Diluizioni note di DNA plasmidico (0,0015 pg=150 ng) contenente il frammento d'interesse sono state preliminarmente amplificate e quantizzate per ottenere la curva di taratura ($R^2=0,9944$) per mettere in relazione il segnale di fluorescenza al quantitativo di DNA nei campioni.

Condizioni ottimali di amplificazione: 94°C per 1 min, 94°C per 15 s, 57,4°C per 20 s, 72°C per 15 s (*steps* da 2 a 4 ripetuti per 32 cicli), 72°C per 8 min.

Risultati e discussioni

Le condizioni di PCR *Real Time* messe a punto hanno mostrato un'elevata sensibilità dei *primer* utilizzati, permettendo di amplificare fino a 0,0015 pg di DNA fungino.

La tecnica ha consentito di rilevare e quantizzare il DNA fungino estratto da matrice inoculata artificialmente con 5-10 conidi dopo solo 6 ore dall'inoculo (Figura 1).

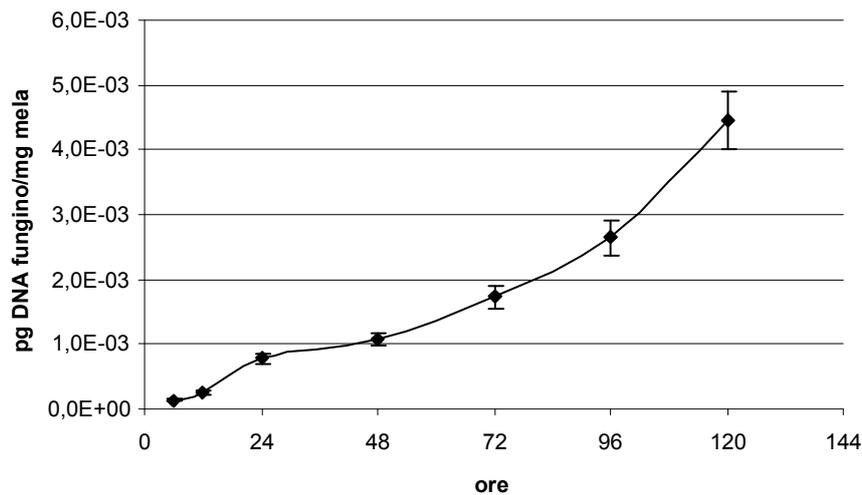


Figura 1. Quantitativo di DNA estratto da mela inoculata con 5-10 conidi a differenti tempi di analisi. I valori rappresentano la media di tre repliche per tesi \pm ES

Inoltre, i *primer* hanno permesso di rilevare *P. expansum* su mele commerciali, sia biologiche che convenzionali, in quantità bassissime (Figura 2), rappresentanti comunque un inoculo sufficiente a far sviluppare il patogeno dopo 10 giorni di incubazione delle stesse mele a 25°C.

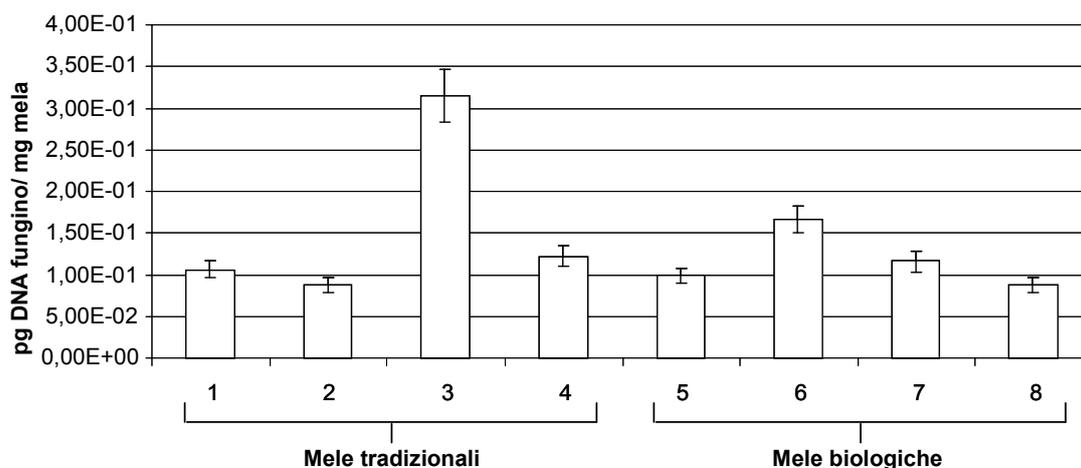


Figura 2. Quantità di DNA fungino rilevato in mele commerciali mediante RT-PCR (i valori rappresentano la media di tre repliche per tesi \pm ES)

La mancata amplificazione del DNA di mela ha confermato la specificità dei *primer* per *P. expansum* (dati non mostrati).

I risultati ottenuti in tale lavoro hanno confermato la diffusa e comune presenza di *P. expansum* su mele ed hanno evidenziato l'elevata sensibilità dei *primer* PG1 e della PCR *Real Time*, metodica che potrebbe essere facilmente applicata per l'*early detection* del fungo su scala commerciale in quanto applicabile al DNA estratto direttamente da tessuto vegetale, senza necessità di isolare precedentemente la microflora, identificarla e sottoporre ad estrazione il micelio fungino.

Bibliografia

1. Pitt JI. Toxigenic *Penicillium* species. In: Doyle MP, Beuchat LB, Montville TJ. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington (DC): ASM Press; 1997. p. 406-18.
2. Marek P, Annamalai T, Venkitanarayanan K. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology* 2003;89:139-44.
3. Yao C, Conway WS, Ren R, Sams CE. 1998. Cloning and analysis of a gene encoding polygalacturonase in *Penicillium expansum*. Direct Submission Genbank, accession AF047713.