

# Sviluppo di nanobiosensori a DNA per il rilevamento di *Venturia inaequalis* tramite captaspore

Simona Prencipe\*\*\* - Roberta Calmo\*\*\* - Maria Lodovica Gullino\*\*\* - Angelo Garibaldi\* - Davide Spadaro\*\*\* - Carlo Ricciardi\*\*\*

\*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)

\*\*\*Dipartimento di Scienze e Tecnologie applicate DISTAT - Politecnico di Torino - Torino.

Una delle principali malattie del melo è la ticchiolatura causata dall'ascomicete *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint. La gestione della malattia è legata principalmente all'utilizzo di fungicidi, il cui impiego è deciso spesso

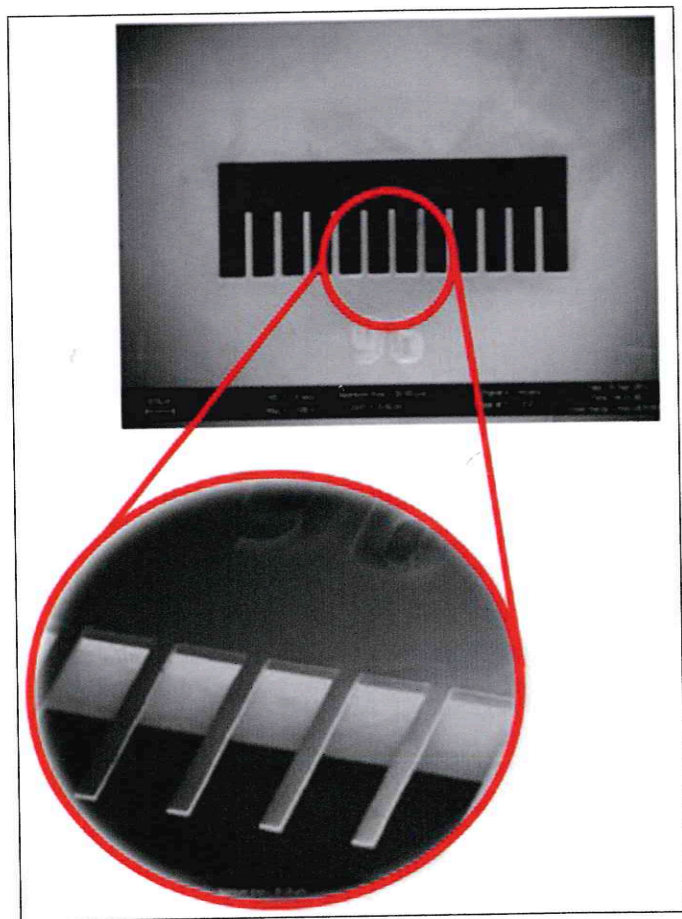


Figura 1 - Diagramma schematico di un sensore microcantilever utilizzato per sviluppare un nanobiosensore altamente sensibile per il rilevamento label-free in tempo reale.

Figure 1 - Schematic diagram of a microcantilever sensor used to develop a highly sensitive nanobiosensors able to perform label-free detection in real time.

tramite l'utilizzo di modelli matematici come il RIMpro, che permettono di stimare le infezioni di ticchiolatura calcolando il livello di gravità delle infezioni, analizzando ad esempio dati meteorologici come temperatura e umidità fogliare, e tramite l'utilizzo di captaspore (González-Domínguez *et al.*, 2017). L'utilizzo di queste metodologie a supporto della difesa spesso si rivela laborioso e dispendioso, soprattutto in termini di tempo, e risulta quindi evidente la necessità dello sviluppo di strumenti di rilevamento rapidi, economici e affidabili per la programmazione tempestiva dei trattamenti in campo.

Negli ultimi dieci anni l'utilizzo delle nanotecnologie nel settore agricolo ha permesso di sviluppare dispositivi e materiali utili alla diagnostica fitopatologica e alla lotta ai patogeni (Rai *et al.*, 2012; Ismail *et al.*, 2017). Una delle innovazioni più interessanti in questo campo è rappresentata dai nanosensori (Fig. 1) Micro Electro-Mechanical Systems (MEMS), come i Microcantilevers (MCs), che sono strumenti in grado di eseguire in tempo reale rilevazioni label-free, ossia misurazioni del target senza utilizzo di altre molecole segnale, ad alta specificità e sensibilità (Prasad *et al.*, 2017).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare e confrontare l'utilizzo di microcantilever e di microparticelle in silice mesoporosa (MPs), da soli o in associazione, come supporto per il rilevamento di DNA di *V. inaequalis* per future applicazioni di queste tecnologie in campo.

Per il saggio di rilevamento sono stati analizzati campioni di DNA fungino di *V. inaequalis* e DNA totale estratto da foglie con sintomi di ticchiolatura. Il saggio ha previsto una prima fase di ottimizzazione del processo di immobilizzazione su MPs e MCs di una sonda a DNA, disegnata sul fattore di allungamento trascrizionale (TEF 1-alpha) di *V. inaequalis*, e del processo di ibridazione della sequenza target sintetica per valutare sensibilità, specificità e ripetibilità dei due sistemi di rilevamento. Dall'ottimizzazione del processo di immobilizzazione è stata stabilita la concentrazione di sonda da immobilizzare per entrambi i sistemi diagnostici, tempi e volumi di incubazione, e la tipologia di agenti passivanti: siero albumina bovina e cisteina. L'utilizzo di albumina bovina ha garantito la miglior repressione del segnale aspecifico, in particolare per quanto riguarda il suo utilizzo nel saggio su MPs. L'analisi del limite di rilevamento, utilizzando DNA target di *V. inaequalis*, per i due saggi ha mostrato una maggiore sensibilità della tecnologia MPs con una maggiore densità di DNA target ibridato (LOD: 5 pM) rispetto all'utilizzo di MCs.

Il saggio diagnostico basato su MCs è stato successivamente utilizzato per il rilevamento del DNA di *V. inaequalis* estratto da campioni di foglie colpite da ticchiolatura e DNA da cultura pura, ed è risultato in grado di rilevare in modo specifico il DNA del patogeno, anche se in presenza di un elevato segnale di fondo, in un saggio su tre.

In una ultima fase sono state effettuate delle prove preliminari utilizzando in combinazione i due sistemi diagnostici per il rilevamento di *V. inaequalis*. Tuttavia si evidenzia la necessità di un'ulteriore ottimizzazione del saggio a causa della variabilità dei segnali registrati e di un elevato segnale di fondo nell'analisi di campioni

naturalmente colpiti di ticchiolatura.

In conclusione, i risultati ottenuti su DNA genomico di *V. inaequalis* evidenziano le potenzialità dell'utilizzo di queste tecnologie per il rilevamento di patogeni in pieno campo, ma saranno necessari ulteriori saggi di ottimizzazione per permettere l'utilizzo della combinazione dei due sistemi diagnostici MPs e MCs per un rilevamento specifico e in tempo reale, con assenza di interferenti del segnale in presenza di campioni complessi.

#### Ringraziamenti

Lavoro svolto con il contributo del progetto "FRUITSENSOR- Tecnologie convergenti per una frutticoltura di precisione sostenibile", finanziato da Cassa di Risparmio di Cuneo.

#### Lavori citati

- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ E., ARMENGOL J., ROSSI V. (2017) - Biology and epidemiology of *Venturia* species affecting fruit crops: A review. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1496.
- ISMAIL M., PRASAD R., IBRAHIM A. I. M., AHMED I. S. A. (2017) - Modern prospects of nanotechnology in plant pathology. In: *Nanotechnology* (Prasad R., Kumar M., Kumar V. coord.), Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, 305-317.
- PRASAD R., BHATTACHARYYA A., NGUYEN Q. D. (2017) - Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1014.
- VINEETA R., SEFALI A., NRISINGHA D. (2012) - Implications of Nanobiosensors in Agriculture. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3, ID:18992,10.

## Presenza di funghi potenzialmente micotossigeni su campioni di pastone integrale di mais in aziende piemontesi di bovine da latte

Simona Precipe\*\*\* Francesco Ferrero\*\* - Ernesto Tabacco\*\* - Giorgio Borreani\*\* - Maria Lodovica Gullino\*\*\* - 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)

Una delle recenti emergenze fitosanitarie per la produzione di alimenti zootecnici è legata alla presenza di funghi fitopatogeni e micotossigeni, che influiscono sulla qualità e sulla sanità della razione alimentare, e che determinano un potenziale rischio di contaminazione da micotossine. Una delle matrici utilizzate per la produzione di alimenti zootecnici è il mais, raccolto come pastone di spiga integrale (granella e tutolo) e solitamente conservato in sili orizzontali per lunghi periodi. La conservazione avviene grazie alla presenza di batteri lattici che in ambiente anaerobico acidificano il prodotto rendendo l'ambiente poco favorevole alla crescita fungina (Muck *et al.*, 2018). All'apertura, durante il consumo, il silo è esposto all'aria e, dopo una prima fase di stabilità inizia la crescita di microrganismi aerobici (lieviti e funghi) che deteriorano il prodotto con conseguente sviluppo delle specie micotossigene e la produzione di micotossine (Fink-Gremmels, 2008).

La comunità fungina presente sugli insilati di pastone è rappresentata da numerose specie appartenenti ai generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* in grado di produrre un elevato numero di metaboliti secondari (Spadaro *et al.*, 2015). Di particolare importanza risultano le specie *Aspergillus flavus*, responsabile della produzione di aflatossine e il patogeno umano *A. fumigatus*, presenti in elevate concentrazioni in zone soggette a deterioramento aerobico (Ferrero *et al.*, 2018). La conoscenza delle dinamiche microbiologiche, nelle diverse fasi del processo di insilamento, (Fig. 1) necessita quindi di studi



Figura 1 - Trincea aziendale di pastone integrale di mais.  
Figure 1 - Bunker silo of high moisture corn.