

Genomica e HPLC-MS/MS per esplorare il potenziale micotossigeno di *Penicillium* spp.

Silvia Valente^{*,**} - Edoardo Piombo^{*,**} - Simona Prencipe^{**} - Giovanna Roberta Meloni^{*} - Maria Lodovica Gullino^{*,**} - Angelo Garibaldi^{*} - Toni Gabaldón^{***} - Davide Spadaro^{*,**}

^{*}Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo agro-ambientale (Agroinnova) – Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)

^{**}Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DiSAFA) – Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)

^{***}Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcellona, 08003, Spagna

Lo studio dell'occorrenza e del potenziale micotossigeno di specie appartenenti al genere *Penicillium* isolate lungo la filiera castanicola (Prencipe *et al.*, 2018), ha rivelato che molte delle specie isolate sono potenzialmente in grado di produrre micotossine ed altri metaboliti secondari tossici.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di esplorare il

potenziale micotossigeno di alcune delle specie isolate, selezionate fra quelle ancora non sequenziate, virulente su castagna e in grado di produrre numerose micotossine *in vitro*. In particolare, sono state prese in considerazione le specie *P. bialowiezense*, *P. crustosum*, *P. discolor*, *P. glandicola*, *P. manginii*, *P. palitans*, *P. pancosmium*, *P. polonicum* e *P. viridicatum* (Fig. 1).

La capacità degli isolati fungini selezionati di produrre patulina, ocratossina A, penitrem A, roquefortina C, meleagrina, glandicolina A e B, acido micofenolico, verrucosidina, andrastina A e acido penicillico *in vitro*, è stata verificata utilizzando HPLC-MS come metodo analitico. I ceppi selezionati sono stati fatti crescere in due terreni induttivi, CYA (Czapek Yeast Autolysate) brodo e YES (Yeast Extract Sucrose) brodo, e incubati a 25°C e 55% di umidità relativa, con 12 ore di luce e di buio. Le micotossine sono state estratte sia dal micelio fungino sia dal terreno culturale 3, 7, 10 e 14 giorni dopo l'inoculazione. Dai risultati ottenuti è emerso che entrambi i terreni inducono la produzione di micotossine, tuttavia quasi tutte sono state ottenute in maggior quantità in CYA. Dopo 10 e 14 giorni dall'inoculazione sono state estratte micotossine in maggiore quantità e infine, dal micelio fungino sono state isolate un maggior numero e una maggiore quantità di micotossine rispetto al terreno culturale.

Il potenziale micotossigeno delle specie può essere sottostimato seguendo la sola analisi di produzione *in vitro*, in quanto diversi fattori, oltre all'umidità, alla luce e al terreno di crescita, possono influenzare la biosintesi che spesso non viene attivata nelle normali condizioni di crescita in capsula (Brakhage, 2013). Per questo motivo è stata svolta un'analisi del genoma dei ceppi selezionati, alla ricerca dei geni per la biosintesi di metaboliti secondari.

Le specie sono state sequenziate tramite sequenziamento *high throughput* (Illumina MySeq), presso il Centre for Genomic Regulation (CRG) di Barcellona, ottenendo genomi di dimensioni comprese tra 28,4 Mb (*P. glandicola*) e 36.8 Mb (*P. manginii*) tramite assemblaggio con il programma "SPAdes". Il numero di scaffold ottenuti era compreso tra 113 e 1219 per ogni specie, un numero adatto a condurre analisi di genomica comparativa. L'utilizzo del programma "MAKER" ha poi permesso di predire la presenza, per ogni genoma, di un numero compreso tra i 9090 e i 10583 geni. Nei funghi spesso i geni coinvolti nella produzione di un determinato metabolita secondario sono localizzati uno vicino all'altro nei genomi, a formare i così detti "cluster genici", delle unità che sono state individuate nei genomi di *Penicillium* di interesse tramite l'applicazione del programma "antiSMASH" (Weber *et al.*, 2015), che ha predetto tra i 110 e 149 cluster per ogni genoma.

Questo lavoro ha portato al sequenziamento di otto nuove specie di *Penicillium* in grado di produrre numerose micotossine *in vitro*. L'analisi genomica ha evidenziato la presenza di un elevato numero di

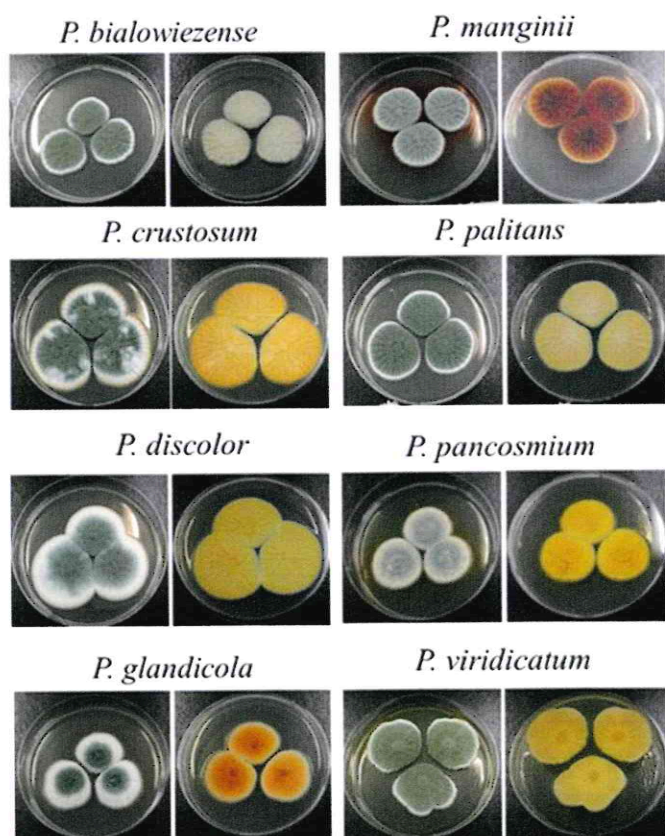


Figura 1 - Morfologia (fronte e retro delle colonie) delle specie di *Penicillium* sequenziate. Le immagini sono state ottenute dopo 7 giorni di crescita a 25°C al buio, su terreno YES Agar.

Figure 1- Morphology (top and reverse of colonies) of sequenced *Penicillium* species. The photos have been taken after 7 days of growth at 25°C in the dark. The chosen medium was YES Agar.

cluster per metaboliti secondari che, in condizioni favorevoli, possono essere attivati e portare alla biosintesi di molecole potenzialmente tossiche per l'uomo. Mediante analisi di genomica comparativa sarà possibile associare ai vari cluster identificati un metabolita secondario prodotto e quindi comprendere l'esatto potenziale micotossigeno delle specie considerate.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato svolto con il contributo del progetto "AFLACHEST" (PSR FEASR 2007/2013, Fondo Europeo per lo Sviluppo Rurale, Misura 124, Azione 1) finanziato dalla Regione Piemonte

Lavori citati

- BRAKHAGE A. A. (2013) - Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 21.
- PRENCIPE S., SICILIANO I., GATTI C., GARIBALDI A., GULLINO M. L., BOTTA R., SPADARO D. (2018) - Several species of *Penicillium* isolated from chestnut flour processing are pathogenic on fresh chestnuts and produce mycotoxins. *Food microbiology*, 76, 396-404.
- WEBER T., BLIN K., DUDELA S., KRUG D., KIM H. U., BRUCCOLERI R., LEE S. Y., FISCHBACH M. A., MÜLLER R., WOHLLEBEN W., BREITLING R., TAKANO E., MEDEMA M. H. (2015) - antiSMASH 3.0 - a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic acids research*, 43, 237-243