

la roridina E (RORE) sono state scelte per una più approfondita analisi quantitativa e vista la loro possibile tossicità, è stata effettuata altresì un'analisi su campioni vegetali artificialmente inoculati con i diversi patogeni isolati. Vista la diversa natura delle piante esaminate, sono state messe a punto diverse metodiche di estrazione, che permettessero di ottenere la migliore resa per le sostanze studiate.

Il NEO non è stato prodotto da nessun ceppo preso in esame *in vitro*, mentre VERA e RORE sono stati quantificati per tutti gli isolati e hanno mostrato una produzione media nei diversi isolati di 3,37 e 4,77 ppb, rispettivamente. Questi dati sono anche stati confermati dalle analisi *in vivo*, dove solo VERA e RORE sono state prodotte su rucola e spinacio.

### Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato svolto con un contributo del progetto EMPHASIS "Effective Management of Pests and Harmful Alien Species-Integrated Solutions" finanziato da European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant No. 634179)

### Lavori citati

ABBAS, H.K.; TAK, H.; BOYETTE, C.D.; SHIER, W.T.; JARVIS, B.B. (2001) - Macrocyclic trichothecenes are undetectable in kudzu (*Pueraria monata*) plants treated with high-producing isolate of *Myrothecium verrucaria*. *Phytochemistry*. 58, 269-276.

RIZWAN, M.P.; MUSADDIQ, M.; THAKARE, P.V.; KUMAR, A. (2015) - Characterization of bioactive compound isolated from *Myrothecium* spp. with UV, FTIR and HPLC analysis. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*. 3, 1-5.

## Messa a punto e validazione di un metodo di analisi per i metaboliti prodotti da *Penicillium* sp. su castagne e nocciole

Pietro Bosio\* - Ilenia Siciliano\* - Maria Lodovica Gullino\*,\*\* - Angelo Garibaldi\* - Davide Spadaro\*,\*\*

\* Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo Agroambientale AGROINNOVA – Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

\*\* Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali ed Alimentari DISAFA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

È noto come la frutta a guscio e le castagne e i prodotti da esse derivati possano essere naturalmente contaminati da micotossine. Molti studi su pistacchi, arachidi, mandorle, noci, castagne e nocciole hanno dimostrato che, in molti casi, il livello di micotossine supera i limiti posti dalla legge per i campioni commerciali (Abdulkadar *et al.*, 2000). Tra i diversi funghi, il genere *Penicillium* (Fig.1) è molto diffuso ed è stato spesso ritrovato su matrici di differente origine. Sono stati eseguiti numerosi studi riguardanti i metaboliti prodotti da specie differenti appartenenti al genere *Penicillium*; sono stati osservati diversi composti biologicamente attivi, quali alcaloidi, micotossine, antibiotici, allergeni, alcuni dei quali sono composti specie-specifici (Frisvad, 1987), che possono essere anche dannosi per la salute umana. È quindi indispensabile un metodo di analisi che permetta di valutare simultaneamente la presenza di più metaboliti in modo rapido e sensibile.

In questo studio è stata sviluppata la messa a punto di un metodo in cromatografia liquida ad alta pressione accoppiata ad uno spettrometro di massa tandem (HPLC-MS/MS) in grado di identificare e quantificare simultaneamente 21 metaboliti secondari prodotti da funghi del genere *Penicillium* ottenuti da castagne e nocciole.

Vista la diversa composizione nutrizionale, più glucidica per le castagne più lipidica per le nocciole, sono stati messi a punto due diversi protocolli di estrazione che permettano di estrarre tutti i metaboliti in esame simultaneamente. I metodi sono stati validati in termini di limite di determinazione (LOD), limite di quantificazione (LOQ), effetto matrice, linearità e recupero. Per valutare la bontà del metodo, castagne e nocciole sono state



Figura 1 - Sintomi causati da *Penicillium crustosum* inoculato su castagna.

Figure 1 - Symptoms caused by *Penicillium crustosum* inoculated on chestnut.

artificialmente inoculate con sei differenti specie di *Penicillium* (*P. crustosum*, *P. bialowiezense*, *P. glabrum*, *P. expansum*, *P. solitum* e *P. brevicompactum*).

Le sei diverse specie utilizzate per le inoculazioni hanno, secondo i dati da letteratura, profili metabolici differenti e sono quindi in grado di produrre solo alcuni degli analiti in esame. In generale, tutti i campioni sono risultati positivi alla presenza degli analiti notoriamente prodotti da ciascuna specie. In particolare, la micotossina roquefortina C è stata prodotta dagli isolati di *P. bialowiezense*, *P. crustosum* e *P. brevicompactum* anche in concentrazioni molto elevate su entrambe le matrici. La produzione di questo analita su castagna è risultata essere fino a 100 volte superiore rispetto a quella su nocciola. L'acido micofenolico, notoriamente prodotto da *P. bialowiezense* e *P. brevicompactum* è stato effettivamente rivelato in entrambe le matrici.

Il metodo potrebbe quindi permettere di estrarre e quantificare gli analiti anche in campioni naturalmente contaminati, rendendo possibile così una rapida valutazione della commerciabilità dei prodotti.

### Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato svolto con un contributo del progetto *Tecnologie innovative per garantire la qualità e la sicurezza delle castagne piemontesi - INNO-CHEST'*, finanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Torino.

### Lavori citati

ABDULKADAR, A.H.W.; AL-ALI, A.; AL-JEDAH, J. (2000) - Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control*. 11, 157-160.  
FRISVAD, J.C. (1987) - High performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Journal of Chromatography*. 392, 333-347.

## Sviluppo di LAMP come metodo per l'identificazione di *Pythium ultimum* in campo

Sara Franco Ortega\* - Giovanna Gilardi\* - Davide Spadaro\*<sup>\*\*\*</sup> - Maria Lodovica Gullino\*<sup>\*\*\*</sup> - Angelo Garibaldi\*

\*Centro di Competenza per l'Innovazione in campo agro-ambientale AGROINNOVA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

\*\*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali ed Alimentari, DISAFA -Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

Le tecniche di amplificazione di acidi nucleici si usano nel campo della diagnosi data la loro velocità, specificità e semplicità. La LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) permette l'amplificazione di poche copie di DNA in meno di un'ora in condizioni isoterme, con alta sensibilità e specificità per il target usato (Notomi *et al.*, 2000).

Questa tecnica permette di determinare la presenza del patogeno basandosi sull'amplificazione di un DNA target, utilizzando 6 diversi primer (F3, B3, loopF, loopB, FIP and BIP) progettati su otto regioni vicine all'interno della regione scelta. La rivelazione del prodotto positivo può essere visualizzata usando gel di agarosio, turbidimetria o attualmente con tecniche più avanzate come la real time PCR. Gli strumenti Genie II/Genie III permettono in meno di mezz'ora di determinare la presenza del patogeno in campo dopo un'estrazione veloce del DNA, e costituiscono un grande vantaggio per il monitoraggio dei patogeni in campo.

*Pythium ultimum* appartiene alla famiglia Pythiaceae, nella classe Oomycota. Fa parte del gruppo I della classificazione del genere *Pythium* (Lévesque e De Cock, 2004) ed è l'agente responsabile di marciumi radicali in diverse colture economicamente importanti.

I primer per lo sviluppo della LAMP per la determinazione di *Pythium ultimum* sono stati progettati sulla regione che codifica per la beta-tubulina (Btub). (Fig.1). Per determinare la specificità dell'amplificazione sono state utilizzate specie filogeneticamente vicine a *Pythium ultimum*, tra cui *P. irregulare*, *P. aphanidermatum*, *P.*

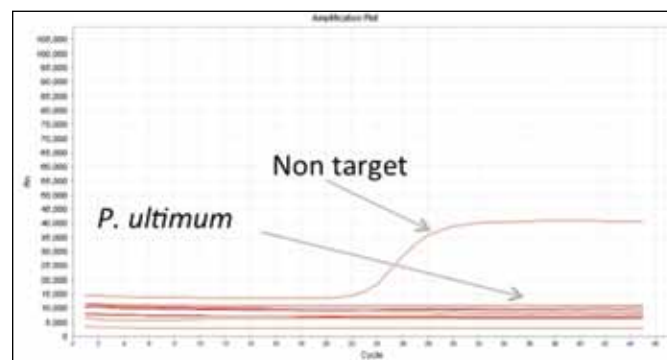


Figura 1 - LAMP sviluppata per l'identificazione di *Pythium ultimum*. I primer sono stati progettati sul gene della beta tubulina.

Figure 1 - LAMP carried out by Real Time PCR, for the detection of *Pythium ultimum*. Primers were designed based on beta tubulin sequence.