

METODOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI AI FINI DEL RAPIDO RILEVAMENTO IN BACCA D'UVA DEL FUNGO TOSSIGENO *A. CARBONARIUS*

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

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

(b) Dipartimento di Biologia Vegetale, Università "Sapienza", Roma

Introduzione

L'Ocratossina A (OTA) risulta la principale micotossina segnalata nell'uva e nei suoi derivati, essa ha proprietà nefrotossiche, carcinogene, teratogene e immunodepressive. Responsabili della presenza di questo metabolita nelle uve sono principalmente funghi appartenenti al genere *Aspergillus* sezione Nigri (*aspergilli neri*) la cui presenza provoca marciume nelle bacche di *Vitis vinifera*. Tra le specie appartenenti a questo genere *Aspergillus carbonarius* mostra il più alto potenziale ocratossigenico in uva (1).

Lo scopo di questo studio è quello di individuare un sistema che consenta il rilevamento il più possibile tempestivo della presenza di *A. carbonarius* direttamente dalla bacca d'uva al fine di contribuire a realizzare un rapido ed efficace controllo della contaminazione da fungo. A tal fine in questo lavoro è stata messa a punto una tecnologia che utilizza la tecnica di *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) per la discriminazione di *A. carbonarius*. In particolare sono stati sviluppati due set di *primer* specie-specifici sulla base della regione ITS (*Internal Transcribed Spacer*), noti per il loro utilizzo negli studi filogenetici, e sulla base di sequenze parziali del gene codificante per la polichetide sintasi, enzima responsabile della biosintesi dell'OTA.

Alle condizioni testate in questo lavoro i *primer* individuati sono risultati essere specifici nei confronti del solo *A. carbonarius* sia *in vitro* che *in vivo* ed entrambi i *primer* hanno dimostrato la capacità di rilevare la presenza del fungo anche quando l'ispezione allo stereomicroscopio non lo permetteva. Inoltre l'uso della *Real Time* PCR ha dimostrato di migliorare le prestazioni di 100 o di 1000 volte rispetto alla PCR classica rendendo possibile l'individuazione della presenza del fungo già dopo 6h, momento in cui sono presenti solo circa 20 conidi/gr di bacca d'uva.

Materiali e metodi

Inoculo di *Aspergillus carbonarius* su bacca d'uva

Bacche d'uva precedentemente sterilizzate superficialmente sono state inoculate con 10 µL di una sospensione acquosa contenente 1-5 conidi di *A. carbonarius*. Le bacche non inoculate hanno costituito il controllo. Le bacche d'uva sono state incubate a 30°C per 6h, 12h, 24h, 48 ore. Al termine dell'incubazione ciascuna bacca è stata sottoposta a conta dei conidi ed estrazione di DNA.

Estrazione del DNA

Le bacche d'uva sono state sottoposte ad estrazione del DNA utilizzando il metodo TRIS-SDS *Lysis Buffer*. È stato inoltre estratto il DNA da sei differenti cultivar d'uva prelevate in due differenti stazioni italiane (zone di Velletri e di Bari).

Polymerase Chain Reaction Real Time

Due set di *primer* specie-specifici sono stati disegnati usando il software Primer Express. Una coppia è stata disegnata sulla base di regioni ITS (*Internal Transcribed Spacer*), note per il loro utilizzo negli studi filogenetici. Tali *primer* (AcITSfor2/AcITSrev1 5'-GTGAAGTCTGAGTCGATTGTT-3'; 5'-GGAAAAAAGGTTGGAGTT-3') amplificano un frammento di 239 bp. L'altra coppia di *primer* è stata disegnata sulla base di sequenze parziali del gene codificante per la polichetide sintasi (Gene Bank: AY540952), enzima responsabile della biosintesi dell'OTA; in questo caso i *primer* (Acpksfor/Acpksrev2 5'-GCAGCGGGAGTCAATGTAAT-3'; 5'-GCGTCGTACAAAGCCTCTT-3') amplificano un frammento di 330 bp. Diluizioni note di DNA plasmidico (0,01 pg÷1 µg) contenente il frammento d'interesse sono state preliminarmente amplificate e quantizzate per ottenere la curva di taratura ($R^2=0,99$); il segnale di fluorescenza è stato messo in relazione al quantitativo di DNA nei campioni.

Le condizioni ottimali di amplificazione sono state: 95°C per 10 min, 45 cicli a 95°C per 15 secondi, 67,1°C (per la coppia di *primer* Acpksfor/Acpksrev2) oppure 66°C (per la coppia AcITSfor2/AcITSrev1) per 30 secondi e 72°C per 20 secondi.

Risultati

Le condizioni di PCR *Real Time* messe a punto con entrambe le coppie di *primer* hanno mostrato un'elevata sensibilità permettendo di amplificare quantità di DNA fungino rispettivamente di 1 pg (Acpksfor/Acpksrev) e 0,01 pg (AcITSfor2/AcITSrev1), migliorando le prestazioni di 100 o di 1000 volte rispetto alla PCR classica (dati non mostrati).

I dati (Figura 1) mostrano come mediante la PCR *Real Time* è possibile rilevare e quantificare il DNA fungino estratto da matrice inoculata artificialmente con 1-5 conidi/gr di bacca d'uva dopo solo 6 h dall'inoculo, tempo in cui sono presenti circa 20 conidi per grammo di bacca d'uva (Figura 2).

Inoltre, i *primer* hanno permesso di rilevare il DNA di *A. carbonarius* su bacche prelevate da due stazioni italiane del centro e sud Italia (Velletri e Bari) (Figura 3). I campioni che risultano avere la più alta concentrazione di DNA di fungo avevano, al momento della raccolta, evidenti segni di marciume ad una ispezione visiva; mentre gli altri campioni risultati positivi allo screening della PCR *Real Time*, pur non mostrando evidenti segni di marciume, al momento della raccolta, hanno sviluppato il micelio fungino quando le bacche provenienti dallo stesso grappolo dei campioni erano poste ad incubare per 7 giorni a 30°C.

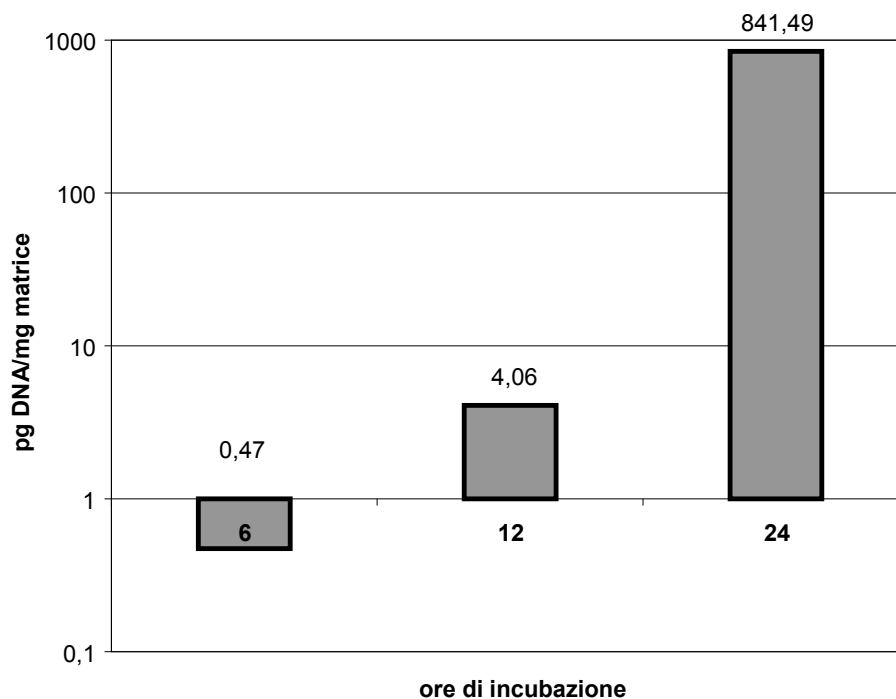


Figura 1. Quantificazione di DNA di *A. carbonarius* in campioni di uva inoculata (1-5 conidi/gr di bacca d'uva e incubati per 6h, 12h 24h, a 30°C. Il DNA è stato quantificato usando la SYBR Green PCR *real-time* con i primer pks (Acpksfor/Acpksrev2). I valori sono il risultato di tre repliche in tre esperimenti indipendenti

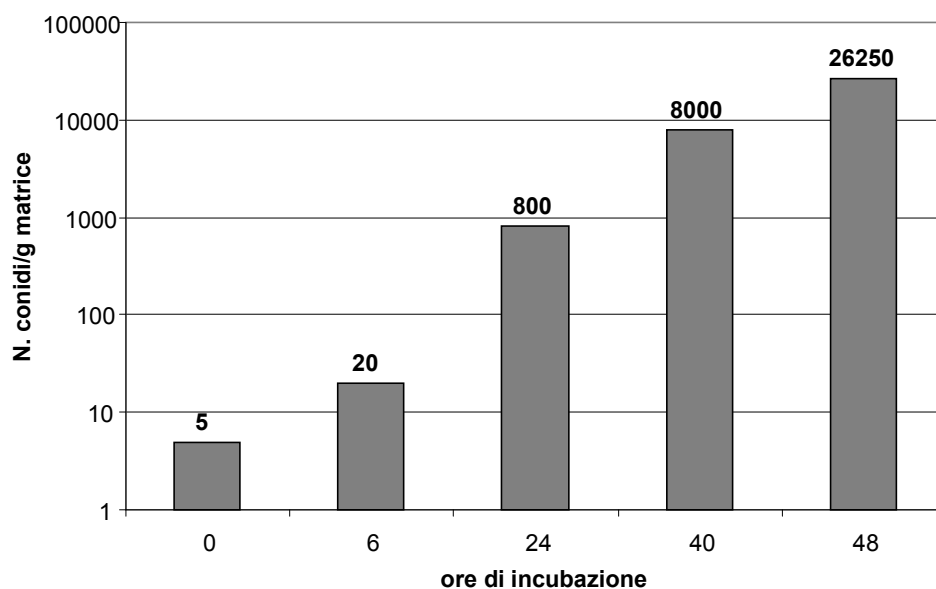


Figura 2. Numero di conidi presenti su grammo di bacca d'uva dopo 0, 6, 24, 40, 48 ore di incubazione a 30°C. Ciascuna bacca d'uva è stata inoculata con 1-5 conidi/10 µL. I valori sono il risultato di tre repliche in tre esperimenti indipendenti

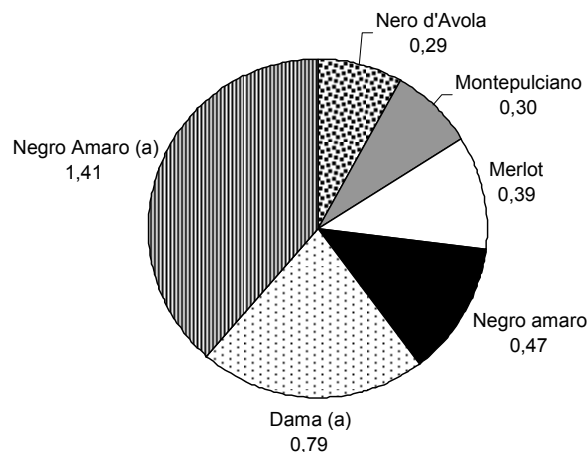


Figura 3. Quantificazione di DNA di *A. carbonarius* per tipologia di cultivar su campioni di uva raccolta che ad una ispezione visiva mostravano evidenti segni di marciume. Il DNA è stato quantificato usando la PCR *Real Time* con i primer *Acpsfor/Acpsrev2* e SYBR Green. I valori sono il risultato di tre repliche in tre esperimenti indipendenti

Conclusioni

La possibilità di controllare efficacemente le contaminazioni fungine, in particolare quelle da funghi micotossigeni, rappresenta uno dei principali obiettivi da perseguire in campo alimentare per ottenere alimenti di alta qualità. In tale contesto rientra questo studio che risponde all'esigenza di disporre di tecniche molecolari per il rilevamento tempestivo della presenza di *A. carbonarius* in bacca d'uva

I risultati ottenuti mostrano come le tecniche molecolari messe a punto in questo lavoro rappresentino un contributo concreto alla prevenzione dalla contaminazione fungina permettendo di individuare la presenza del fungo direttamente da bacca d'uva tal quale senza necessità di isolare precedentemente la microflora, identificarla e sottoporre ad estrazione il micelio fungino. Alle condizioni testate in questo lavoro la PCR *Real Time* ha permesso di individuare la presenza di *A. carbonarius* già a 6 h dopo l'inoculo cioè quando sono presenti solo 20 conidi per grammo di bacca (2) d'uva. L'elevata sensibilità dei primer testati e della PCR *Real Time*, è inoltre dimostrata dalla capacità del sistema di rilevare la presenza del fungo su campioni reali.

Bibliografia

1. Perrone G, Mule` G, Susca A, Battilani P, Pietri A, Logrieco A. Ochratoxin A Production and Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* Strains Isolated from Grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 2006;72:680-5
2. Selma MV, Martinez-Culebras PV, Aznar R. Real Time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 2008;122:126-34.