

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

DIPARTIMENTO AGRICOLTURA, AMBIENTE E ALIMENTI



**Dottorato di Ricerca in Difesa e
Qualità delle Produzioni Agroalimentari e Forestali
XXV ciclo
S.S.D.MUR: AGR/12**

La biodiversità dei lieviti rosa nella degradazione della patulina

Relatore

Chiar.mo Prof. Vincenzo De Cicco

Dottoranda

Angela Valente

Matricola 141434

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Pasquale Trematerra

anno accademico 2011/2012

Indice

Riassunto.....	4
Abstract.....	5
1. Introduzione.....	6
2. Agenti patogeni di natura fungina.....	10
2.1 Micotossine.....	11
2.1.1 Micotossicosi.....	14
2.1.2 Interventi contro le micotossine.....	15
3. Patulina.....	18
3.1 Tossicità della patulina.....	20
3.2 Limiti di tolleranza della patulina.....	22
3.3 Strategie per ridurre i livelli di contaminazione da patulina.....	24
4. Lotta ai patogeni fungini in postraccolta.....	26
4.1 Mezzi fisici.....	26
4.2 Mezzi chimici.....	27
4.3 Mezzi biologici.....	31
4.3.1 Meccanismi d'azione degli antagonisti.....	35
4.3.2 Principali antagonisti in postraccolta.....	37
4.3.3 Lotta biologica in preraccolta.....	40
4.3.4 Utilizzazione di microrganismi antagonisti.....	41

4.3.5 Miglioramento dell'efficacia degli antagonisti.....	42
4.3.6 Biodiversità dei lieviti.....	43
4.4 Integrazione dei diversi mezzi di lotta.....	47
5. Scopo della ricerca.....	50
6. Materiali e metodi.....	53
6.1 Microrganismi.....	53
6.2 Substrati colturali.....	54
6.3 Reagenti chimici.....	56
6.4 Estrazione del DNA genomico dei lieviti rosa.....	58
6.4.1 Quantificazione del DNA genomico dei lieviti rosa.....	60
6.4.2 Amplificazione delle regioni ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>).....	60
6.4.3 Purificazione dei prodotti PCR.....	61
6.4.4 Digestione dei prodotti PCR con enzima di restrizione <i>HinfI</i>	62
6.5 Saggi di degradazione della patulina.....	63
6.6 Metabolita intermedio derivante dalla degradazione della patulina da parte del lievito <i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> LS11.....	67
7. Risultati.....	72
7.1 Analisi RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	72
7.2 Identificazione tassonomica	73
7.3 Saggi di degradazione della patulina.....	74

7.4 Metabolita intermedio derivante dalla degradazione della patulina da parte del lievito <i>R. kratochvilovae</i> LS11.....	75
8. Discussione	77
9. Conclusioni	85
10. Tabelle	87
11. Grafici	92
12. Figure	98
13. Bibliografia	106
Ringraziamenti.....	124

Riassunto

La patulina è una micotossina prodotta dal patogeno fungino *Penicillium expansum* responsabile del marciume verde-azzurro delle mele durante la conservazione postraccolta. La patulina è tossica per un'ampia gamma di organismi, uomo, animali, funghi e batteri. Gli agenti di lotta biologica (BCA) rappresentano un'alternativa o un'integrazione ai mezzi chimici per il controllo delle malattie. A tal riguardo numerose ricerche hanno dimostrato che l'uso di lieviti epifiti rappresenta un'interessante strategia per il controllo delle malattie. Le specie di lieviti sono un'enorme fonte di biodiversità genetica e biotecnologica. In questo lavoro sono stati studiati i lieviti rosa isolati dalla fillosfera e dalla carposfera di piante in sei differenti zone del centro-sud Italia. Sono stati purificati, catalogati e classificati utilizzando il metodo di analisi *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) delle sequenze di rDNA delle regioni ITS (*Internal Transcribed Spacer*). I risultati hanno mostrato l'esistenza di almeno dieci diversi profili RFLP (dieci diversi *cluster*) tra gli isolati. Il confronto delle sequenze nucleotidiche ottenute dall'amplificazione delle regioni ITS con quelle presenti nei database hanno portato ad una prima probabile identificazione tassonomica dei lieviti rosa studiati in questo lavoro. I generi *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Rhodosporidium* spp., che in letteratura scientifica sono noti per le loro caratteristiche funzionali all'attività antagonistica e/o degradativa di metaboliti tossici, risultano maggiormente rappresentati tra gli isolati della collezione rispetto agli altri generi *Erythrobasidium*, *Sporidiobolus* e *Aureobasidium* spp., meno rappresentati. Gli isolati sono stati esaminati per la loro crescita *in vitro* in presenza di patulina e per la loro capacità di ridurre la concentrazione della micotossina nel mezzo colturale in condizioni aerobiche. Tra questi, quarantotto sono sopravvissuti in presenza della tossina. Analisi *Thin-layer chromatography* (TLC) hanno mostrato la comparsa di due spot principali, con *R_f* di 0.46 e di 0.25, ciò suggerisce la possibile metabolizzazione della micotossina. I risultati di questo studio potranno essere utili per future ricerche nella prevenzione o nella detossificazione della contaminazione da patulina nei prodotti derivati da pomacee.

Abstract

The mycotoxin patulin is produced by the blue mould pathogen *Penicillium expansum* in rotting apples during postharvest storage. Patulin is toxic to a wide range of organisms, including humans, animals, fungi and bacteria. Biocontrol agents (BCAs) are an alternative or a supplement to chemical means of disease control. In this regard numerous studies have demonstrated that the use of epiphytic yeasts is an interesting strategy in disease control. Yeast species represent an enormous source of genetic and biotechnological biodiversity. Pink yeasts isolated from phyllosphere and carposphere of plants in six different locations in southern-central Italy were studied in this work. They were purified, cataloged and classified making use of the *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) method on the rDNA sequence of the *Internal Transcribed Spacer* (ITS) regions. The results have shown at least ten different RFLP profiles (ten different *clusters*) among isolates. The comparison of the nucleotide sequences obtained by amplifying the ITS regions with those present in the databases have led to a first probable taxonomic identification of the pink yeasts studied in this work. *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Rhodosporidium* spp., that in the scientific literature are known for their functional characteristics in antagonistic activity and or in degrading toxic metabolites were the most represented genera among isolates of the collection compared to the genera *Erythrobasidium*, *Sporidiobolus*, e *Aureobasidium* spp. which were less represented. Isolates were examined for their *in vitro* growth in the presence of patulin and for their capacity to reduce the concentration of the mycotoxin in the medium in aerobic conditions. Forty-eight of them survived in the presence of the toxin. *Thin-layer chromatography* (TLC) analysis showed the appearance of two major spots, with *R_f* of 0.46 and 0.25, suggesting a possible metabolization of the mycotoxin. The results of this study may be useful for future research for the prevention or the detoxification of patulin contamination in pome fruit-based products.

1. Introduzione

L'agricoltura è chiamata a fronteggiare una richiesta sempre maggiore di derrate alimentari per soddisfare le esigenze di una popolazione in costante aumento. Stime delle Nazioni Unite prevedono infatti che la popolazione mondiale raggiungerà circa sette miliardi di persone nel 2015 e si attesterà a circa nove miliardi nel 2050. Il ruolo dell'agricoltura non si limita solo alla funzione produttiva di materie prime (alimentari e non) ma riguarda anche aspetti sociali ed economici. La maggior parte delle risorse alimentari sono utilizzate dalle popolazioni dei Paesi sviluppati, numericamente inferiori a quelle dei restanti Paesi; per questi ultimi le ripercussioni sociali ed economiche, dipendenti dalle loro produzioni agricole, possono essere molto rilevanti. Un'ulteriore considerazione riguarda l'attenzione sempre crescente dei consumatori alla qualità dei prodotti alimentari; si richiede una produzione che riesca a fornire frutta e verdura con proprietà nutrizionali elevate, con buone caratteristiche organolettiche a costi accettabili. Senza dubbio aumentare la produzione è importante ma lo è altrettanto ridurre le perdite dei prodotti, sia nella fase produttiva sia in quella postraccolta. In questo modo infatti si riducono i costi energetici (concimi, fitofarmaci, combustibili, ecc.) e l'inquinamento ambientale connesso alla produzione. Negli ultimi decenni l'agricoltura ha dovuto adeguarsi alle mutate esigenze dei mercati. La commercializzazione prolungata e costante dei prodotti raccolti in grande quantità e in un breve intervallo temporale richiede una conservazione di settimane o mesi; in questa fase la possibilità che si verifichino alterazioni dovute agli attacchi di microrganismi patogeni è alta. Migliorare le fasi di conservazione e di stoccaggio, riducendo gli scarti, può rivelarsi economicamente più conveniente rispetto all'aumento delle quantità

prodotte. Questo è ancor più importante nei Paesi tropicali dove solo in minima parte i prodotti sono trasformati mentre in larga parte sono esportati verso Paesi industrializzati.

In alcuni casi gli attacchi da parte dei microrganismi fitopatogeni hanno assunto proporzioni estremamente importanti e provocato gravi carestie; un esempio è quello della peronospora della patata nel 1830-1840 in Irlanda, che ha distrutto il 100% del raccolto su grandissime estensioni e ha fatto registrare circa 250 mila persone morte di fame ed altrettante di malattia ed un milione e seicentomila di emigrati in altri Paesi, con gravi conseguenze economiche, sociali e politiche. La peronospora della patata nell'inverno 1916-1917 in Germania ha provocato la perdita di 14 milioni di tonnellate di patate e nello stesso anno in Francia ha ridotto il raccolto dell'80%. Altro esempio è l'attacco di oidio sulla vite in Francia che ha provocato la riduzione della produzione da 42 milioni di ettolitri nel 1850 a poco più di 10 milioni di ettolitri nel 1854 e ancora, nel 1910 e 1915, sempre in Francia, perdite del 40% e del 60% della produzione. Numerosi sono i casi eclatanti che si sono verificati nel corso della storia. Gli attacchi diventano particolarmente violenti in determinate località ed in determinati periodi: le ruggini dei cereali in certe annate possono causare decurtazioni di prodotto dal 30-40% al 100%; certe affezioni radicali in fase di primo insediamento annientano l'intera coltura (attacchi di *Sclerotinia* sugli ortaggi, di *Pythium* nei semenzai, ecc.) e le infezioni crittogamiche in particolari condizioni climatiche attaccano in modo quasi totalitario sia la vegetazione che il prodotto (ticchiolatura delle pomacee, mal bianco del grano, cercospora della barbabietola, ecc.). Gli effetti delle malattie delle piante non determinano solo una riduzione del reddito dell'azienda agricola ma anche conseguenze in campo sociale, demografico, politico, finanziario

ed industriale. Eventi di grandi proporzioni accadono sempre più raramente nei Paesi con agricoltura più evoluta, mano a mano che aumentano le conoscenze sulla natura e sulla prevenzione delle malattie. Al contrario, negli ambienti nei quali il livello sociale ed organizzativo e le condizioni climatiche e pedologiche favoriscono grandiose manifestazioni degli effetti delle malattie delle piante si può arrivare addirittura a profonde trasformazioni della flora e fauna locali: nell'isola di Ceylon, uno dei centri di esportazione del caffè arabico, dal 1874 e per i dieci anni successivi la produzione è stata annientata da attacchi di ruggine e l'agricoltura si è orientata verso il the ed il cacao (Goidànich, 1975).

La malattia, in una definizione di ordine generale, può considerarsi come una deviazione, operata da fattori animati ed inanimati, nello stato di armonia nello svolgimento delle funzioni vitali (di ricambio e di sviluppo) dell'organismo. Stato di armonia che in ciascun organismo è assicurato da un potere di autoregolazione, cioè da una naturale capacità di mantenere in equilibrio i meccanismi ed i processi che garantiscono la normalità delle sue forme e delle sue funzioni (Goidànich, 1975). Le tre variabili che determinano se una malattia infettiva si verifica o meno sono: la costituzione genetica dell'ospite, la costituzione genetica del patogeno e la carica di inoculo, il complesso di fattori ambientali che influenzano il patogeno e l'ospite (Salerno, 2009).

L'esigenza di disporre di nuove strategie di lotta contro i patogeni di origine fungina che colpiscono le piante di interesse agrario rappresenta un argomento estremamente attuale. Nonostante l'evoluzione delle pratiche agricole e la disponibilità di innovative tecnologie di conservazione, le perdite in termini di quantità e di qualità delle produzioni agrarie si rivelano, sia in campo che in postraccolta, ancora elevate. Negli USA nella

fase postraccolta della frutta sono stimate in percentuali dall'1 al 20%, a seconda del prodotto (Janisiewicz e Korsten, 2002). Nel settore postraccolta le moderne tecnologie di conservazione e l'uso di fungicidi hanno prolungato la *shelf life* dei prodotti conservati, tuttavia risultano ancora alte le perdite che in questa fase sono dovute alle alterazioni di origine microrganica e che raggiungono circa il 20-25% della produzione agricola mondiale (El-Ghaouth *et al.*, 2004; Droby, 2006; Zhu, 2006; Singh e Sharma, 2007). Sebbene i fungicidi siano tuttora un importante mezzo di lotta contro gli agenti patogeni che provocano i marciumi in postraccolta (Janisiewicz e Korsten, 2002, El-Ghaouth *et al.*, 2004; Korsten, 2006; Singh e Sharma, 2007; Zhu, 2006; Sharma *et al.*, 2009) le considerazioni in merito all'insorgenza di fenomeni di resistenza tra i patogeni, alle possibili ripercussioni ambientali ed igienico-sanitarie, alla indisponibilità di nuove sostanze attive per formulazioni alternative e la scarsità di prodotti autorizzati soprattutto per trattamenti in prossimità della raccolta o in postraccolta e la preoccupazione da parte dei produttori e dei consumatori per possibili residui chimici nei prodotti alimentari stanno orientando verso la ricerca di soluzioni alternative e/o integrabili all'uso dei fungicidi e che risultino efficaci, economicamente accettabili e che garantiscano una maggiore sicurezza per la salute del consumatore (Gullino, 1994; Gullino e Kuijpers, 1994; Mari *et al.*, 2007). In tale contesto la lotta biologica può rappresentare una valida alternativa alla lotta chimica mediante l'impiego di microrganismi isolati da superfici vegetali (carposfera, fillosfera) o dal suolo e capaci di contrastare l'attività dei funghi fitopatogeni (Wilson e Wisniewski, 1989; Droby *et al.*, 1992; Wisniewski e Wilson, 1992; Droby, 2006; Korsten, 2006; Castoria *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009).

2. Agenti patogeni di natura fungina

Tra gli agenti patogeni più importanti in agricoltura, i funghi rivestono un ruolo di primo piano. Si tratta di organismi eucarioti, eterotrofi e largamente diffusi negli ecosistemi terrestri ed in alcuni acquatici, con attività che vanno dalla produzione di antibiotici alla capacità di decomporre materia organica, alla simbiosi con piante (micorrizzazione). Nel settore agricolo le malattie di origine fungina determinano gravi danni economici e possono manifestarsi sia durante la coltivazione in campo, sia negli stadi successivi. Nella fase postraccolta le malattie di origine microrganica causano un danno economico notevole e possono essere di origine batterica o fungina. Sono numerose le specie di funghi responsabili delle infezioni dei frutti. Nella maggioranza dei casi i sintomi consistono nella decolorazione e distruzione dei tessuti infetti, con formazione di evidenti lesioni, comunemente sotto forma di marciumi. Questi patogeni possono colpire in ogni fase del processo produttivo, dal campo alla raccolta, durante le operazioni di lavorazione, conservazione, trasporto e commercializzazione. L'incidenza e lo sviluppo delle malattie postraccolta è determinata da diversi fattori: la suscettibilità della specie/cultivar, l'abbondanza dell'inoculo e la virulenza del patogeno, le tecniche di coltivazione, lo stato di maturazione del prodotto, le condizioni ambientali alla raccolta e quelle in fase postraccolta. Spesso le infezioni restano latenti e si riattivano dopo un tempo variabile quando i patogeni riprendono la loro attività patogenetica provocando marciumi. I patogeni fungini principalmente responsabili di marciumi in postraccolta appartengono soprattutto ai phylum ascomiceti (*Monilinia* spp., *Sclerotinia* spp.), zigomiceti (*Rhizopus* spp., *Mucor* spp.), deuteromiceti o funghi imperfetti (*Monilia* spp., *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium*

spp.) e con minore frequenza agli Oomiceti (*Pythium* spp., *Phytophthora* spp.), ai Basidiomiceti e ad alcune specie batteriche (Lima e De Cicco, 2009).

2.1 Micotossine

Le micotossine sono composti tossici prodotti dal metabolismo secondario di alcune specie di funghi. Esse rappresentano il punto finale di una serie di reazioni, catalizzate da enzimi, a partire da composti del metabolismo primario; il substrato di crescita e le condizioni ambientali giocano un ruolo importante nella biosintesi delle micotossine, caratterizzate da vari livelli di tossicità (Bourgeois *et al.*, 1990). Si tratta di molecole a basso peso molecolare difficili da definire e classificare data la loro diversa struttura chimica e origine biosintetica, gli innumerevoli effetti biologici che determinano e la grande varietà di specie di funghi che le producono (Bennett e Klich, 2003).

Nonostante esse siano tuttora oggetto di numerosi studi, non è stato ancora del tutto chiarito il loro ruolo nel ciclo vitale fungino. Si ipotizza che siano coinvolte nei meccanismi di competizione microbica, esercitando la loro azione antibiotica verso i microrganismi competitori, oppure che rivolgano la loro azione attaccando direttamente i tessuti vegetali dell'ospite (Manners, 1993; Matta *et al.*, 1996, Castoria *et al.*, 2008).

Le micotossine conosciute ammontano a più di 300. Le aflatossine, i tricoteceni, lo zearalenone, le fumonisine, le ocratossine e la patulina sono, per la loro tossicità, tra quelle più importanti. Le specie fungine più rilevanti per la loro diffusione e per la pericolosità delle micotossine prodotte appartengono ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*,

Claviceps e *Alternaria*. Nel caso dei generi *Fusarium* e *Alternaria* l'attività micotossicologica può riguardare soprattutto, ma non solo, la fase preraccolta mentre per i generi *Aspergillus* e *Penicillium* interessa principalmente la fase postraccolta (Matta *et al.*, 1996; Dragoni *et al.*, 2000; Bottalico, 2002). Nel settore ortofrutticolo sono soprattutto le specie appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria* quelle di maggiore interesse, responsabili della produzione di aflatossine, ocratossina A, patulina, acido tenuazonico, alternarioli, altertossine (Battilani *et al.*, 2008). La produzione di micotossine è influenzata da fattori endogeni (il diverso potenziale tossigeno dei funghi) e da fattori esogeni (temperatura, umidità, acqua libera, pH e natura del substrato) (Dragoni *et al.*, 2000; Naceur Haouet e Altissimi, 2003). Le micotossine rappresentano un pericolo per la salute del consumatore in conseguenza della loro azione lesiva sulle funzioni cellulari, infatti possono avere attività cancerogena, mutagena, nefrotossica, epatotossica, immunotossica e teratogena (Giuffrida, 2012). Una volta avvenuta la contaminazione degli alimenti, le stesse micotossine o i loro derivati possono persistere dopo la morte del micete o essere presenti anche quando il prodotto stesso non appare ammuffito. L'unico intervento efficace è la prevenzione dello sviluppo fungino nelle materie prime e nei prodotti finiti (Machado, 2006). La loro possibile presenza in molti alimenti costituisce oggi un motivo di crescente preoccupazione per la salute dell'uomo e degli animali. La loro contaminazione è influenzata ampiamente dalle condizioni climatiche e geografiche, dalle pratiche di coltivazione e di conservazione e dal tipo di substrato interessato in quanto alcuni prodotti sono più suscettibili di altri alla crescita dei funghi. Gli alimenti più esposti alla contaminazione diretta sono soprattutto cereali (mais, orzo, segale, riso, etc.), frutta secca, spezie, cacao, caffè, legumi e semi oleaginosi (semi di girasole, arachidi, semi di

cotone). Le micotossine possono essere ritrovate come residui o metaboliti tossici nei prodotti alimentari che derivano da animali alimentati con mangimi contaminati costituendo un tipo di contaminazione indiretta per l'uomo di importanza notevole a causa degli elevati livelli di micotossine potenzialmente presenti nei cereali destinati alla produzione di mangimi vegetali (Giuffrida, 2012).

In Europa e nel mondo numerosi comitati scientifici si occupano dell'argomento. La Commissione Europea, mediante la *Scientific Cooperation on Questions relating to Food* (SCOOP), stima l'assunzione di contaminanti dagli abitanti dell'unione Europea; (Majerus e Kapp, 2002). All'interno della Commissione Europea un ruolo importante per la sicurezza alimentare è svolto dall'*European Food Safety Authority* (EFSA) (van Egmond e Jonker, 2008). I regolamenti in materia di micotossine scaturiscono soprattutto dalla valutazione del rischio tossicologico e dell'esposizione a tali sostanze. Il *Joint Expert Committee on Food Additives* (JEFCA), organo scientifico di consulenza del *World Health Organization* (WHO) e la *Food and Agriculture Organization* (FAO) hanno valutato il rischio connesso alle principali micotossine (aflatossine, ocratossina A, patulina, fumonisine, zearalenone ed alcuni tricoteceni) in diverse sessioni (WHO 1990, 1991, 1996, 1999, 2000, 2001, 2002). Negli Stati Uniti molte ricerche sono finanziate per mettere a punto strategie efficaci nel controllo delle contaminazioni da micotossine. Oltre alle conseguenze di ordine sanitario, la presenza di tali metaboliti nei prodotti alimentari e nei mangimi comporta danni economici rilevanti all'agricoltura di quel Paese limitandone la competitività commerciale sia nei mercati nazionali che in quelli esteri. Cleveland e altri collaboratori (2003) si sono soffermati sulle micotossine più rilevanti dal punto di vista economico per gli Stati Uniti: aflatossine prodotte da *Aspergillus flavus*,

tricoteceni prodotti da vari *Fusarium* spp. e fumonisine prodotte da *F. verticillioides*, concludendo che per ottenere un'efficace prevenzione della contaminazione in campo appare necessaria una combinazione di strategie, associando l'uso di agenti di biocontrollo a piante ospiti caratterizzate da un'aumentata resistenza all'infezione fungina e/o capaci di ridurre gli effetti tossici dovuti alle micotossine o di interromperne la biosintesi.

2.1.1 Micotossicosi

Come per tutte le sostanze dotate di attività tossica, l'ingestione di micotossine può determinare un'intossicazione acuta (dovuta ad una o più ingestioni ravvicinate nel tempo di una dose relativamente elevata di tossina) e una cronica (che si manifesta dopo il consumo di piccole dosi, ripetuto nel tempo) (Bourgeois *et al.*, 1990). Da un punto di vista clinico le micotossine sono distinte a seconda degli organi bersaglio che colpiscono in epatotossine, neurotossine, immunotossine, e così via. Sono invece classificate come teratogene, mutagene, carcinogeniche, allergeniche dai biologi cellulari; i chimici organici le suddividono in base alla loro struttura chimica (lattoni, cumarine, ecc.); i biochimici a seconda della via biosintetica (polichetidi, amminoacidi-derivati, ecc.); i medici usano invece come parametro le patologie causate (fuoco di S. Antonio per es.) e ancora i micologi le distinguono indicando i funghi produttori (tossine da *Aspergillus*, ecc.) (Bennett e Klich, 2003). Tali sostanze possono esprimere la loro tossicità agendo a livello di DNA, RNA, proteine, cofattori enzimatici, costituenti di membrana di vari organi e/o sistemi bersaglio (Hussein e Brasel, 2001; Naceur Haouet e Altissimi, 2003). I controlli ai quali sono sottoposte le derrate alimentari per il monitoraggio delle contaminazioni sono numerosi ma intossicazioni acute

possono comunque verificarsi, sebbene quelle mortali siano rare (*International Agency for Research on Cancer, IARC, 1993*). La pericolosità delle micotossine è, allo stato attuale, principalmente dovuta alla loro assunzione continuativa che porta all'accumulo nell'organismo e a conseguenti sintomatologie di tipo cronico (Smith *et al.*, 1994; Miraglia e Brera, 2000; Bottalico, 2002). Infatti nonostante durante i processi di trasformazione degli alimenti il grado di contaminazione può in alcuni casi ridursi per la decomposizione delle micotossine, la stabilità di queste ultime è molto variabile (Scott, 1984).

2.1.2 Interventi contro le micotossine

Data l'ampia diffusione delle micotossine e le possibili implicazioni di carattere economico e sanitario che la loro presenza nei prodotti alimentari comporta, si comprende l'attenzione crescente della ricerca scientifica nell'individuare opportuni sistemi di prevenzione e decontaminazione delle derrate alimentari (Bata *et al.*, 1999; Kabak *et al.*, 2006). Il danno economico deriva dalla mancata commercializzazione di produzioni caratterizzate da livelli di contaminazione eccedenti i limiti di legge e dai costi per l'applicazione di strategie di prevenzione e/o di decontaminazione; non vanno sottovalutati inoltre i costi sanitari e sociali dovuti al consumo di alimenti contaminati da parte delle popolazioni e la riduzione della produttività degli animali nutriti con alimenti contenenti micotossine (Fink-Gremmels, 1999).

Per evitare che le derrate alimentari siano contaminate da funghi produttori di tossine, è fondamentale predisporre le condizioni che non consentano lo sviluppo fungino e mettere in atto sinergiche strategie

preventive mediante l'applicazione dei principi generali del *Good Agricultural Practice* (GAP) e del *Good Manufacturing Practice* (GMP) (Bottalico, 2002; Avantaggiato *et al.*, 2002). Nel contesto dell'*hazard analysis critical control point* (HACCP), è importante monitorare tutti i fattori che intervengono in pre e postraccolta e nelle fasi successive di stoccaggio, trasporto e trasformazione. Questo consente di stimare il livello di rischio che la contaminazione da micotossine, in una data stagione produttiva, possa eccedere i limiti di legge (Magan, 2006).

Nonostante l'applicazione di misure preventive, è difficile contrastare tutti i fattori coinvolti nella colonizzazione fungina, accade quindi che ci sia comunque la necessità di operare la **decontaminazione/detossificazione** delle derrate alimentari. Queste operazioni consistono nell'allontanamento delle parti contaminate (decontaminazione) oppure nell'inattivazione o distruzione *in situ* delle tossine (detossificazione) (Smith *et al.*, 1994; Bottalico, 2000, 2002; Avantaggiato *et al.*, 2002; Jard *et al.*, 2011). Le operazioni di decontaminazione risultano molto efficaci per cereali, legumi, mandorle, frutta, tuberi, ortaggi, mentre sono inapplicabili a sfarinati o prodotti con particelle minute. Le tecniche adottate per la decontaminazione fisica sono: manuali (selezione manuale, ispezioni sanitarie ecc.), meccaniche (cernita, molitura, ventilazione ecc.), elettroniche (irraggiamento e scarto elettronico). La decontaminazione chimica invece si avvale di solventi organici ma può apportare modificazioni indesiderate alle caratteristiche del prodotto con conseguenti dubbi sulla sua salubrità (Dragoni e Cantoni, 1987).

L'alternativa all'allontanamento delle micotossine dalle derrate alimentari (decontaminazione) consiste nella loro inattivazione, ovvero nel cosiddetto

processo di detossificazione delle derrate. I sistemi applicabili possono essere di tipo fisico, chimico, o biologico. I metodi fisici elencano tra gli altri l'adsorbimento, l'inattivazione con il calore o con radiazioni (Grant e Philips, 1998; Scott, 1998). Numerosi sono i prodotti chimici che potrebbero risultare efficaci nella detossificazione delle derrate alimentari, ove consentito dalla legge. Tra gli altri, acidi, basi (ammoniaca, idrossido di calcio e di sodio), agenti ossidanti (perossido di idrogeno, ozono), agenti riducenti (bisolfito), agenti cloruranti (cloro), sali, formaldeide. L'ammoniaca è impiegata a livello industriale per la detossificazione di semi e di pannelli di arachide, cotone e mais (in autoclave a 2-3 atm, per 15-30 min a 90-120°C) (Dragoni e Cantoni, 1987; Bottalico, 2004; Scott, 1998).

La detossificazione biologica consiste nell'allontanamento delle micotossine dagli alimenti attraverso la loro degradazione o trasformazione in composti meno tossici, mediante l'uso di agenti biotici (microrganismi, piante o loro metaboliti). L'individuazione dei meccanismi coinvolti nella degradazione delle micotossine ad opera dei microrganismi (captazione selettiva attraverso le membrane, decomposizione con enzimi specifici, inattivazione mediante formazione di complessi, ecc.) è importante ai fini della loro selezione, come pure il controllo dei prodotti di degradazione, gli effetti della detossificazione sulle proprietà nutrizionali e organolettiche dei prodotti alimentari nonché la fattibilità economica del metodo (Bata *et al.*, 1999). Numerosi microrganismi sono risultati capaci di degradare le micotossine prodotte da funghi patogeni (Karlovsy, 1999; Varga *et al.*, 2005; Moake *et al.*, 2005). Diversi studi hanno individuato lieviti e batteri, tra i quali anche agenti di lotta biologica, che presentano capacità di detossificazione (Karlovsy, 1999; Castoria *et al.*, 2005; Ricelli *et al.*,

2007; De Felice *et al.*, 2008). Un esempio è la degradazione della patulina da parte dei lieviti nelle fermentazioni dei processi produttivi di birra, vino e sidro (Bottalico, 2000; Moss e Long, 2002).

Tra i microrganismi studiati nel laboratorio di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise sono stati individuati agenti di lotta biologica (BCA) che, oltre a contrastare l'attività di patogeni fungini in campo e in postraccolta, degradano *in vitro* le micotossine da essi prodotte. In particolare si citano i BCA *Rhodosporidium kratochvilovae* (ceppo LS11), *Cryptococcus laurentii* (ceppo LS28) e *Aureobasidium pullulans* (ceppo LS30) attivi contro *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*, importanti patogeni del postraccolta (Lima *et al.*, 1997a, 1997b, 1998, 2003; Castoria *et al.*, 1997, 2001, 2003). Alcuni ceppi di *A. pullulans* oltre a controllare lo sviluppo del fungo *Aspergillus carbonarius* su uva, degradano l'ocratossina A ad ocratossina α , composto molto meno tossico (De Felice *et al.*, 2008).

3. Patulina

La patulina (4-idrossi-4H-furo[3,2c]piran-2(6H)-one) è un lattone insaturo (tetrachetide), risultato della condensazione di due anelli eterociclici; la formula empirica è $C_7H_6O_4$ ed il peso molecolare è di 154 dalton. La sua struttura chimica è stata descritta da Woodward e Singh (1949) e confermata da Dauben e Weisenborn (1949). Il suo punto di fusione è di 110-112°C (Singh, 1967; Scott, 1974; Wilson, 1976). I primi studi sulla sua attività antibiotica risalgono al 1943 (Birkinshaw *et al.*, 1943). La patulina è solubile in etilacetato con formazione di una soluzione limpida ed incolore. Sebbene risulti solubile in acqua, è piuttosto instabile nei solventi polari come acqua e metanolo (Cole e Cox, 1981; Merck

Index,1996). La stabilità della micotossina è un aspetto importante ai fini della eventuale tossicità dei prodotti contaminati. La patulina risulta instabile in ambiente alcalino perdendo la sua attività biologica nei confronti di diverse specie batteriche (Chain *et al.*,1942; Hooper *et al.*, 1944; Karow e Foster, 1944; Atkinson e Stanley, 1943; Heatley e Philpot, 1947). Risulta invece generalmente stabile in soluzioni acide (pH2) conservando le sue proprietà antibiotiche (Heatley e Philpot, 1947; Chain *et al.*,1942). Stansfeld e altri collaboratori (1944) hanno riscontrato che risulta stabile per diversi mesi in un buffer a pH 6.0. La scomparsa della tossina in diversi prodotti alimentari è stata attribuita alla sua reattività con i gruppi sulfidrilici di amminoacidi e proteine (Ciegler *et al.*, 1977). Quando sottoposta a ripetute ricristallizzazioni può convertirsi in un composto amorfo insolubile (Katzman *et al.*, 1944); in altri casi tale problema non è stato riscontrato (Scott, 1974).

La patulina è prodotta da diverse specie di funghi appartenenti principalmente ai generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*; *Aspergillus clavatus* è responsabile della produzione di patulina in prodotti destinati all'alimentazione animale, mentre *Penicillium expansum* rappresenta la causa più importante di contaminazione dei prodotti destinati all'alimentazione umana (Moake *et al.*, 2005). La sua tossicità si manifesta in diversi sistemi biologici tra i quali microrganismi, animali e piante, e, di conseguenza, può interessare anche l'uomo. La patulina si ritrova molto frequentemente come contaminante dei prodotti derivati dalle mele, a causa dello sviluppo del fungo *P. expansum*, responsabile del marciume verde-azzurro, frequente in postraccolta (Ciegler *et al.*, 1977; Paster *et al.*, 1995). Nella filiera ortofrutticola oltre a mele e pere, è stata rilevata anche in uva, albicocche, pesche e diversi altri prodotti ed è considerata principalmente

un problema della fase postraccolta (Battilani *et al.*, 2008). I fattori determinanti per la produzione di tale micotossina da parte dei funghi su terreno solido sono la temperatura e l'attività dell'acqua. In terreno liquido PDb (Potato Dextrose broth) il *P. expansum* ha raggiunto un peso secco minimo di 3.7 mg/ml a tutte le temperature comprese tra 0°C e 30°C. Il peso secco massimo è stato ottenuto invece in due-tre settimane a temperature di incubazione da 20°C a 30°C. La patulina è prodotta a tutte le temperature che consentono la crescita del fungo ma avvicinandosi al limite di 30°C la produzione è limitata (Sommer *et al.*, 1974). I valori ottimali di acqua libera per la produzione della patulina risultano invece più elevati rispetto a quelli ottimali per la crescita del fungo e sono compresi tra 0,90 e 0,99 (McKinley e Carlton, 1991). Dombink-Kurtzman e Blackburn (2005) hanno valutato la produzione di patulina da specie di *Penicillium* in diversi mezzi colturali constatando variazioni dovute al mezzo colturale utilizzato e al tempo di incubazione.

3.1 Tossicità della patulina

L'intossicazione acuta da patulina provoca, in animali da laboratorio, agitazione, convulsioni, dispnea, congestioni polmonari, edema, ulcerazioni, iperemia, emorragie intestinali, degenerazione delle cellule epiteliali, infiammazioni dell'intestino, vomito, danni al tratto gastrointestinale e ai reni (McKinley e Carlton, 1991; Moake *et al.*, 2005; Puel *et al.*, 2010). L'intossicazione cronica determina effetti neurotossici, immunotossici e immunosoppressivi, genotossici, embriotossici e teratogenici (Ciegler *et al.*, 1976; Bourdiol e Escoula, 1990; Pfeiffer *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2003; Keblys *et al.*, 2004; Moake *et al.*, 2005; Puel *et al.*, 2010). A livello cellulare la patulina determina inibizione della sintesi

proteica, interruzione della trascrizione e della traduzione e l'inibizione della sintesi del DNA (Moake *et al.*, 2005); l'affinità della tossina con i gruppi sulfidrilici provoca l'inibizione di molti enzimi quali l'ATPasi, l'RNA polimerasi e l'aminoacil-T-RNA sintetasi (Moake *et al.*, 2005; Puel *et al.*, 2010). La patulina inoltre altera la struttura e la funzionalità delle proteine della membrana plasmatica (Horváth *et al.*, 2010) i cui lipidi subiscono reazioni di perossidazione dovuti alla formazione di ROS (Ferrer *et al.*, 2009). La tossina forma un legame covalente con il glutatione (GSH), importante antiossidante (Fliege e Metzler, 2000), determinando danni ossidativi a carico del DNA, su cellule HEK (*Human embryonic kidney*) e su cellule HepG2 (*human hepatoma G2*) (Liu *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2009). La patulina determina effetti mutageni (Umeda *et al.*, 1977; Schumacher *et al.*, 2005a, 2005b); provoca *cross links* sia di DNA che di proteine alterandone la struttura e impedendone la corretta funzionalità (Fliege e Metzler, 2000; Schumacher *et al.*, 2006). Nei ratti in accrescimento la somministrazione di patulina altera il normale funzionamento della tiroide e dei testicoli aumentando i livelli di testosterone e di LH e provocando edema e fibrosi dei tessuti interstiziali e disorganizzazione dei tubuli seminiferi (Selmanoglu e Kockaya, (2004) inoltre influenza negativamente morfologia, motilità e numero degli spermatozoi (Selmanoglu, 2006).

Sull'uomo i sintomi derivanti da intossicazione acuta sono vomito, nausea e disturbi gastrointestinali (Betina, 1984; McKinley e Carlton, 1991; Bottalico, 2002; Logrieco *et al.*, 2002); esposizioni prolungate portano a mal di testa, stanchezza e perdita dei sensi. Si possono verificare anche eritemi ed edemi cutanei (Material Safety Data Sheet, 2004). I dati riguardanti le possibili proprietà cancerogene della patulina (Dickens e Jones, 1961; Osswald *et al.*, 1978; Becci *et al.*, 1981) non sono stati

considerati sufficienti dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1986) ed è stata quindi inserita nel gruppo 3 (IARC, 1993) tra le sostanze non classificabili come cancerogene per l'uomo (Castoria, 2009).

Una considerazione particolare riguarda la possibile presenza della micotossina nei prodotti e i succhi a base di mela, destinati soprattutto all'alimentazione per l'infanzia. L'esposizione alla patulina può risultare particolarmente pericolosa per i bambini in quanto il rapporto *mg tossina/kg peso corporeo* risulta loro sfavorevole, per la stessa quantità di tossina ingerita, rispetto a quanto accade per un adulto (Beretta *et al.*, 2000). Risulta quindi importante prevenire e ridurre la contaminazione da patulina dei prodotti alimentari.

3.2 Limiti di tolleranza della patulina

La patulina è, nel settore ortofrutticolo, una delle micotossine maggiormente regolamentate: approssimativamente 160 regolamenti in circa 50 Paesi. I limiti stabiliti variano da 5 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e riguardano non solo prodotti a base di mele ma anche bevande fermentate, sciroppi, confetture, alimenti per bambini. All'interno del *Codex Alimentarius Commission* (che mira a favorire gli scambi commerciali internazionali nella salvaguardia della salute dei consumatori stabilendo standard internazionali per alimenti e mangimi) il *Codex Committee on Food Additives and Contaminants* (CCFAC) ha stabilito uno standard per la patulina nei succhi di mela nel 2003. Inoltre il CCFAC ha anche messo a punto un codice per la prevenzione e la riduzione della patulina nei succhi di mela e negli ingredienti a base di succhi di mela usati in altre bevande (Codex Alimentarius, 2003; van Egmond e Jonker, 2008).

Il limite massimo ammissibile della patulina negli alimenti stabilito dalla FAO (1997) è pari a 50 µg/Kg. L'UE e molti governi nazionali si sono adeguati emanando proprie direttive. In Italia il Ministero della Salute ha stabilito il livello massimo ammissibile di Patulina nei succhi di frutta a 50 ppb (Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 135, 11 giugno 1999). L'UE ha stabilito inoltre i livelli massimi (10µg/kg) tollerabili negli alimenti per l'infanzia (Regolamento CE 1425/2003, Regolamento 455/2004 e Regolamento CE 1881/2006).

Il contenuto di patulina è stato monitorato nei vari stadi del processo produttivo dei succhi di mela pastorizzati e, sebbene le operazioni iniziali quali il lavaggio e la selezione riducano notevolmente i tenori della micotossina nei prodotti finali, si evidenzia come il controllo della contaminazione debba focalizzarsi sempre sulla prevenzione nelle fasi di pre-raccolta, raccolta e post-raccolta; infatti la micotossina risulta molto stabile in ambiente acido ed è preferibile controllare o ridurre la sua produzione nei frutti anziché rimuoverla o inattivarla successivamente durante i processi di lavorazione. Alcuni funghi termoresistenti possono sopravvivere alla pastorizzazione trovandosi nelle condizioni favorevoli per moltiplicarsi e produrre la micotossina durante la fase di conservazione del prodotto, determinando livelli di patulina superiori a quelli massimi consentiti di 50 µg/L. Una filtrazione dei succhi di mela capace di eliminare le ascospore dei funghi termoresistenti rappresenta un punto critico per l'ottenimento di un prodotto qualitativamente accettabile (de Souza Sant'Ana *et al.*, 2008). La patulina nei succhi di mela concentrati è stata valutata anche da Welke e altri collaboratori (2009) che hanno rilevato livelli compresi tra 56 e 653 µg/L nei vari stadi produttivi. Dopo pastorizzazione, trattamenti enzimatici, microfiltrazione e processi di evaporazione, il contenuto di tossina è ridotto rispettivamente del 39.6,

28.3, 20.1 e 28.4%. I succhi concentrati di mela, diluiti per la commercializzazione, hanno presentato un livello di patulina compreso tra 15 e 46 µg/L. Nonostante si tratti di valori inferiori al limite di 50 µg/L considerato accettabile dalla *Codex Alimentarius Commission*, se si considera il limite massimo stabilito da The Commission of the European Communities per i prodotti derivati da mela e destinati ai bambini, tutti i campioni hanno superato la concentrazione di patulina di 10 µg/L. (Welke *et al.*, 2009).

3.3 Strategie per ridurre i livelli di contaminazione da patulina

Le strategie per contrastare le contaminazioni da patulina, come per le altre micotossine, si basano principalmente sulla prevenzione e sul contenimento delle infezioni da funghi fitopatogeni.

Per la prevenzione delle infezioni da *P. expansum* la FAO (2002) ha raccomandato di seguire le regole della Corretta Pratica Agricola (*Good Agricultural Practice*, GAP) riguardanti la coltivazione, la raccolta, il trasporto, la conservazione per il mercato dei frutti freschi e per i frutti soggetti a trasformazione e le regole della corretta Pratica di Trasformazione (*Good Manufacturing Practice*, GMP) riguardanti la corretta gestione del trasporto, della selezione e della lavorazione della frutta destinata alla produzioni di succhi, concentrati, puree o semilavorati. Le misure adottate in postraccolta per prevenire le infezioni da *P. expansum* ed aumentare la *shelf life* dei prodotti, salvaguardando le loro caratteristiche organolettiche, prevedono soprattutto la combinazione di: bassa temperatura e/o atmosfera controllata, uso dei fungicidi ammessi in

postraccolta, mantenimento delle condizioni igienico-sanitarie ottimali nei locali di stoccaggio e trasformazione (Morales *et al.*, 2010).

Un modo alternativo per ridurre il contenuto della micotossina nei prodotti alimentari potrebbe essere quello di utilizzare microrganismi capaci di degradarla. La patulina risulta degradata da lieviti *Saccharomyces* spp. in processi fermentativi (Harwing *et al.*, 1973). I metaboliti formati dalla degradazione anaerobica della patulina dal lievito *Saccharomyces cerevisiae* sono *E*-Ascladiolo, che è anche il precursore della biosintesi della patulina (Moake *et al.*, 2005) e il suo isomero *Z*-Ascladiolo (Moss e Long, 2002). Il batterio *Gluconobacter oxydans* durante la degradazione aerobica della patulina porta alla formazione degli stessi metaboliti (*E*-Ascladiolo e *Z*-Ascladiolo) (Ricelli *et al.*, 2007). Diversi studi descrivono degradazioni aerobiche della patulina da parte di lieviti e batteri agenti di biocontrollo capaci di contrastare le infezioni di *P. expansum* e di ridurre i livelli della micotossina interferendo con il metabolismo primario e/o secondario del fungo; è il caso di *Pichia ohmeri*, *Candida sake*, *Pantoea agglomerans* ed alcuni ceppi batterici (Morales *et al.*, 2008, 2010; Coelho *et al.*, 2007; Florianowicz, 2001). Il BCA *R. kratochvilovae* LS11 agisce efficacemente nella prevenzione dei marciumi da *P. expansum* nelle mele conservate, cresce in presenza di patulina e riesce a degradarla in due composti, di cui uno, più stabile, è stato identificato come acido desossipatulico (DPA) che risulta meno tossico della patulina per diversi microrganismi, nelle stesse condizioni di saggio (Castoria *et al.*, 2005, 2011; Scott *et al.*, 1972; Wright *et al.*, 2008). La capacità di crescere in presenza di patulina e di degradarla sembra essere una caratteristica diffusa tra i lieviti rosa appartenenti ai generi *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* e per tale motivo presso i laboratori di Patologia Vegetale

dell'Università degli Studi del Molise si studiano questi microrganismi e i meccanismi alla base dei processi degradativi nei quali sono coinvolti.

4. Lotta ai patogeni fungini in postraccolta

Le strategie di difesa postraccolta si basano principalmente sull'integrazione di mezzi fisici, biologici e chimici.

4.1 Mezzi fisici

Se in campo prevale la difesa con mezzi chimici, in postraccolta hanno un ruolo fondamentale i mezzi fisici (temperatura, composizione gassosa e umidità relativa). La temperatura è il fattore ambientale che influenza maggiormente l'attività respiratoria dei prodotti vegetali con ovvie conseguenze sulla maturazione e senescenza e quindi sulla durata della vita postraccolta. Si applica la temperatura più bassa possibile, considerando i limiti termici della soglia di insorgenza di fisiopatie da raffreddamento e del punto di congelamento dei tessuti vegetali. La refrigerazione, rallentando la maturazione e la senescenza dei prodotti vegetali, ritarda o impedisce le infezioni e rallenta o blocca lo sviluppo di marciumi. Tra i patogeni fungini postraccolta pochi sono mesofili (con temperature ottimali di crescita di 25-35°C) come ad esempio le specie di *Aspergillus*, per le quali la bassa temperatura di conservazione determina l'arresto della crescita. Tuttavia anche nel caso dei funghi psicrofili (crescono meglio a 15-20°C) come le specie di *Botrytis* e di *Penicillium*, pur non potendo bloccare le infezioni, con la bassa temperatura è possibile ridurre notevolmente lo sviluppo. Tra gli altri mezzi fisici più importanti utilizzati in postraccolta, oltre alla refrigerazione, si ricorda l'uso di

atmosfera controllate (AC) o modificate (AM) e la gestione dell'umidità relativa (UR). Le variazioni apportate alle concentrazioni di O₂ e CO₂ dell'atmosfera hanno l'obiettivo soprattutto di ridurre l'attività respiratoria e le altre attività metaboliche nei frutti e negli ortaggi dopo la raccolta. I prodotti ortofrutticoli freschi hanno un elevato contenuto di acqua e sono conservati ad alti livelli di U.R. (>85%) per evitare il loro avvizzimento. L'UR elevata favorisce la cicatrizzazione delle ferite di ortaggi come la patata e di frutti come gli agrumi, riducendo le perdite di acqua e impedendo l'ingresso agli agenti responsabili di marciumi. Di contro, quando i prodotti sono mantenuti ad una UR elevata, l'umidità nelle ferite, lenticelle e stomi agevola la germinazione delle spore, la crescita del micelio e la moltiplicazione delle cellule batteriche (Bertolini e Nigro, 2009).

4.2 Mezzi chimici

I mezzi chimici utilizzati per i trattamenti sui vegetali, sia in campo che in postraccolta, sono denominati prodotti fitosanitari; sono composti da tre elementi essenziali: la sostanza attiva, uno o più coadiuvanti e i coformulanti. La sostanza attiva è il componente efficace contro l'alterazione che si vuole controllare e quindi a seconda della pericolosità e della concentrazione presente nella formulazione, determina la classe di tossicità del prodotto commerciale, l'intervallo di sicurezza e il limite massimo ammissibile nei prodotti vegetali trattati. I coadiuvanti aumentano l'efficacia della sostanza attiva (solventi, emulsionanti, adesivanti, ecc.); i coformulanti riducono la concentrazione della sostanza attiva (ad esempio sostanze inerti). L'agrofarmaco può essere di copertura (si localizza sulla superficie del vegetale), sistemico (penetra nei tessuti e viene traslocato anche in punti diversi da quelli di applicazione), citotropico (non è

traslocabile ma può penetrare nei tessuti). Gli agrofarmaci utilizzati contro le alterazioni postraccolta dei prodotti vegetali appartengono alle categorie degli antiparassitari e dei fisiofarmaci. I primi sono prodotti adatti per la difesa della piante in campo e, se consentito, in postraccolta; includono i fungicidi e i battericidi (Bertolini e Nigro, 2009). I composti ammessi per i trattamenti in agricoltura biologica sono elencati nell'allegato II/B del regolamento CEE n. 2092/91, aggiornato dal Regolamento CEE 1488/97, alcuni di questi non sono però consentiti in Italia.

I trattamenti eseguiti in preraccolta influiscono in modo importante sull'efficacia della lotta in postraccolta, abbassando l'inoculo del patogeno e l'incidenza di infezioni latenti. Nella scelta della strategia di difesa chimica è necessario conoscere la modalità con cui il patogeno infetta l'ospite, l'epoca in cui si verificano i maggiori rischi di contaminazione/infezione del prodotto vegetale e i fattori ambientali predisponenti l'insorgenza e lo sviluppo della malattia. Una buona pianificazione dei trattamenti nelle fasi di pre e postraccolta dovrebbe necessariamente considerare tutte le fasi di produzione e monitorare i patogeni in ciascun ambiente, per ogni specie ortofrutticola, mettendo in atto gli accorgimenti che possono incrementare l'efficacia della difesa chimica. Ad esempio i trattamenti su fragole in fioritura riducono l'incidenza delle infezioni latenti da *Botrytis* spp. durante la conservazione. I requisiti che dovrebbero aver i fungicidi utilizzabili in preraccolta per prevenire i marciumi in postraccolta sono:

- breve intervallo di sicurezza (non superiore ai 7-10 giorni) per permettere interventi in prossimità della raccolta;
- un residuo basso che dovrebbe decadere nel tempo e possibilmente annullarsi;

- una tossicità limitata (trattandosi di interventi vicini alla raccolta). (Lima e De Cicco, 2009).

I fitofarmaci sono considerati presidi sanitari e quindi sottoposti ad autorizzazione, controllo e registrazione da parte del Ministero della Sanità e sono classificati in base alla loro tossicità espressa come DL₅₀ (mg di principio attivo per kg di peso vivo della cavia sufficienti a provocare la morte del 50% delle cavia di laboratorio).

L'uso dei prodotti fitosanitari in postraccolta è rigidamente regolamentato dalle leggi vigenti e il numero di sostanze attive autorizzate è limitato, considerando la situazione in preraccolta e la molteplicità e la diversità dei microrganismi patogeni. Alcuni prodotti, come ad esempio il benomyl, sono stati ritirati dal commercio per possibili effetti tossici sull'uomo e per la perdita di efficacia dovuta a fenomeni di resistenza acquisita da parte dei patogeni. Le sostanze attive utilizzabili in postraccolta sono riconducibili ai gruppi chimici dei benzimidazoli (Tiabendazolo), dei dicarbosimmidi (Iprodione), degli imidazoli e dei derivati fenolici e, di più recente introduzione, degli anilidi (Boscalid) e idrossianilidi. La resistenza acquisita ai fungicidi consiste nella riduzione di sensibilità, per modificazioni stabili, ereditabili, verso una molecola chimica che in precedenza risultava efficace contro lo stesso patogeno. I mutanti resistenti del patogeno tendono a scomparire naturalmente soprattutto quando non si utilizza più il fungicida verso il quale mostrano resistenza. Al contrario il fungicida esercita una pressione selettiva nei confronti dei ceppi resistenti. In postraccolta la perdita di efficacia di alcune sostanze attive ha portato a diventare limitanti per la conservazione di alcuni ortofrutticoli alcune patologie considerate in precedenza secondarie. Il patogeno che acquisisce una resistenza verso una determinata sostanza attiva diventa resistente

anche per le sostanze attive con struttura chimica o meccanismo di azione simili (ceppi di *B. cinerea* resistenti a benomyl e carbendazim) (Lima e De Cicco, 2009). La persistenza nell'ambiente di tali prodotti favorisce la selezione di popolazioni fungine resistenti (Avila-Adame *et al.*, 2003). Questo fenomeno è favorito dall'uso di fungicidi a largo spettro in preraccolta e comporta una difficile gestione della lotta in postraccolta che spesso non può far ricorso a principi attivi alternativi perché non disponibili o non registrati. Per evitare che anche le sostanze attive ancora disponibili diventino inefficaci, è opportuno:

- l'impiego combinato o in successione di fungicidi con meccanismi d'azione diversi;
- uso preventivo delle sostanze attive a rischio, quando il livello di contaminazione e/o infezione è ancora basso;
- utilizzo in preraccolta di sostanze attive diverse da quelle che saranno applicate in postraccolta;
- adozione di tecniche di lotta integrata;
- monitoraggio continuo, per ogni ambiente e per ogni specie ortofrutticola, dei patogeni presenti e dei ceppi resistenti alle sostanze attive che si utilizzeranno (Lima e De Cicco, 2009).

Per il patogeno risulta più facile sviluppare una resistenza verso anticrittogamici sistemici, che agiscono in maniera selettiva verso un determinato sito bersaglio, anziché verso anticrittogamici protettivi che hanno un'azione verso più bersagli vitali (un esempio del primo caso è la resistenza di *Penicillium digitatum* al tiabendazolo, riscontrata nel 90% degli isolati da partite di agrumi israeliani nel porto di Rotterdam) (Lorenzini, 2001).

Tra gli studi volti ad individuare fungicidi alternativi a quelli per i quali si sono sviluppate le resistenze dei patogeni, nel caso specifico della resistenza acquisita dal *P. expansum* al tiabendazolo, Errampalli e altri collaboratori (2005) suggeriscono l'uso del fungicida fludioxonil nelle strategie per la gestione del marciume verde-azzurro nelle mele conservate per 105 giorni. Il fludioxonil alla concentrazione di 450 mg/l, ha portato ad un controllo del 98 e del 92% della malattia rispettivamente in condizioni di atmosfera modificata e nelle comuni condizioni di conservazione mediante il freddo. L'uso della difenilammia in associazione con il fludioxonil non ha determinato differenze nei risultati (Errampalli *et al.*, 2006b). Il trattamento con fungicidi in postraccolta comporta un inquinamento ambientale ridotto rispetto a quello effettuato in campo, richiedendo quantità inferiori di principio attivo, ma rimane il problema igienico-sanitario dei residui chimici sui prodotti commercializzati e quello dello smaltimento dei reflui dei trattamenti fitosanitari.

4.3 Mezzi biologici

L'alternativa biologica all'uso di prodotti chimici desta sempre maggiore interesse. L'uso di microrganismi, residenti o introdotti, comporta la valutazione di diversi aspetti pratici, tra cui quelli legislativi che prevedono la registrazione dei microrganismi stessi (come per i prodotti fitosanitari) con iter lunghi e spesso costosi e quelli relativi alla biosicurezza (le spore di alcuni microrganismi antagonisti potrebbero rivelarsi allergeni e fattori di rischio per soggetti sensibili) (Lorenzini, 2001). Prima di poter essere commercializzati gli agenti di biocontrollo devono essere sottoposti ad una serie di verifiche e soddisfare vari requisiti e a dispetto del gran numero di brevetti solo pochi di essi sono registrati per

uso agricolo (Montesinos, 2003). Nel corso del tempo la ricerca e la sperimentazione si sono orientate in modo sempre più specifico verso la conoscenza delle interazioni tra ospite e patogeno e tra agenti infettivi e mezzi di difesa, al fine di comprendere come e perché un mezzo di difesa risulta o meno efficace piuttosto che limitarsi al solo processo descrittivo che rileva quali metodi funzionano e quali no (Lorenzini, 2001).

Nella lotta biologica l'equilibrio microbiologico naturale viene ad essere 'modificato' mediante l'impiego di diversi organismi in modo da contrastare la capacità del patogeno di indurre la malattia. Vi sono numerose definizioni di difesa biologica. Nell'accezione più ampia del termine la lotta biologica si definisce come 'l'utilizzo di organismi naturali o modificati (antagonisti), di geni o prodotti genici, atti a ridurre gli effetti degli organismi indesiderati (patogeni) e a favorire quelli utili all'uomo, alle coltivazioni, agli animali e ai microrganismi simbiotici' (Accademia Nazionale della Scienza degli Stati Uniti – NAS, 1987). Gli antagonisti o agenti di lotta biologica (BCA), secondo tale definizione, hanno la capacità di interferire con i processi vitali del patogeno; essi non devono essere patogeni per la pianta e per i prodotti vegetali e non devono produrre metaboliti secondari tossici per l'uomo. Tali microrganismi possono essere naturalmente presenti sulle superfici dei vegetali oppure essere introdotti artificialmente. Solitamente sono isolati dai prodotti vegetali prelevati in campo o nei luoghi di conservazione (Nigro *et al.*, 2009). Secondo Cook e Baker (1983) il controllo biologico è la riduzione del potenziale di inoculo o di una malattia prodotta dall'attività di un patogeno ottenuta da o mediante l'uso di uno o più organismi diversi dall'uomo. Questa definizione prevede:

1. l'applicazione di ceppi virulenti, ipovirulenti o popolazioni non patogene;
2. l'uso di microrganismi antagonisti;
3. la manipolazione genetica della pianta ospite per indurne la resistenza agli attacchi del patogeno.

In questo tipo di lotta sono esclusi i mezzi chimici (Regolamento CE 834/2007 del 28/06/2007, che abroga il precedente Regolamento CEE 2092/91, e Regolamento di esecuzione UE n. 354/2014 della Commissione, dell' 8 aprile 2014 , che modifica e rettifica il regolamento CE n. 889/2008 recante modalità di applicazione del regolamento CE n. 834/2007 del Consiglio, relativo alla produzione biologica).

Nella microflora epifitica del filloplano (fillosfera) e/o del carpoplano (carposfera) sono stati spesso individuati agenti di lotta biologica. Gli studi disponibili hanno riguardato soprattutto il filloplano. Si stima che sulla superficie fogliare sia presente una popolazione di microrganismi, costituita da batteri, funghi e lieviti, pari a 10^3 - 10^7 cellule per centimetro quadrato e che meno del 5% di essi siano patogeni. Il numero totale di microrganismi presenti sugli organi vegetali tende a crescere fino al raggiungimento di un equilibrio dinamico influenzato da diversi fattori (spazio, umidità, competizione, tecnica colturale, ecc.). La presenza di batteri, funghi filamentosi e lieviti sulle foglie varia in funzione della loro posizione sulla chioma, della stagione vegetativa ed è significativamente influenzata dai trattamenti chimici. Specie di funghi filamentosi appartenenti ai generi *Alternaria* e *Cladosporium*, i funghi lievitiiformi del genere *Aureobasidium* e i lieviti del genere *Sporobolomyces* sono in genere i microrganismi predominanti sulle superfici fogliari. Per quanto riguarda la microflora della carposfera, gli studi disponibili sono

pochi e prevedono l'isolamento di microrganismi da frutti sani e il loro utilizzo contro i marciumi postraccolta senza studi preliminari sulla microflora della carposfera. La conoscenza dello stato microbico della superficie dei frutti e la comprensione dei meccanismi che lo regolano sono fondamentali per la gestione di tali comunità, in funzione di aumentare la protezione ottenibile mediante la lotta biologica. Questo appare ancora più evidente quando gli antagonisti sono somministrati in preraccolta. Per rendere la lotta biologica efficace e applicabile su larga scala è necessario studiare le interazioni esistenti tra ospite, antagonista introdotto artificialmente, microrganismi indigeni non patogeni e patogeni e l'influenza che i fattori ambientali esercitano su questo equilibrio. La capacità dei BCA di restare attivi negli ambienti in cui sono utilizzati, la complessità delle interazioni con i microrganismi coinvolti e il possesso di diversi meccanismi di antagonismo anche in uno stesso microrganismo potrebbero portare la lotta biologica ad essere più efficace e duratura di quella chimica (spesso inefficace per i fenomeni di resistenza) (Nigro *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2008).

Secondo Wilson e Wisniewski (1989) i requisiti di un antagonista adatto alla registrazione e commercializzazione sono:

- stabilità genetica,
- efficacia a base concentrazioni,
- modeste esigenze nutritive,
- capacità di sopravvivenza in condizioni ambientali avverse,
- tolleranza ai trattamenti chimici/fisici,
- spettro d'azione ampio,
- esigenze colturali di laboratorio poco costose,
- assenza di patogenicità nei confronti dell'ospite,

- resistenza agli agrofarmaci,
- assenza di prodotti secondari pericolosi per l'uomo,
- possibilità di essere preparato in forme facili da conservare e distribuire.

I metodi biologici permettono di intervenire sia nell'induzione di resistenza che nella profilassi e nella terapia. Nonostante da soli non siano spesso sufficienti, si rivelano molto utili in sinergia con gli altri mezzi di difesa, permettendo ad esempio la riduzione dell'uso dei fitofarmaci (Lorenzini, 2001).

4.3.1 Meccanismi d'azione degli antagonisti

Le interazioni tra specie microbiche possono essere di vario tipo: neutralismo (le attività di una specie non sono influenzate dalla presenza di un'altra), competizione (per i nutrienti o per lo spazio), cooperazione (l'associazione apporta benefici ad entrambe le specie che sarebbero comunque in grado di crescere autonomamente), mutualismo (la reciproca interazione avvantaggia lo sviluppo delle specie coinvolte, difficile in sua assenza), parassitismo (simbiosi antagonistica tra aggressore e vittima), predazione (uso trofico diretto della vittima), commensalismo (solo una delle specie trae vantaggio dalla simbiosi, senza danno per l'altra) (Lorenzini, 2001). La conoscenza dei meccanismi d'azione di un antagonista è essenziale sia per mettere in atto le procedure più adatte per la sua applicazione, sia per avere un criterio valido per la selezione di microrganismi efficaci. I meccanismi più frequenti tra gli antagonisti sono: la competizione per lo spazio e per i nutrienti, il parassitismo diretto o indiretto, l'induzione di resistenza nell'ospite, l'antibiosi.

Nella **competizione** per lo spazio e/o per i nutrienti l'antagonista sottrae elementi fondamentali presenti in quantità limitata e necessari al patogeno per il suo sviluppo e/o per l'attacco parassitario (nutrienti, ossigeno, spazio). Batteri e lieviti, inclusi i funghi lievitiforimi, anche a causa dell'elevato rapporto superficie/volume delle loro cellule, riescono a trarre nutrienti da soluzioni diluite in modo più veloce ed efficiente rispetto ai funghi filamentosi patogeni. Alcuni batteri epifiti contrastano *B. cinerea* sottraendo amminoacidi dal mezzo di coltura più velocemente del patogeno. Un altro modo in cui l'antagonista può agire è indiretto, modificando ad esempio il pH dell'ambiente come accade nelle fragole ad opera di *Cladosporium herbarum* contro la muffa grigia. La competizione per lo spazio assume particolare rilievo nell'utilizzo in postraccolta del BCA, in quanto numerose infezioni si originano proprio dalle ferite provocate durante le fasi di raccolta, selezione, confezionamento e commercializzazione. La capacità dell'antagonista di sopportare condizioni sfavorevoli di temperatura, umidità, pH, pressione osmotica, per poi colonizzare velocemente i siti d'infezione quando le condizioni ambientali tornano favorevoli, gli consente di escludere il patogeno mediante competizione per lo spazio e sottrazione di nutrienti nei primi stadi dell'infezione.

Il **parassitismo** ossia la parassitizzazione del patogeno da parte dell'agente di biocontrollo necessita della presenza minima dell'agente infettivo, che rappresenta la fonte nutritiva per l'antagonista. Esempi di questo meccanismo d'azione sono ceppi fungini del genere *Trichoderma*, utilizzati nella lotta biologica contro patogeni fogliari e terricoli. Tra i lieviti, *Pichia guilliermondii* e *Rhodotorula glutinis* si ancorano alle ife di *B. cinerea* o di *P. expansum* degradandone il micelio mediante enzimi idrolitici. Un parassitismo indiretto mediante rilascio a distanza dei predetti

enzimi è riscontrato in altri lieviti (*C. laurentii*) e funghi lievitiiformi (*A. pullulans*). I micoparassiti sono necrotrofi (distruttivi, causano la morte del patogeno) e biotrofi (in equilibrio col patogeno, stabiliscono un contatto persistente con la cellula ospite che rimane viva).

Nell'**antibiosi** si verifica la produzione di sostanze chimiche (metaboliti tossici o sostanze antibiotiche) che inibiscono altri microrganismi bloccandone lo sviluppo o uccidendone le cellule. Esempi di questo tipo di meccanismo sono, tra i batteri, gli appartenenti ai generi *Bacillus* e *Pseudomonas* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *P. cepacia* e *P. syringae*). Per l'impiego in postraccolta (contro i patogeni fungini di mele e agrumi) attualmente l'unico batterio utilizzabile è *P. syringae*, formulato e registrato negli USA (EcoScience Corp., USA) con il nome commerciale di BIOSAVE. In ogni caso si tende ad evitare la selezione di antagonisti produttori di antibiotici, per impedire lo sviluppo di ceppi resistenti e potenzialmente pericolosi per l'uomo.

L'induzione di resistenza si manifesta quando lo stretto contatto tra l'antagonista e l'ospite vegetale induce in quest'ultimo l'intensificazione dei meccanismi di difesa, fisici o chimici, in tutta la pianta o in modo localizzato in alcune parti di essa. Un esempio è il fungo lieviti forme *A. pullulans* che induce resistenza nell'ospite mediante produzione di enzimi litici (Nigro *et al.*, 2009).

4.3.2 Principali antagonisti in postraccolta

Nella fase postraccolta i microrganismi più efficaci per contrastare i marciumi sono *P. syringae*, ceppi ESC-10 e ESC-11 (componenti dei prodotti commerciali di biocontrollo denominati Bio-Save 10 e Bio-Save 11) e diverse specie batteriche del genere *Bacillus*; *B. subtilis* (B246) in

Africa è disponibile in commercio per l'impiego in postraccolta su avocado. I funghi appartenenti al genere *Trichoderma* rappresentano i principali e più efficaci agenti di lotta biologica. Alcune specie agiscono mediante parassitismo diretto sui funghi fitopatogeni, altre producono sostanze antibiotiche e/o enzimi litici (chitinasi e glucanasi) o possono indurre resistenza nell'ospite. Altre specie ancora possono utilizzare la sostanza organica agendo mediante competizione alimentare contro i patogeni fungini in fase saprofitaria. L'ente americano *Environmental Protection Agency* (EPA), per la registrazione di formulati per uso biologico, ha stabilito che gli enzimi litici prodotti da alcuni ceppi di *Trichoderma* spp. non sono dannosi né per l'uomo né per gli animali domestici. Tra le specie di lieviti con spiccata attività antagonistica contro patogeni in postraccolta vi sono *Pichia guilliermondii*, *C. laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida oleophila*, *Metschnikowia pulcherrima*, *R. glutinis* e *Sporobolomyces roseus*. Tra i funghi lievitiforimi si segnalano *Cladosporium cladosporioides* e, soprattutto, *A. pullulans*. Tra i lieviti, diversi ceppi di *M. pulcherrima* si sono rivelati efficaci contro *Botrytis* e *Penicillium* spp. su frutti di diverse cultivar di melo e contro *B. cinerea* su uve da tavola. La loro efficacia è stata incrementata con l'uso di alcune sostanze coadiuvanti (alcuni sali minerali quali CaCl_2 , KCl), sostanze adesivanti (chitosano, alginato di Na) e zuccheri (cellobiosio, mannitolo, galattosio, ecc.). I meccanismi d'azione di *M. pulcherrima* sono soprattutto di competizione per lo spazio e/o per i nutrienti, di interazione diretta e di produzione di enzimi litici. Tra i funghi lievitiforimi, *A. pullulans*, un microrganismo ubiquitario, è tra i saprofiti più diffusi sulla fillosfera e sulla carposfera. I patogeni contro i quali risulta efficace sono *B. cinerea*, *Alternaria solani*, *Monilinia laxa*, *Penicillium* spp., *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*. Gli isolati L47 e LS30 si sono dimostrati efficaci contro

diversi funghi responsabili di marciumi in postraccolta su diverse specie frutticole (uva da tavola, actinidia, fragola, ciliegie e mele). I meccanismi d'azione coinvolti sono sia di competizione per i nutrienti sia di produzione di enzimi idrolitici che di induzione di resistenza nell'ospite. Gli agenti di lotta biologica registrati per l'impiego commerciale sono ancora pochi e nessuno di essi è disponibile in Europa. Tra i biofungicidi ammessi in alcuni Paesi per l'uso in postraccolta troviamo l'Aspire (nel quale il BCA è *C. oleophila*, I-182) e l'Avogreen (nel quale il BCA è *B. subtilis*, B246) (Nigro *et al.*, 2009). Calvo e altri collaboratori (2003) hanno testato l'abilità che alcune combinazioni di lieviti hanno nel controllo dei fitopatogeni *P. expansum* e *B. cinerea* nelle mele Red Delicious. Le valutazioni delle interazioni (di sinergia o di antagonismo) tra le diverse combinazioni di due ceppi di *Rhodotorula* (*R. glutinis* SL 1 e *R. glutinis* SL 30) e due ceppi di *Cryptococcus* (*C. albidus* SL 43 e *C. laurentii* SL 62) hanno mostrato che l'azione combinata di *R. glutinis* SL 1–*R. glutinis* SL 30 è meno efficace rispetto all'azione dei singoli lieviti, contro entrambe le muffe. Altre combinazioni (*R. glutinis* SL 1–*C. albidus* SL 43 e *R. glutinis* SL 30–*C. albidus* SL 43) hanno manifestato un'azione sinergica contro *P. expansum* ma non contro *B. cinerea*. Contro quest'ultima è stato efficace unicamente l'abbinamento *R. glutinis* SL 1–*C. laurentii* SL 62. Nessuna delle combinazioni testate ha ottenuto un'alta efficacia nel controllare entrambi i patogeni. L'azione sinergica delle combinazioni dei lieviti antagonisti consentirebbe di incrementare l'efficacia del biocontrollo evitando di utilizzare grosse quantità di microrganismi.

4.3.3 Lotta biologica in preraccolta

Sebbene in postraccolta l'utilizzo di microrganismi antagonisti determini risultati efficaci, favoriti dalle condizioni controllate di temperatura e umidità, è auspicabile la loro applicazione già in preraccolta in quanto i BCA, colonizzando rapidamente gli ortaggi e i frutti, possono ridurre le infezioni latenti che si instaurano in diversi stadi dello sviluppo. Le applicazioni in preraccolta richiedono la conoscenza dei sistemi colturali, dell'epidemiologia della malattia che si vuole combattere, della biologia, ecologia e dinamica di popolazione dell'antagonista e delle interazioni tra queste variabili. L'antagonista utilizzato in campo dovrà essere resistente agli stress ambientali e capace di aderire alle superfici dei vegetali; per questo i funghi filamentosi, i funghi lievitiiformi e i lieviti si rivelano i più adatti come antagonisti in preraccolta, al contrario dei batteri. L'efficacia degli antagonisti può essere incrementata adottando alcune strategie. Utilizzando BCA tra loro compatibili e con meccanismi d'azione complementari, aumenta l'efficacia e lo spettro d'azione contro gli agenti patogeni (Nigro *et al.*, 2009). Tra i lieviti saprofiti un isolato di *R. glutinis* e due di *C. albidus* si sono rivelati capaci di controllare *B. cinerea* in piante di fagiolo e pomodoro. La loro abilità di ridurre la germinazione dei conidi e la gravità dei sintomi del marciume sulle foglie distaccate e di controllare la malattia su tutta la pianta è risultata in determinate condizioni essere paragonabile a quella del noto agente di controllo biologico *Trichoderma harzianum* T39 (Elad *et al.*, 1994). Trattamenti con *A. pullulans* su fragole ancora non mature, attaccate alla pianta, ritardano il marciume dovuto all'attacco di *B. cinerea* per molti giorni durante la conservazione, dopo la raccolta dei frutti maturi e ciò sembra dovuto ad un aumento dei livelli dei composti correlati alla naturale resistenza alla malattia (Adikaram *et al.*,

2002). Essendo la fioritura il momento in cui si verificano le maggiori infezioni (Powelson, 1960), intervenendo ad uno stadio intermedio prima della completa maturazione, quando le fragole sono ancora verdi, si può esercitare un controllo sul patogeno quiescente (Adikaram *et al.*, 2002). Lima e altri collaboratori (1997b) hanno verificato che un intervento con *A. pullulans* in piena fioritura riduce l'incidenza del marciume grigio mentre un trattamento effettuato subito prima della raccolta è meno efficace. Probabilmente ciò è dovuto alle infezioni latenti di *B. cinerea* presenti nei frutti (Lima *et al.*, 1997b; Ippolito e Nigro, 2000).

4.3.4 Utilizzazione dei microrganismi antagonisti

I microrganismi antagonisti possono essere utilizzati secondo due strategie:

- incremento dei microrganismi naturalmente presenti sul carpoplano;
- introduzione artificiale di microrganismi, selezionati tra quelli naturalmente presenti.

Spesso gli antagonisti artificialmente introdotti possono agire quali integratori dei microrganismi antagonisti già presenti nella comunità microbica.

L'incremento dei microrganismi naturalmente presenti sul carpoplano può essere ottenuta mediante l'attuazione di pratiche agronomiche e colturali favorevoli o comunque non dannose per la popolazione degli antagonisti. L'introduzione artificiale di microrganismi antagonisti in postraccolta ha dato risultati molto promettenti, maggiori di quelli ottenuti in altre fasi di produzione; le condizioni che caratterizzano questa fase sono infatti molto simili a quelle di laboratorio. Contro *P.*

expansum, *B. cinerea*, *Monilia spp.* e *R. stolonifer* su pesche, mele, pere, albicocche, nettarine, ciliegie e susine sono risultati efficaci diversi batteri: *P. syringae*, *B. subtilis*, *Enterobacter cloacae*. Tra i lieviti e i funghi lievitiforimi più efficaci nella lotta biologica contro patogeni postraccolta quali *B. cinerea*, *M. laxa*, *R. stolonifer*, *Penicillium spp.* e *A. niger* su fragole, mele, pere, uva da tavola, kiwi, ciliegie ed agrumi vi sono *A. pullulans*, *C. oleophila*, *C. sake*, *P. guilliermondii*, *R. glutinis*, *Trichoderma spp.*, *M. pulcherrima*. (Nigro *et al.*, 2009).

4.3.5. Miglioramento dell'efficacia degli antagonisti

Numerose sostanze consentono di migliorare la sopravvivenza e la capacità dei BCA di colonizzare le superfici dei vegetali. Tra queste vi sono additivi alimentari, nutrienti, altri coadiuvanti. La gomma xantano ha migliorato la sopravvivenza in campo di *A. pullulans* e di *M. pulcherrima*, nonché la loro attività. L'incremento di alcuni nutrienti porta ad un aumento della popolazione di microrganismi antagonisti naturalmente presenti sulla carposfera e/o artificialmente introdotti. Alcuni sali, come il cloruro di calcio, bicarbonato di sodio e propionato di calcio, hanno portato a migliori risultati nel caso di *A. pullulans* e/o di altri lieviti antagonisti contro marciumi postraccolta di uva da tavola, ciliegie e mele (Nigro *et al.*, 2009). La combinazione di agenti di biocontrollo e di alcuni additivi (sali di calcio organici e inorganici, gomme naturali e alcuni antiossidanti) ha prodotto un significativo aumento dell'efficacia dell'azione antagonistica nel controllo delle infezioni da *P. expansum* nelle mele conservate (Lima *et al.*, 2005).

Il prodotto biologico Aspire (a base di lievito *C. oleophila* ceppo 182) in combinazione con il 2% di bicarbonato di sodio esibisce una maggiore abilità nel biocontrollo (con effetto sia curativo che preventivo) contro i marciumi delle mele dovuti a *B. cinerea* e *P. expansum* e contro i marciumi delle pesche dovuti a *Monilinia* spp. e *R. stolonifer*. L'uso di additivi, come il sodio bicarbonato, può quindi costituire un metodo valido per incrementare l'efficacia dei lieviti antagonisti nella lotta ai patogeni fungini in postraccolta (Droby *et al.*, 2003). Alcuni studi hanno valutato l'effetto sinergico di batteri e lieviti nel contrastare gli attacchi di patogeni in postraccolta, considerando anche come alcune sostanze, quali alcuni aminoacidi, possono incrementare tale efficacia. (Janisiewicz e Bors, 1995).

Le applicazioni di fungicidi possono significativamente modificare l'entità della popolazione di lieviti della fillosfera operando una forte pressione selettiva per la resistenza ai fungicidi e questo può costituire un fattore importante nella ricerca di nuovi agenti di lotta biologica (Buck e Burpee, 2002). La popolazione epifitica di batteri, lieviti e funghi filamentosi è generalmente influenzata negativamente dalla lotta chimica. Tuttavia alcuni agenti di lotta biologica si sono rivelati resistenti alla maggior parte dei fungicidi utilizzati su uva da tavola e su mele; è possibile quindi attuare programmi di lotta integrata con mezzi chimici e biologici applicabili simultaneamente o in tempi diversi, in successione. (Nigro *et al.*, 2009).

4.3.6 Biodiversità dei lieviti

I lieviti rappresentano un'enorme fonte di biodiversità cui attingere per la selezione di nuovi agenti di lotta biologica. Numerosi studi scientifici

confermano le potenzialità di tali microrganismi. Per limitare le perdite nella conservazione di prodotti ortofrutticoli e cereali è risultato efficace il trattamento di superficie con lieviti antagonisti saprofiti: i patogeni non risultano inibiti dagli estratti cellulari ma dalla presenza delle cellule di lievito vitali che competono attivamente per i nutrienti (Spadaro e Gullino, 2004). I ceppi di varie specie di lieviti, come *C. oleophila*, *C. laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *M. pulcherrima*, *Pichia anomala* e *P. guilliermondii* sono stati studiati quali agenti di biocontrollo per le patologie fungine in postraccolta di frutta e cereali (Chalutz e Wilson 1990; Björnberg e Schnürer, 1993; Filinow *et al.*, 1996; Spadaro e Gullino, 2004).

Il concetto di biodiversità trova diverse definizioni ed interpretazioni. ‘*The convention of Biological Diversity*’ (Anonymous, 1992), definisce la diversità biologica come la variabilità tra gli organismi viventi provenienti dagli ecosistemi esistenti ed i complessi ecologici di cui fanno parte; ciò include la diversità all’interno delle specie, tra le specie, e degli ecosistemi. L’attenzione per tale argomento cresce anche in considerazione del fatto che solo una piccola parte della biodiversità esistente (circa l’8%) è conosciuta (Stork, 1999) mentre si rileva l’aumento del tasso di estinzione delle specie (Purvis e Hector, 2000; Lachance, 2006).

I lieviti sono microrganismi ubiquitari diffusi in una gran varietà di ecosistemi naturali ed artificiali. Le possibili combinazioni di fattori biotici ed abiotici presenti nei diversi habitat influenzano il metabolismo, lo sviluppo e la sopravvivenza dei lieviti che devono necessariamente adattarsi alle diverse condizioni per evitare la morte. Tra le cellule dei lieviti vi è un’ampia variabilità nella risposta ai fattori di stress che si rivelano eterogenei nello spazio e mutano nel tempo determinando effetti

diversi nei vari microambienti. Nonostante la complessità di tali interazioni, solo parzialmente note, le conoscenze di base acquisite sono importanti nella comprensione dell'ecologia e della biodiversità dei lieviti e nel controllo del loro sviluppo, per inibirlo o promuoverlo. Tra i fattori ambientali si citano quelli fisici della temperatura, pressione, luce e radiazione solare sottolineando che da un punto di vista più ampio tutti i fattori correlati alla localizzazione geografica come il clima (quindi le variazioni di temperatura), la vegetazione, gli insetti vettori, la composizione del suolo hanno un forte impatto sull'ecologia dei lieviti. I fattori chimici includono invece la disponibilità di nutrienti e di acqua, l'acidità e il pH, l'ossigeno e gli effetti di sostanze inibitorie ed antimicrobiche. Le informazioni disponibili riguardano soprattutto condizioni di laboratorio, data la complessità delle interazioni dei numerosi fattori nell'ambiente naturale. Gli effetti sulle cellule dell'azione simultanea di tali fattori, biotici ed abiotici, possono sommarsi o essere sinergici. La variabilità genetica è largamente presente nelle popolazioni microbiche e permette l'evoluzione biologica. Le nuove tecniche molecolari permetteranno di comprendere i meccanismi genetici e l'influenza che i diversi fattori ambientali hanno sui mutamenti genetici e sull'espressione genica (Deak, 2006; Gibson, 2002; Rodriguez-Valera, 2004).

Il numero delle specie di lieviti descritte è andato incrementandosi nel tempo (Lodder, 1970; Kurtzman e Fell, 1998) e nel 2016 potrebbe attestarsi a circa mille specie. Questo può essere spiegato considerando che i primi studi si sono basati su pochi elementi caratterizzanti, quali la morfologia e pochi test di crescita. Ampliando l'elenco delle proprietà nutrizionali valutate, il numero delle specie inizialmente individuato è quasi raddoppiato ed è ulteriormente aumentato con i primi approcci

molecolari per l'identificazione dei lieviti ed il più recente sequenziamento del DNA che hanno reso più agevole lo studio della biodiversità (Lachance, 2006). I metodi attuali (sequenze di geni e altri criteri molecolari) rivelano che i dati ottenuti dagli studi passati, basati sul fenotipo, sono molte volte non corretti ed è necessario quindi riesaminare le conclusioni da essi derivanti, effettuando identificazioni più accurate delle specie. Secondo gli studi fenotipici molte delle specie hanno distribuzioni molto ampie nei diversi ambienti (è il caso di *C. albidus* e *R. glutinis*) (Kurtzman e Fell, 2006). Tale concetto è stato confutato da Fonseca e altri collaboratori (2000) dimostrando che *C. albidus* comprende 12 specie e da Sampaio e altri collaboratori (2001) attraverso analisi delle specie identificate e simili fenotipicamente (*Rhodospiridium*) ed anche da Middelhoven e altri collaboratori (2004) che hanno rilevato che nuove specie descritte non sono distinguibili fenotipicamente né dalle specie correlate né da quelle non correlate. Analizzare la complessità delle interazioni ambiente/popolazione diventa molto difficile se non si conoscono le specie coinvolte. Si stima che soltanto l'1% delle specie di lieviti esistenti in natura siano state descritte. A differenza dei primi studi di tipo fenotipico, la disponibilità di vari metodi molecolari consente la rapida individuazione e l'accurata identificazione dei lieviti e questo permette di acquisire un notevole grado di chiarezza negli studi sull'ecologia dei lieviti (Kurtzman e Fell, 2006).

Da tempo gli alimenti e le bevande fermentate (pane, vino, birra, kefir) hanno rappresentato un esempio dell'applicazione dei lieviti nelle biotecnologie. Nel corso degli ultimi decenni i numerosi studi sulle diversità metaboliche dei lieviti hanno rivelato le loro notevoli proprietà in campo biotecnologico. Oltre agli appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, noti per la produzione di bevande alcoliche, esiste infatti nel mondo dei lieviti una vasta biodiversità e un promettente potenziale biotecnologico (Wolf *et*

al., 2003). Oltre alle numerose applicazioni in campo alimentare, chimico e farmaceutico, i processi che utilizzano le attività delle cellule e dei metaboliti dei lieviti rivestono un ruolo importante anche nelle biotecnologie per l'agricoltura e per l'ambiente. I prodotti e le molecole disponibili in commercio sono in gran numero ma altre tecnologie sono in fase di preparazione nei laboratori. I lieviti possono essere utilizzati per produrre cellule (quale fonte proteica), enzimi, lipidi, carotenoidi, vitamine, acidi organici, polisaccaridi extracellulari e numerose altre sostanze. Alcuni lieviti, al pari di batteri e lieviti filamentosi, sono capaci di degradare composti di sintesi derivanti da attività industriali (Buzzini e Vaughan - Martini, 2006). Altri utilizzano come unica fonte di carbonio ed energia derivati fenolici degradandoli completamente o in parte (Aleksieva *et al.*, 2002).

4.4 Integrazione dei diversi mezzi di lotta

Una coltura spesso è attaccata da più di un organismo nocivo per ognuno dei quali possono essere necessari diversi mezzi di difesa. L'integrazione delle varie forme di protezione e delle strategie disponibili contenendo al minimo l'uso di fitofarmaci, al fine di ottenere un risultato valido sia a livello economico che ambientale e sociale, viene definita 'produzione integrata'. Studiando l'epidemiologia delle malattie si riducono gli interventi con fitofarmaci praticandoli solo in seguito a campionamenti e sopralluoghi che ne rivelino la effettiva necessità (Lorenzini, 2001). Nella lotta integrata, quindi, si sfrutta la combinazione di due o più tipologie d'interventi volti a colpire il patogeno direttamente (con fungicidi, sostanze antimicrobiche naturali e agenti di lotta biologica),

o indirettamente (con interventi sull'ospite e/o sull'ambiente) con effetti additivi o sinergici. (Lima e De Cicco 2009). Sebbene i fungicidi sintetici siano tuttora i prodotti principali utilizzati nella lotta alle patologie degli ortofrutticoli in postraccolta, i notevoli risultati raggiunti negli ultimi decenni nell'individuazione di nuovi agenti di lotta biologica consente di predisporre strategie di lotta integrata con progressiva riduzione dell'uso di prodotti chimici (Spadaro e Gullino, 2004).

I metodi di difesa rientrano in tre categorie: induzione di resistenza delle piante, profilassi (prevenzione della malattia), terapia (cura delle infezioni in atto) e sono messi in pratica mediante diversi mezzi. L'impiego integrato di mezzi agronomici (tecniche colturali), genetici (selezione e miglioramento genetico), chimici, fisici (uso di agenti fisici per risanare piante o loro parti o ambienti), biologici (uso di organismi viventi con azione antagonistica o predatoria nei confronti dei patogeni o capaci di indurre resistenza nell'ospite), legislativi (norme che impediscono l'introduzione di agenti infettivi o ne circoscrivono la diffusione) permette di ottenere un'azione sinergica contro i patogeni, migliorando i risultati e riducendo i rischi connessi ai singoli mezzi di difesa (Lorenzini, 2001).

In postraccolta i mezzi fisici (basse temperature e atmosfera controllata o modificata) da soli non garantiscono un controllo efficace dei patogeni postraccolta, inoltre i pochi mezzi chimici autorizzati, se utilizzati frequentemente, sono correlati a problemi relativi alla salubrità degli alimenti e ai fenomeni di resistenza indotta nei patogeni. Le strategie alternative (il ricorso ad agenti di lotta biologica e a sostanze naturali) quando applicate da sole in condizioni commerciali non permettono di avere un risultato ottimale. Strategie di lotta integrata più facilmente accettabili dagli operatori postraccolta sono ad esempio l'uso ridotto di

fungicidi di sintesi in combinazione o in alternanza con altri interventi che non richiedono modifiche tecniche nella filiera produttiva. Un esempio è rappresentato dall'immersione dei frutti in acqua calda contenente una bassa dose di fungicida, seguita o meno dall'impiego di BCA, che risulta efficace contro diversi patogeni postraccolta. Un altro esempio è quello che prevede l'uso di cere naturali commestibili, per il rivestimento dei frutti, nelle quali è stato incluso il fungicida o il BCA. (Lima e De Cicco, 2009). Errampalli e altri collaboratori (2006a) hanno sperimentato che otto combinazioni di due concentrazioni dell'agente di biocontrollo *P. syringae* e di quattro concentrazioni del fungicida cyprodinil sono risultate più efficaci dell'applicazione del solo *P. syringae* o del solo cyprodinil nel controllo in postraccolta del marciume verde-azzurro delle mele da *P. expansum*; oltre al controllo della malattia provocata da ceppi di *P. expansum* resistenti al tiabendazolo, la lotta integrata permette di ridurre i residui di fungicida sui frutti. L'uso integrato di mezzi di lotta chimici e biologici è stato descritto per diversi patogeni: *Rhizoctonia* e *Pythium*; *Verticillium dahliae* (Cubeta e Echandi, 1991; Ordentlich *et al.*, 1990) e *Nectria galligena* e *B. cinerea* (Swinburne e Brown, 1976; Elad e Zimand, 1991) e *M. laxa* (de Cal *et al.*, 1994). Una combinazione di dosi ridotte di tiabendazolo e *C. laurentii* HRA5 o *R. glutinis* HRB6 ha prodotto un controllo su *P. expansum* su frutti di pera comparabile a quello ottenuto con le raccomandate alte dosi di fungicida (Chand-Goyal and Spotts 1996). L'integrazione di agenti di biocontrollo *R. kratochvilovae* LS11 e *C. laurentii* LS28 con bassi dosaggi dei fungicidi boscalid e cyprodinil si è rivelata una strategia efficace e sicura per controllare l'infezione da *P. expansum* delle mele, mantenendo bassi i residui dei fungicidi e la contaminazione da patulina (Lima *et al.*, 2011).

5. Scopo della ricerca

Nella fase postraccolta i prodotti ortofrutticoli, ricchi di acqua e di elementi nutritivi, rappresentano un substrato ideale per lo sviluppo di microrganismi patogeni che determinano marciumi con conseguente non commerciabilità del prodotto. Le perdite stimate si aggirano da un minimo del 10-15% nei Paesi a tecnologia avanzata ad oltre il 50% in quelli in via di sviluppo (Coursey e Booth, 1972; Wilson e Wisniewski, 1989). In Italia le percentuali sono dell'ordine del 10% (Alvisi, 1987). Il danno economico è elevato in quanto si verifica nelle ultime fasi della filiera, quando il prodotto ha acquisito un valore aggiunto determinato dai costi connessi ai precedenti stadi del processo produttivo.

Le infezioni fungine rappresentano la causa principale di tali perdite (Sommer *et al.*, 1992) e la contaminazione da micotossine, prodotte dai funghi fitopatogeni, pone un problema rilevante per la salute del consumatore. I fungicidi e le innovative tecnologie di conservazione (tra cui l'atmosfera controllata/modificata) hanno permesso di prolungare la *shelf life* dei prodotti, riducendo le perdite. Tuttavia gli interventi con agrofarmaci sono sottoposti alla rigida legislazione Comunitaria e Nazionale degli Stati membri: i principi attivi ammessi in fase postraccolta sono in numero limitato e per alcuni prodotti non è previsto l'uso di nessuna sostanza di sintesi. Tra le alternative all'uso di prodotti chimici di sintesi, l'uso di microrganismi antagonisti, i trattamenti con composti di origine naturale, i trattamenti con additivi alimentari dotati di attività antifungina e l'applicazione di mezzi fisici hanno dato risultati incoraggianti (Mari e Ippolito, 2009).

In particolare, nell'ambito della lotta biologica, i lieviti costituiscono una importante risorsa. Numerosi agenti di lotta biologica sono stati selezionati dalla fillosfera e dalla carposfera di diverse specie vegetali. La

biodiversità che caratterizza tali ecosistemi è influenzata da numerosi fattori. Nei laboratori di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise da diversi anni la ricerca si dedica alla selezione di agenti di lotta biologica e allo studio dei meccanismi che si instaurano tra ospite, patogeno e BCA. Oggetto di tali ricerche sono stati i meccanismi d'azione di alcuni BCA, quali i lieviti basidiomiceti *R. kratochvilovae* ceppo LS11 e *C. laurentii* ceppo LS28 e il fungo lievitifforme *A. pullulans* ceppo LS30, nella difesa dai patogeni principali in postraccolta (Castoria *et al.*, 1997, 2001, 2003; De Curtis *et al.*, 1996, 1998, 2004; Lima *et al.*, 1997a, 1997b, 1998, 2003, 2006). Per alcuni di questi BCA sono stati studiati gli effetti da essi determinati sulla produzione e sull'accumulo di alcune micotossine (patulina, ocratossina A) nei frutti in campo ed in conservazione (Castoria *et al.*, 2005; De Felice *et al.*, 2008).

Il BCA *R. kratochvilovae* LS11 (precedentemente classificato come *R. glutinis*) si è rivelato capace di degradare la patulina in due diversi composti (Castoria *et al.*, 2005) uno dei quali più stabile, identificato come DPA ed uno meno stabile ancora in fase di isolamento e caratterizzazione (Castoria *et al.*, 2011). La letteratura scientifica indica il DPA come prodotto non tossico per vari microrganismi, tra cui *Escherichia coli* DH5a, per i quali, nelle stesse condizioni di saggio, risulta invece tossica la patulina (Scott *et al.*, 1972; Wright *et al.*, 2008, 2013). Il *pathway* degradativo ipotizzato per *R. kratochvilovae* LS11 è stato confermato grazie ad un progetto bilaterale del gruppo del Prof. Castoria con il gruppo della prof. ssa Rosa Durán Patrón dell'Università di Cadiz (Spagna).

Gli interessanti risultati ottenuti per *R. kratochvilovae* LS11, isolato a Larino (CB) da drupe di olive (De Curtis, 1998), hanno portato a focalizzare l'attenzione sui lieviti rosa della regione Molise, approfondendo

le conoscenze sulla distribuzione delle specie anche nelle zone geografiche limitrofe. In tale contesto sono stati isolati, in un lavoro precedente (De Curtis *et al.*, 2009a, 2009b, 2010), 170 lieviti rosa dalla superficie di foglie e frutti di 35 specie vegetali in sei diverse zone del centro-sud Italia, nella prospettiva di individuare tra essi nuovi potenziali BCA. A tal fine in questo lavoro di ricerca sono stati purificati, catalogati utilizzando un codice alfanumerico e crioconservati alla temperatura di -80°C.

Lo scopo principale di questa ricerca ha riguardato la caratterizzazione molecolare dei lieviti rosa e la selezione di quelli con un'elevata capacità degradativa della micotossina patulina.

Ai fini della caratterizzazione molecolare, è stata effettuata l'estrazione del DNA genomico dei lieviti rosa, che è stato utilizzato per analisi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) delle regioni ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e per analisi delle sequenze nucleotidiche allo scopo di ottenere una prima probabile identificazione tassonomica. Una prima classificazione basata sull'analisi dei profili di restrizione delle regioni ITS ha individuato tra i lieviti rosa della collezione almeno dieci gruppi RFLP mentre il confronto delle sequenze del DNA di tali lieviti con quelle presenti nelle banche dati ha permesso una loro prima probabile identificazione tassonomica. Da tale confronto è emerso che i generi *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Rhodospiridium* spp., che in letteratura sono noti per le loro caratteristiche funzionali all'attività antagonista e/o degradativa di metaboliti tossici, risulterebbero maggiormente rappresentati rispetto agli altri generi *Erythrobasidium*, *Sporidiobolus*, e *Aureobasidium* spp..

Allo scopo di individuare tra i lieviti rosa della collezione quelli capaci di degradare la patulina, è stato effettuato uno *screening* di crescita in

substrato colturale liquido (LiBa) contenente la tossina. I lieviti risultati appartenere ai generi *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* ed *Erythrobasidium* spp. hanno tollerato la presenza della micotossina degradandola con formazione di DPA e ascladiolo. Per chiarire alcuni aspetti del processo degradativo della tossina da parte del lievito *R. kratochvilovae* LS11, parte di questo lavoro di ricerca è stato dedicato all'isolamento del metabolita più instabile che si forma durante tale degradazione, probabilmente un precursore del DPA, che non risulta ancora identificato.

6. Materiali e metodi

6.1 Microrganismi

- Per la ricerca sono stati utilizzati i lieviti isolati in un lavoro precedente presso il laboratorio di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise; durante questo lavoro di ricerca è stata allestita una collezione di lieviti rosa purificando e catalogando i 170 lieviti isolati da 35 specie vegetali in sei differenti zone climatiche rappresentative del centro-sud Italia: Larino (CB), Isole Tremiti (FG), Campomarino (CB), Petacciato (CB), Castel San Vincenzo (IS) e Portocannone (CB) (De Curtis *et al.*, 2009a, 2009b, 2010). I lieviti appartenenti a tale collezione sono stati crioconservati alla temperatura di -80°C in terreno colturale YPD_b al 40% di glicerolo.
- *Rhodospiridium kratochvilovae* isolato LS11, della collezione del Dipartimento A.A.A. dell'Università degli Studi del Molise, isolato da drupe di olive (De Curtis, 1998), agente di biocontrollo efficace

contro i più comuni patogeni fungini in post-raccolta (Castoria *et al.*, 1997, 2001, 2003; Lima *et al.*, 1998, 1999) e dotato di capacità degradativa *in vitro* nei confronti della micotossina patulina (Castoria *et al.*, 2005). Studi sull'eterogeneità fenotipica e genetica del lievito basidiomicete *R. kratochvilovae*, mediante tecniche diverse, ha portato ad una riclassificazione dell'isolato LS11 da *Rhodothorula glutinis* a *R. kratochvilovae* (Barnett *et al.*, 2000; Sampaio *et al.*, 2001).

- *Cryptococcus laurentii* isolato LS28, della collezione del Dipartimento A.A.A. dell'Università degli Studi del Molise, isolato da mele, *cultivar* Annurca (Lima *et al.*, 1998), agente di biocontrollo con efficace attività antagonistica contro *B. cinerea* e *P. expansum* su mele ferite conservate alle temperature di 3°C e 20°C (Lima *et al.*, 1998, 2003).
- *Penicillium expansum* 7015, della collezione 'Toxigenic Fungi Culture Collection' dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA-CNR) di Bari.

6.2 Substrati colturali

I substrati colturali utilizzati sono stati i seguenti:

- YPD Agar ("Yeast Extract Peptone Dextrose"), contenente 20 g glucosio, 20 g bacteriological peptone, 10 g yeast extract, 20 g agar, un litro di acqua distillata;

- NYD Agar (Nutrient Yeast-extract Dextrose Agar), contenente 10 g di glucosio, 5 g di yeast extract, 8 g di nutrient broth, 15 g di agar, un litro di acqua distillata;

per ognuno dei due terreni i componenti sono stati disciolti in 900 ml di acqua distillata utilizzando un agitatore magnetico; successivamente la soluzione è stata portata a volume con acqua distillata ed è stata sterilizzata in autoclave alla temperatura di 120°C per 20 minuti. Successivamente il substrato è stato distribuito in piastre Petri, lasciate raffreddare e conservate a 4°C fino all'utilizzo.

- NYDb (Nutrient Yeast-extract Dextrose broth), contenente 8 g di nutrient broth, 5 g di yeast extract, 10 g di glucosio, un litro di acqua distillata; le sostanze sono state disciolte in 900 ml di acqua distillata utilizzando un agitatore magnetico; successivamente la soluzione è stata portata a volume con acqua distillata ed è stata sterilizzata in autoclave a 120°C per 20 min.
- Lilly Barnett (Lilly & Barnett, 1951), un substrato contenente le minime quantità dei nutrienti necessari alla crescita dei microrganismi; le dosi per un litro di acqua sono state le seguenti: 10.0 g D-glucosio, 2.0 g L-asparagina, 1.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$. Per la preparazione della *stock solution* 200X (200 volte più concentrata) le dosi per 500 ml sono: 0.001 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.87 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.3 g $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.01 g biotina, 0.01 g tiamina. La preparazione del terreno ha osservato il seguente protocollo: il glucosio, il KH_2PO_4 e il $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ sono stati disciolti in 895 ml di acqua distillata; in seguito la soluzione è stata sterilizzata in autoclave a 120°C per 20 minuti. Intanto separatamente l'L-asparagina è stata disciolta in 100 ml di acqua distillata utilizzando

un agitatore magnetico mentre a parte è stata preparata la *stock solution* degli altri costituenti (200 X) filtrosterilizzandola con filtri 0.2 µm in una bottiglia sterile. Infine, quando la soluzione acquosa di 895 ml si è raffreddata a temperatura ambiente, vi sono stati aggiunti i 100 ml della soluzione di asparagina sterilizzati mediante filtri 0.2 µm e 5 ml di *stock solution* 200 X sterile. Il substrato Lilly Barnett e la *stock solution* sono conservati a 4°C in bottiglie scure.

- PDAgar (Potato Dextrose Agar) modificato: le dosi per un litro di substrato sono state 200 g di patate, 20 g di D-glucosio, 20 g di agar. Le patate, sbucciate e tritate sono state fatte bollire per 15-20 minuti dall'ebollizione in 1 litro di acqua distillata e filtrate. Al filtrato sono stati aggiunti gli altri componenti, portando a volume e infine sterilizzando in autoclave.

6.3 Reagenti chimici

- Patulina: la patulina è commercializzata come polvere bianca cristallina; è solubile in etilacetato con formazione di una soluzione limpida ed incolore. (Merck Index, 1996). In questa sperimentazione la patulina è stata prodotta da *P. expansum* 7015 e purificata (Ianiri *et al.*, 2013). Il fungo è stato inoculato nel substrato *potato dextrose broth* (PDb) modificato diluito 1:10 con acqua, e incubato, in agitazione a 150 rpm, a 24°C per circa 7 giorni. Il brodo colturale è stato quindi sottoposto a filtrazione ed estrazione (ripetuta due volte) con etilacetato. L'estratto è stato privato dei residui di acqua utilizzando Na₂SO₄ anidro e portato a secco mediante evaporatore rotante ad una temperatura non superiore ai 40°C. La purificazione è stata effettuata mediante cromatografia su colonna in gel di silice

(Merck, Darmstadt, Germany) usando miscele di esano/etilacetato come fase mobile. La patulina commerciale (A.G. Scientific, San Diego, CA) è stata utilizzata come standard di riferimento. La patulina purificata è stata quantificata comparando, in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), l'area sottostante il picco rilevato con quella ottenuta da quantità note dello standard di riferimento. La patulina è conservata a -20°C, in polvere o disciolta in etilacetato. La *stock solution* di patulina utilizzata in laboratorio è stata preparata dissolvendo la micotossina in etilacetato per una concentrazione finale di 2000 µg/ml; aliquote da 1 ml sono state conservate a -20°C. Per gli esperimenti sono stati prelevati opportuni volumi della soluzione concentrata, portando poi a secco mediante flusso di azoto ed aggiungendo il volume di substrato LiBa (Lilly e Barnett, 1951) o di acqua sterile acidificata a pH 4 con acido acetico glaciale, necessario ad ottenere la concentrazione finale voluta. Lo spettro di risonanza magnetica nucleare (RMN), che ha confermato la struttura della patulina, verifica la purezza delle preparazioni di patulina cristallina (Woodward e Singh, 1949; Scott, 1974). La patulina ottenuta secondo il procedimento sopra indicato ha mostrato uno spettro RMN paragonabile a quello del prodotto commerciale puro.

- DPA: il DPA, non reperibile in commercio, è stato ottenuto mediante estrazione con acetato di etile e purificazione mediante cromatografia su colonna in gel di silice degli estratti colturali di *R. kratochvilovae* LS11 incubato in presenza di patulina; successivamente è stato disciolto in acetato di etile alla concentrazione di 2000 µg/ml e mediante opportune diluizioni sono stati ottenuti gli standard alle concentrazioni desiderate;

- EB (Extraction Buffer): le dosi sono riferite ad una stock solution di 50 ml: 1ml Triton X100 2% (v/v), 0.5 g. SDS 1% (p/v), 1 ml di una soluzione 5 M NaCl (100mM), 0.5 ml di una soluzione 1 M Tris-Cl (10mM) pH 8, 0.1 ml di una soluzione di 0.5 M EDTA (1mM) pH 8;
- TE (Tris-EDTA): 10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA pH 8;
- TAE 20X (Tris-Acetate-EDTA) le dosi sono riferite ad una stock solution di un litro: 96.8 g di Tris base, 22.84 ml acido acetico glaciale, 40ml EDTA 0.5M pH 8;
- Gel di agarosio(0.8 %): 0.8 g Agarosio, 100 ml TAE, 0.5 µg/ml Bromuro di Etidio;
- Gel di agarosio (1.5%): 1.5 g Agarosio, 100 ml TAE, 0.5 µg/ml Bromuro di Etidio;
- Gel di agarosio (2.5%): 2.5 g Agarosio, 100 ml TAE, 0.5 µg/ml Bromuro di Etidio;
- MBTH (*3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone*, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in soluzione acquosa 0.5% (p/v).

6.4 Estrazione del DNA genomico dei lieviti rosa

Il protocollo utilizzato per l'estrazione del DNA genomico è stato quello descritto da Hoffman e Winston (1987), leggermente modificato.

Le colture di lievito, ottenute inoculando 15 ml di terreno NYDb in tubi falcon da 50 ml, incubate su agitatore rotante a 150 rpm a 23°C per una notte, sono state centrifugate a 4000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente (18°C) per eliminare il surnatante (terreno colturale) ed ottenere il

pellet cellulare. Il pellet ottenuto è stato distribuito in tubi eppendorf da 2 ml utilizzando puntali da 1 ml. E' stata aggiunta acqua ultrapura (MQ) sterile per allontanare dal pellet i residui del substrato ed è stata effettuata una nuova centrifugazione a 5000 rpm per 5 minuti. Dopo i lavaggi, il pellet è stato risospeso con aggiunta di acqua ultrapura (MQ) e sterile (50 µl); è stato quindi sottoposto ad agitazione con vortex per 4 minuti, sono stati aggiunti 200 µl di EB e poi 200 µl di Fenolo: Cloroformio: Alcool Isoamilico (25:24:1) e 300 mg di biglie di vetro ("glass beads") da 0.45 µm di diametro e di nuovo è stato sottoposto ad agitazione con vortex per 2-3 min. Le biglie di vetro utilizzate sono state prima sottoposte ad un lavaggio con acido nitrico 6.5%, poste in agitazione per una notte, risciacquate cinque volte con acqua distillata ed infine asciugate in stufa.

Successivamente le cellule sono state centrifugate per 15 min a 14.000 rpm. Quindi è stata prelevata la fase liquida sovrastante trasferendola in nuovi tubi eppendorf da 2 ml ed addizionando in proporzione 1/10 un volume di 3M sodio acetato pH 5.2 e 2 volumi di isopropanolo e ponendo a -20°C per 10 minuti. In seguito è stata effettuata una centrifugazione a 14000 rpm per 5 minuti a 4°C e, dopo aver eliminato le fasi liquide sovrastanti, i pellet sono stati lavati per due volte con 500 µl di etanolo al 70% e lasciati asciugare per eliminare i residui di etanolo; ogni pellet è stato risospeso in 50 µl di TE buffer (10 mM Tris·Cl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8.0), e conservato a 4°C *overnight*. In seguito è stato trattato con l'enzima RNAsi (1mg/ml) ponendo il campione (di circa 50 µl) a 37°C per 30 minuti (per attivare l'azione enzimatica) e conservato a - 20°C.

6.4.1 Quantificazione del DNA genomico dei lieviti rosa

Il DNA genomico estratto è stato quantificato tramite gel elettroforetico (0.8% di agarosio), usando 10 µl di MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas International, Milano) e 2 µl di ogni campione.

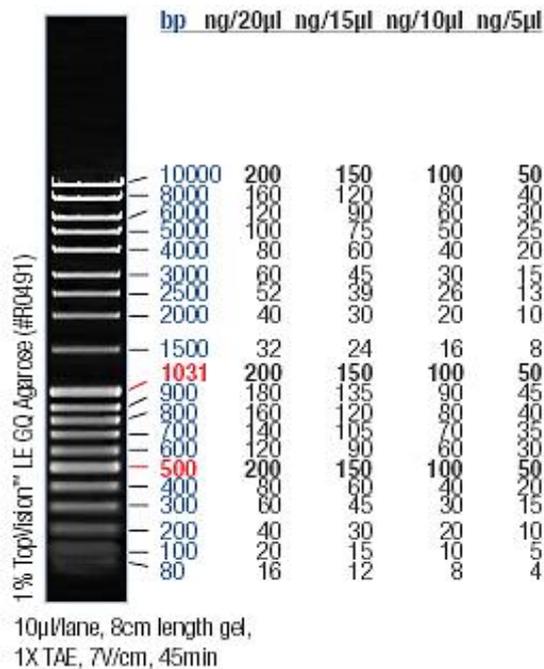


Figura 1. *MassRuler*

6.4.2 Amplificazione delle regioni ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

L'amplificazione della regione ITS1-5.8S-ITS2 è stata effettuata utilizzando i primer universali ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') e ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') (White *et al.*, 1990). Le analisi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sono state eseguite utilizzando il kit commerciale ricombinante Taq DNA polimerasi (Invitrogen, Milano, Italia). La composizione di ogni miscela di reazione di 50 µl è stata: 100 ng di DNA stampo, tampone di PCR 1X, 1,5 mM di MgCl₂, 0.2 mM di dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 mM di ciascun primer e 6 U di Taq

DNA polimerasi (Invitrogen, Milano, Italia). L'amplificazione è stata effettuata in un termociclatore TECHNE termica (TC-512 Barloword Scientific Ltd Staffordshire, Regno Unito); utilizzando una denaturazione iniziale di 2 minuti a 94°C seguita da 40 cicli di 15 sec a 94°C, 15 sec a 55°C e 1 min a 72°C, e la fase di estensione per 5 min a 72 ° C. Venticinque microlitri dei prodotti di amplificazione ottenuti sono stati successivamente analizzati su gel elettroforetico (1,5% di agarosio); in seguito è stato estratto il DNA dalle singole bande con il kit "NucleoSpin Extract II" (Clontech Laboratories, Inc.); il DNA estratto è stato destinato all'analisi di sequenziamento. I restanti 25 µl sono stati utilizzati per l'analisi RFLP, quindi per la digestione con l'enzima di restrizione *Hinfl*.

6.4.3 Purificazione dei prodotti PCR

Per il sequenziamento del prodotto ottenuto dalla PCR, dai 50 µl iniziali sono stati prelevati 25µl per la separazione mediante elettroforesi su gel di agarosio. Le bande sono poi state rimosse dal gel e purificate seguendo il protocollo del kit 'NucleoSpin Extract II'.

Al termine della corsa elettroforetica le bande di interesse (di dimensioni di circa 600 bp) sono state tagliate dal gel di agarosio con l'ausilio di un bisturi, pesate e trasferite in tubi eppendorf aggiungendo per ogni 100 mg di agarosio del gel, 200 µl di Buffer NT. I campioni sono stati incubati a 50°C in bagno termostatico per 10 min ed agitati ad intervalli di 2-3 minuti per favorire lo scioglimento dell'agarosio. I campioni sono stati caricati negli appositi tubi eppendorf del kit di estrazione e centrifugati per 1 min a 11.000 rpm. Eliminato il surnatante, sono stati addizionati 600 µl di Buffer

NT3 ed è stata ripetuta la centrifugazione per 1 min a 11.000 rpm. Eliminato di nuovo il surnatante, è stata ripetuta la centrifugazione per 2 min a 11.000 rpm per eliminare tutto il Buffer NT3. Eliminato il surnatante, è stato posto il tubo eppendorf del kit in una nuova eppendorf da 2 ml e sono stati aggiunti 22 µl di Buffer NE incubando a temperatura ambiente per un minuto; infine è stato centrifugato per 1 min a 11.000 rpm.

6.4.4 Digestione dei prodotti PCR con enzima di restrizione *Hinf*I

I prodotti PCR delle regioni ITS sono stati sottoposti a digestione utilizzando l'enzima di restrizione *Hinf*I (Promega, Milano); la sequenza di cinque paia di basi riconosciuta da tale enzima è la seguente:

5' ___ **G A N T C** ___ 3'

3' ___ **C T N A G** ___ 5'

Il Buffer associato all'enzima (NE BUFFER2) è costituito da:

50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; pH 7.9 a 25°C.

La digestione è stata effettuata aggiungendo ai 25 µl di campione, 2.88 µl di NE BUFFER 2 e 1 µl (10 U) di *Hinf*I, i campioni così ottenuti sono stati posti in bagno termostatico a 37°C per 90 min. Quindi è stata effettuata l'analisi della digestione mediante gel elettroforetico all'1,5% di agarosio in TAE buffer contenente 0,5 µg/ml di etidio bromuro. In ogni gel elettroforetico è stato incluso il marcatore molecolare "50 bp Ladder" (Fermentas International Inc.).

6.5 Saggi di degradazione della patulina

I lieviti rosa della collezione sono stati sottoposti ad uno *screening* allo scopo di individuare quelli che, in presenza della micotossina, riescono a crescere e a degradarla.

Dopo una prova preliminare (esperimento pilota, dati non mostrati) lo *screening* è stato effettuato utilizzando piastre multiwell da 96 pozzetti, con 200 µl di substrato LiBa per ogni pozzetto; la concentrazione iniziale di patulina è stata di 100 µg/ml; la persistenza della micotossina è stata rilevata dopo 1, 3, 6 giorni di incubazione, mediante analisi cromatografica, *Thin Layer Chromatography* (TLC).

Ogni lievito è stato coltivato in piastra Petri su substrato YPD Agar a $23^{\circ}\text{C}\pm 1$ per 48/72 ore; successivamente un inoculo di tale coltura è stato trasferito in un tubo falcon da 50 ml contenente 10 ml del mezzo di coltura (LiBa) posto in incubatore alla temperatura di 23°C in agitazione a 150 rpm per due giorni. Al terzo giorno sono stati aggiunti altri 10 ml di substrato LiBa per indurre un *restart* della crescita. Il giorno successivo per ogni lievito è stata effettuata la conta al microscopio mediante camera di Thoma in modo da poter calcolare il volume di coltura da prelevare per avere le cellule necessarie per una concentrazione cellulare finale di 1×10^7 CFU/ml mediante la formula: $C_f \times V_f = C_i \times V_i$

Dove: C_f = concentrazione finale; C_i = concentrazione iniziale; V_f = volume finale; V_i = volume iniziale.

È stato quindi prelevato il volume di coltura necessario, trasferito in una eppendorf e centrifugato per ottenere il pellet cellulare; quest'ultimo, dopo avere eliminato il liquido colturale, è stato risospeso in un volume di 300 µl di LiBa per ottenere una sospensione cellulare del lievito a concentrazione

doppia rispetto a quella finale. Un volume opportunamente calcolato di *stock solution* di patulina è stato portato a secco mediante flusso di azoto e risospeso in un volume di LiBa di 300 µl necessario per ottenere il doppio della concentrazione finale di 100µg/ml della tossina; la soluzione è stata filtrosterilizzata utilizzando filtri da 0.22 µm. Infine la sospensione cellulare e la soluzione di patulina sono state miscelate per ottenere il volume finale di 600 µl alla concentrazione di 100 µg/ml di patulina da distribuire nei pozzetti.

Per ogni lievito sono state predisposte tre repliche (tre pozzetti) contenenti ognuna 200 µl di LiBa, il lievito (1×10^7 UFC/ml) e la patulina (100 µg/ml). In ogni piastra multiwell sono stati testati sei lieviti. Colture di *R. kratochvilovae* LS11 e di *C. laurentii* LS28, già noti per la loro capacità di degradare la micotossina, hanno rappresentato i controlli di riferimento. In ogni piastra multiwell sono stati predisposti due controlli, uno negativo costituito dal solo substrato di coltura (LiBa) e uno positivo costituito da LiBa con aggiunta di patulina (100 µg/ml). Le piastre multiwell così assemblate sono state incubate alla temperatura di $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ in agitazione a 200 rpm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1	1	1		2	2	2			C1	
C											C1	
D		3	3	3		4	4	4			C1	
E												
F		5	5	5		6	6	6			C2	
G											C2	
H											C2	

Fig. 2. Schema della disposizione dei lieviti nella piastra multiwell utilizzata nei saggi di degradazione.

Dove:

B2, B3, B4 = lievito a + LiBa + patulina 100 µg/ml

B6, B7, B8 = lievito b + LiBa + patulina 100 µg/ml

D2, D3, D4 = lievito c + LiBa + patulina 100 µg/ml

D6, D7, D8 = lievito d + LiBa + patulina 100 µg/ml

F2, F3, F4 = lievito e + LiBa + patulina 100 µg/ml

F6, F7, F8 = lievito f + LiBa + patulina 100 µg/ml

B11, C11, D11 = LiBa + patulina 100 µg/ml (controllo positivo)

F11, G11, H11 = LiBa (controllo negativo)

La persistenza della patulina e la sua degradazione nel mezzo di coltura è stata monitorata mediante analisi TLC degli estratti colturali corrispondenti a 1, 3, 6 giorni di incubazione. I volumi prelevati, di 30 μ l per ogni pozzetto, sono stati trasferiti in tubi eppendorf e sottoposti ad estrazione con etilacetato (aggiungendo un pari volume di solvente e ripetendo l'operazione due volte). Gli estratti sono stati quindi portati a secco mediante flusso di azoto e risospesi in 10 μ l di etilacetato. I campioni ottenuti sono stati caricati su lastre TLC in gel di silice da 0,25 mm con indicatore di fluorescenza (Merck Kiesegel 60 F₂₅₄, Darmstadt, Germany), in precedenza attivate in stufa a 120°C per un'ora. Le lastre TLC sono state quindi poste in *tank* di vetro contenente la fase mobile T:E:F (toluene:etilacetato:acido formico) nel rapporto 5:4:1 (v/v/v), a temperatura ambiente. A fine corsa ogni lastra è stata asciugata con flusso di aria a temperatura ambiente e visualizzata alla luce UV ($\lambda = 254$ nm) che ha permesso di rilevare la presenza degli spot della patulina e/o di altri metaboliti.

E' stata effettuata la misurazione del fattore R_f che è dato dal rapporto tra:

$$R_f = dr/dm$$

dove dr è la distanza percorsa dallo spot dalla linea di caricamento del campione e dm la distanza compresa tra la linea di caricamento dei campioni ed il fronte del flusso del solvente.

6.6 Metabolita intermedio derivante dalla degradazione della patulina da parte del lievito *R. kratochvilovae* LS11

L'incubazione aerobica della patulina con l'agente di biocontrollo *R. kratochvilovae* (LS11) porta alla progressiva scomparsa dello spot relativo alla patulina ed alla contemporanea comparsa di due nuovi spot, uno dei quali scompare nel tempo. Dei due composti quello che risulta più stabile è stato purificato e caratterizzato, mediante risonanza magnetica nucleare, come acido desossipatulिनico. L'incubazione del lievito LS11 con patulina marcata con ^{13}C ha permesso di verificare che il DPA deriva dalla metabolizzazione della micotossina da parte del lievito. L'acido desossipatulिनico risulta essere molto meno tossico della patulina sui linfociti umani; questo potrebbe essere dovuto all'idrolisi dell'anello lattonico ed alla perdita del gruppo funzionale che reagisce con gruppi tiolici (Castoria *et al.*, 2011).

Il metabolita più instabile o secondo metabolita (X2), derivante dalla degradazione aerobica della patulina da parte del lievito *R. kratochvilovae* LS11, corrispondente ad uno dei due nuovi spot comparsi sulle lastre TLC, non è stato ancora identificato.

Allo scopo di studiare gli intermedi di reazione derivanti della degradazione della patulina, presso i laboratori di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise sono stati effettuati, in altri lavori, numerosi esperimenti che hanno portato alla messa a punto di diversi protocolli (Wright *et al.*, 2008, 2013). In particolare un metodo, denominato 'large filter assay' nella fase di sperimentazione avvenuta in parte anche durante lo svolgimento di questo lavoro di ricerca, è stato utilizzato per estrarre e purificare il secondo metabolita (X2). Seguendo tale procedura sono stati quindi effettuati diversi esperimenti di

degradazione della micotossina patulina da parte del lievito *R. kratochvilovae* LS11 su terreno di coltura semisolido (LiBa) posto su supporti di cellulosa (filtri).

Di seguito le fasi del '*large filter assay*':

- preparare n. 4 dischi di carta da filtro di 4.8 cm di diametro e sterilizzarli in autoclave;
- disporre ogni disco di carta da filtro sterile in una piastra Petri del diametro di 5 cm, sterile;
- preparare la patulina, dissolvendone 8.5 mg in 0.85 ml di acqua acidificata a pH4 con acido acetico glaciale, in modo da avere, considerando le perdite dovute alla filtrosterilizzazione, 200 μ l (contenenti 2 mg di tossina) da distribuire in modo omogeneo su ogni filtro;
- preparare il soft-agar (0.875% di agar in soluzione acquosa) e sterilizzarlo in autoclave mantenendolo in bagno termostatico a 48°C;
- preparare una stock solution 5X di Lilly Barnett (conservata a 4°C al riparo dalla luce) miscelando, per 100 ml, i seguenti tre componenti
 - a) 5 g D-glucose, 0.5 g KH_2PO_4 , 0.25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ disciolti in 47.5 ml di acqua ed autoclavati;
 - b) 1 g di asparagina disciolto in 50 ml di acqua, filtrosterilizzato con filtri 0.2 μm ;
 - c) 2.5 ml di una *stock solution* 200 X sterile; 500 ml di *stock solution* contengono 0.001 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.87 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.3 g $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.01 g biotina, 0.01 g tiamina e 500 ml acqua distillata, la miscela è filtrosterilizzata.

- Quando la miscela di soft-agar (0.875% agar) è alla temperatura di 48°C, aggiungere 1 parte di *stock solution* 5X LiBa a 4 parti di soft-agar in un tubo falcon sterile, miscelare e mantenere in un bagno termostatico alla temperatura di 48°C. Per 4 filtri sono necessari 22.5 ml di tale miscela (18 ml di soft-agar e 4.5 ml di *stock solution* Lilly Barnett 5X); distribuirne velocemente 5 ml su ogni filtro, attendere qualche minuto per la solidificazione.
- Preparare le cellule di lievito *R. Kratochvilovae* ceppo LS11, prelevando da una coltura di 24-48 ore di incubazione su YPD Agar l'intera massa cellulare e sospenderla in 3 ml di acqua sterile ponendola in uno o più tubi eppendorf sterili; centrifugare per eliminare la fase liquida. Su ogni filtro trattato con la patulina e ricoperto con il LiBa- soft agar distribuire 19 gocce da 5 µl, ognuna contenente approssimativamente 1.4×10^7 cellule di lievito.
- Le piastre così ottenute devono essere chiuse con pellicola e messe ad incubare per 2-3 giorni alla temperatura di 25°C ed elevata UR (posizionarle su uno strato di carta da filtro imbevuto di acqua sterile e chiuderle in sacchetti di plastica trasparente).
- Al termine dell'incubazione porre 4-5 filtri in una bottiglia di vetro da 100 ml, aggiungere circa 2 ml di acido acetico, chiudere la bottiglia con il tappo a vite ed agitare energicamente per circa 30 secondi. Aggiungere 20 ml di etilacetato ed agitare nuovamente.
- Filtrare l'estratto ottenuto attraverso un imbuto con cotone idrofilo e sodio solfato anidro, raccogliendo il filtrato in un matraccio; aggiungere altri 20 ml di etilacetato ai filtri contenuti nella bottiglia e ripetere l'estrazione e la successiva filtrazione utilizzando l'etilacetato per recuperare ogni residuo.

- Portare a secco l'estratto ottenuto utilizzando un evaporatore rotante (temperatura massima 40°C) e conservarlo in congelatore a -20°C nel matraccio ben chiuso.
- Prelevare l'estratto dal congelatore e risospenderlo in un piccolo volume di etilacetato (1 ml). Trasferire una goccia (1-5 µl) dell'estratto sulla base di una lastra TLC (Merck Kiesegel 60 F₂₅₄, Darmstadt, Germany). Usare come fase mobile una miscela toluene/etilacetato/acido formico (5:4:1) ed osservare alla luce UV (λ 254 nm) la lastra TLC asciutta. Usare poi come rivelatore una soluzione di MBTH 0.5% p/v in acqua distillata. Porre la lastra TLC in stufa a 135°C per 30 minuti.

Nei laboratori del Dipartimento di Chimica Organica dell'Università di *Cadiz* (Spagna) è stata seguita tale procedura, con l'obiettivo di ottenere una quantità di 'X2' sufficiente per poterlo purificare e caratterizzare. L'analisi mediante TLC degli estratti colturali ai diversi tempi di incubazione ha fatto rilevare tre spot principali aventi rispettivamente $R_f = 0.56$; 0.46 ; 0.38 . Dalla letteratura scientifica tali spot corrispondono rispettivamente alla patulina, al DPA e al secondo metabolita (Castoria *et al.*, 2011). Durante le fasi di estrazione e di purificazione il prodotto 'X2' è risultato fortemente instabile ed è stato rilevato sempre in quantità minoritaria rispetto agli altri componenti. Tutti i campioni ottenuti nelle diverse fasi sperimentali sono stati portati a secco mediante evaporatore rotante e conservati in congelatore alla temperatura di -20°C in atmosfera inerte (argon). Per le operazioni di purificazione mediante cromatografia su colonna in gel di silice sono state testate differenti miscele solventi, esano:etilacetato e toluene: etilacetato: acido formico (T:E:F), per individuare la fase mobile più efficace per separare i composti.

La difficoltà principale nel monitorare il procedere della purificazione è stata quella di dover ricorrere al rivelatore MBTH che richiede tempi operativi lunghi in relazione all'instabilità del prodotto 'X2'. Per questo motivo sono stati testati altri rivelatori quali la vanillina, l'oleum e l'acido fosfomolibdico. Per la separazione dei componenti degli estratti colturali mediante *preparative thin-layer chromatography* (PLC silica gel 60 F₂₅₄, 1mm, 20x20cm, Merck) è stata utilizzata come fase mobile la miscela T:E:F 5:4:1; il campione è stato disciolto nel minimo volume possibile di etilacetato e caricato nella misura di 20 mg per ogni lastra. Sono state rilevate tre larghe bande visibili alla luce UV (λ 254 nm); la silice corrispondente alla zona sottostante la banda relativa al DPA è stata sottoposta ad estrazione (ripetuta tre volte) con etilacetato. La TLC di controllo ha evidenziato che non è stato ottenuto il metabolita 'X2' puro, essendo presente anche DPA. Per evitare la degradazione del metabolita 'X2' durante le operazioni di estrazione e di purificazione sono state effettuate reazioni di metilazione e di acetilazione per stabilizzarne la molecola. Per la metilazione si è proceduto disciogliendo un estratto colturale in una miscela di diclorometano/metanolo 1:1. La soluzione, in atmosfera inerte, è stata posta su un agitatore magnetico ed è stato aggiunto D-trimetilsilildiazometano mantenendo l'agitazione per circa 12 ore. Il prodotto di reazione è stato quindi portato a secco e disciolto in etilacetato. Per la reazione di acetilazione è stata utilizzata anidride acetica e piridina mantenendo in agitazione e seguendo l'evoluzione della reazione mediante TLC. Per le analisi RMN (Agilent 400MR, *VnmrJ Versión 3.2 Rev. A*) dei prodotti ottenuti dalla purificazione mediante cromatografia su colonna in gel di silice e PLC è stato utilizzato come solvente il cloroformio deuterato.

7. RISULTATI

La prima parte di questo lavoro ha riguardato la purificazione, catalogazione e crioconservazione alla temperatura di -80°C dei lieviti isolati dalla fillosfera e carposfera di varie specie vegetali in sei diverse località del centro-sud Italia in un lavoro precedente (De Curtis *et al.*, 2009a, 2009b, 2010).

7.1 Analisi RFLP

Per uno *screening* preliminare a scopo tassonomico dei lieviti è stata utilizzata l'analisi RFLP delle regioni ITS. All'estrazione del DNA genomico dei lieviti rosa della collezione è seguita l'amplificazione delle regioni ITS mediante PCR. Il prodotto PCR è stato quindi utilizzato in parte per la digestione con l'enzima di restrizione *Hinf*I, con individuazione dei gruppi RFLP, ed in parte per ottenere le sequenze genetiche per l'identificazione tassonomica. Tra i 170 lieviti della collezione sono stati individuati almeno dieci diversi profili, corrispondenti ai gruppi RFLP contrassegnati con le lettere dalla A alla J. Di seguito l'elenco dei lieviti appartenenti ai diversi gruppi RFLP.

Gruppo A (L2, L3, L75, L89, L91, L129, L144, L147, L150, L158, L160, L161, L162A, L162B, L163, L166, L167, L207, L231, L235 e L237) con un profilo RFLP composto da tre bande (300 bp, 190 bp, 165 bp); **Gruppo B** (L244, L377, L394, L405 e L413) con un profilo RFLP composto da tre bande (170 bp; 130 bp; 80 bp), **Gruppo C** (L226, L239, L241, L242, L375, L387, L422, L427, L384 e L448) con un profilo RFLP composto da quattro bande (280 bp, 140 bp, 95 bp, 8 bp), **Gruppo D** (L393, L382, L383, L389, L395, L398, L399, L425, L431 e 437), con un profilo RFLP composto da

tre bande (270 bp, 200 bp, 150 bp), **Gruppo E** (L4, L94, L104, L105, L106, L107, L109, L110, L111, L127, L139, L143, L145, L148, L151, L154, L155, L156, L168, L172, L175, L178, L183, L201, L209, L210, L215, L257, L268, L345, L350, L351, L353, L357, L359, L361, L362, L363, L366, L370, L371B, L372 e L373) con un profilo RFLP composto da sei bande (220 bp, 130 bp, 115 bp, 90 bp, 60 bp, 8 bp), **Gruppo F** (L200 e i ceppi di riferimento LS11, PYCC 4818, SJ73, SJ76, SJ77, SJ94, SJ176 e SJ178), con un profilo RFLP composto da sei bande (232 bp, 130 bp, 117 bp, 90 bp, 60 bp, 8 bp), **Gruppo G** (L206, L384B e L435, e il ceppo di riferimento L-76-2) con un profilo RFLP composto da cinque bande (285 bp, 130 bp, 105 bp, 100 bp, 8 bp), **Gruppo H** (L249) con un profilo RFLP composto da quattro bande (300 bp, 190 bp, 100 bp, 45 bp), **Gruppo I** : (L420, L371A e L386A), con un profilo RFLP composto da due bande: 320 bp, 280 bp; **Gruppo J** : (L421), con un profilo RFLP composto da quattro bande: 310 bp, 280 bp, 140 bp, 55 bp; **Gruppo K** : (LS69), con un profilo RFLP composto da quattro bande: 330 bp, 210 bp, 80 bp, 8 bp; **Gruppo L** : (LS70), con un profilo RFLP composto da sei bande: 230 bp, 210 bp, 180 bp, 140 bp, 120 bp, 75 bp.

7.2 Identificazione tassonomica

Per quanto riguarda il sequenziamento del prodotto PCR invece, i campioni sono stati inviati ad un laboratorio esterno e le sequenze ottenute sono state utilizzate per un confronto con quelle presenti nelle banche dati giungendo ad una prima probabile individuazione delle specie di appartenenza dei lieviti rosa della collezione. I siti utilizzati per questo

scopo sono stati i seguenti: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>;
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Da tale confronto è risultato che i generi più rappresentati tra i lieviti della collezione sarebbero, in ordine decrescente: *Rhodotorula* e *Cryptococcus* spp.; *Sporobolomyces* e *Rhodosporidium* spp. e, infine, *Erythrobasidium*. e *Sporidiobolus* spp. mentre appartenenti ad *Aureobasidium* spp. sarebbero presenti in numero minore.

7.3 Saggi di degradazione della patulina

Una seconda parte della ricerca ha riguardato la degradazione della patulina, metabolita secondario prodotto dal fungo patogeno *P. expansum*, da parte dei lieviti rosa della collezione. Questo al fine di individuare nuovi possibili BCA che, come *R. kratochvilovae* LS11, manifestino una forte attitudine alla degradazione della micotossina. Lo *screening* è stato effettuato utilizzando piastre multiwell a 96 pozzetti ed ha permesso di individuare 48 lieviti capaci di crescere in presenza della micotossina (alla concentrazione di 100 µg/ml) ed in grado di degradarla (*Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus* spp. e in misura minore *Aureobasidium* *Sporobolomyces*, ed *Erythrobasidium* spp.).

L'analisi degli estratti colturali mediante TLC ha permesso di rilevare la formazione di prodotti di degradazione della patulina, contemporaneamente alla scomparsa di quest'ultima dal mezzo di coltura. Dalle lastre TLC è stato rilevato che lo spot relativo alla micotossina è andato attenuandosi contemporaneamente alla comparsa di nuovi spot; ciò non si è verificato nel controllo costituito dal substrato colturale con patulina, indicando che la degradazione è avvenuta ad opera dei lieviti. Il

prodotto principale della degradazione è risultato avere $R_f=0.46$ ed in altre sperimentazioni è stato identificato come DPA (Castoria *et al.*, 2011) ma compare anche un altro spot, con $R_f=0.25$ che è stato associato all'ascladiolo (Ianiri *et al.*, 2013). In alcuni casi (isolati L200 e L134) la velocità di degradazione della patulina è stata alta e paragonabile a quella del lievito usato come riferimento (*R. kratochvilovae* LS11) ma se nel caso di L200 è stato rilevato solo lo spot relativo al DPA, nel caso di L134 è comparso, oltre allo spot relativo al DPA, anche quello relativo all'ascladiolo. Tra gli altri isolati quelli più veloci nei processi degradativi sono risultati essere L104, L105, L106, L108, L109, L110, L111, L370 che al terzo giorno di incubazione hanno fatto rilevare la scomparsa della patulina e la comparsa dei nuovi prodotti. Al sesto giorno di incubazione con la micotossina i seguenti isolati hanno quasi concluso la sua degradazione: L127, L129, L209, L268, L269, L214, L215, L350, L352, L357, L358, L359, L360, L361, L363, L366, L372, L373; mentre nel caso dei lieviti L145, L146, L151 lo spot della patulina è già scomparso. Alcuni lieviti invece sono risultati più lenti e nel prelievo corrispondente al 6° giorno di incubazione lo spot della micotossina è risultato ancora presente sebbene abbia iniziato ad attenuarsi (L117, L138, L144, L147, L150, L153, L201, L207, L211, L249, L250, L251, L252, L386, L378, L413, L420).

7.4 Metabolita intermedio derivante dalla degradazione della patulina da parte del lievito *R. kratochvilovae* ceppo LS11

Il secondo prodotto di degradazione della patulina da parte di *R. kratochvilovae* ceppo LS11, il metabolita 'X2', probabilmente un composto intermedio del pathway degradativo, è stato oggetto di studio in parte di

questo lavoro di tesi durante il periodo trascorso presso i laboratori del Dipartimento di Chimica Organica dell'Università di *Cadiz* (Spagna).

Tutti gli esperimenti effettuati, tesi ad intercettare il metabolita 'X2' durante la degradazione della patulina da parte del lievito, hanno fatto rilevare, ai diversi tempi di incubazione, una bassissima quantità del metabolita a seguito dell'estrazione dai filtri utilizzati come supporto per la crescita culturale. Le tecniche cromatografiche utilizzate per le purificazioni degli estratti colturali (purificazione mediante cromatografia su colonna in gel di silice e PLC) non hanno permesso di ottenere il composto puro e in quantità sufficiente per la sua caratterizzazione chimica. Il metabolita 'X2', presente sempre in quantità minoritaria rispetto agli altri componenti dell'estratto colturale, in seguito alle operazioni di estrazione e purificazione è stato rilevato con sempre maggiore difficoltà. Questo ha fatto ipotizzare che si tratti di un composto fortemente instabile e che tenda a convertirsi rapidamente in DPA, infatti lo spettro RMN di una frazione ottenuta dalla purificazione con colonna in gel di silice dell'estratto colturale ha verificato la presenza del solo DPA. Alcuni accorgimenti come l'aggiunta di piccole quantità di acido acetico ed il mantenimento dei campioni a temperature di refrigerazione durante la fase estrattiva hanno portato a spot più evidenti su TLC e probabilmente ad un ritardo nella degradazione del metabolita 'X2'. Il rivelatore che è risultato più efficace per monitorare la presenza del composto incognito è stato l'MBTH che necessita di tempi operativi troppo lunghi in relazione all'instabilità del metabolita 'X2'; purtroppo nessuno degli altri rivelatori testati ha permesso di ottenere gli stessi risultati ottenuti con l'MBTH. Tra gli altri l'acido fosfomolibdico, sebbene in alcuni casi abbia permesso di rilevare il secondo metabolita, non è stato utile nel caso delle basse

concentrazioni eluite durante la purificazione con colonna in gel di silice. La purificazione mediante *preparative thin-layer chromatography* (PLC) ha permesso di ottenere una maggiore quantità di metabolita, tuttavia ancora non puro. Le fasi mobili utilizzate per la purificazione mediante cromatografia su colonna in gel di silice che hanno ottenuto un migliore risultato nella separazione dei componenti dell'estratto colturale sono state toluene:etilacetato:acido formico (T:E:F) 8:1:1 e soprattutto T:E:F 7:2:1; la patulina è stata eluita per prima, seguita dal DPA e da 'X2'. Per ridurre il grado di instabilità, il metabolita 'X2' è stato stabilizzato mediante reazioni di metilazione e acetilazione dell'estratto colturale, separando successivamente le varie frazioni mediante purificazione con colonna in gel di silice. Eventuali studi successivi potranno verificare se tali operazioni possono risultare utili allo scopo. Le analisi di RMN delle frazioni ottenute dalle purificazioni degli estratti colturali non hanno mostrato, purtroppo, una risposta chiara e risolutiva per risalire alla struttura chimica del metabolita incognito. La forte instabilità di quest'ultimo e l'impossibilità di monitorarne la presenza in tempi brevi non hanno permesso di ottenerne una quantità sufficiente e pura per individuarne la struttura chimica.

8. Discussione

Il marciume verde-azzurro, causato da *P. expansum*, si sviluppa su frutti di diverse specie (pesche, albicocche, uva, ciliegie, fragole, prugne) ma assume una particolare importanza per le pomacee in postraccolta. Il fungo *P. expansum* è produttore della micotossina patulina che si accumula nei tessuti infetti e può contaminare succhi e altri prodotti derivati non fermentati. La patulina è stata inclusa *dall'International Agency for*

Research on Cancer (IARC, 1993) tra i composti non classificabili come cancerogeni per l'uomo, per insufficienza di dati certi. L'Unione Europea ha stabilito i limiti massimi della tossina ammissibili in alcuni prodotti alimentari (Regolamento CE 1881/2006) tra cui i succhi di frutta concentrati (50µg/kg) e gli alimenti destinati ai lattanti e ai bambini (10µg/kg) al fine di tutelare la salute dei consumatori e soprattutto dei bambini, più vulnerabili in caso di assunzione della micotossina.

Le strategie adottate per evitare o limitare le infezioni da *P. expansum* e le contaminazioni da patulina in fase postraccolta consistono soprattutto nella prevenzione, attuata con impiego di fungicidi, di basse temperature e di atmosfere controllate e/o modificate. I frutti contaminati, soprattutto quelli con infezioni latenti, possono sfuggire alle procedure di selezione e di decontaminazione ed essere avviati ai processi di trasformazione industriale. A tale riguardo una possibile detossificazione biologica dei prodotti alimentari contaminati dalla patulina può rappresentare una soluzione interessante. Numerosi studi scientifici si occupano delle peculiari caratteristiche che fanno di certi microrganismi dei validi agenti di lotta biologica e/o dei capaci degradatori di sostanze tossiche prodotte da agenti fitopatogeni; Coelho e altri collaboratori (2007, 2008) hanno verificato che *P. ohmeri* 158 è in grado di inibire la crescita di *P. expansum* e di degradare la patulina.

Nelle zone a clima temperato la fillosfera e la carposfera delle piante ospitano una grande varietà di forme microbiche (lieviti, funghi lievitiiformi, batteri e funghi filamentosi). Le dinamiche esistenti in tali ecosistemi sono il risultato dell'interazione tra le condizioni ambientali e le caratteristiche dei microrganismi e delle specie vegetali che li ospitano. Le specie microbiche che vengono isolate dalle superfici di diverse specie

vegetali in un certo ecosistema sono il risultato di una selezione, avvenuta nel tempo, che ha favorito le specie che hanno sviluppato la capacità di sopravvivere in quel determinato habitat (Blackeman e Fokkema, 1982).

Nella regione Molise la microflora epifitica è costituita soprattutto da lieviti bianchi (*Cryptococcus* spp., *Metschnikowia* spp., *S. cerevisiae*, ecc.), da lieviti rosa (*Rhodotorula* spp., *Rhodosporidium* spp., *Sporobolomyces* spp., ecc.), da funghi lievitiforimi (rappresentati principalmente da *A. pullulans*) e da numerosi funghi filamentosi (Lima *et al.*, 2003). Nel laboratorio di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise significativi risultati sono stati ottenuti nella selezione di alcuni BCA e nello studio dei loro meccanismi d'azione (Castoria *et al.*, 1997, 2001, 2003; De Curtis *et al.*, 1996, 2004; Lima *et al.*, 1997a, 1997b, 2006); risultati che hanno anche portato all'ottenimento di un Brevetto Italiano (De Curtis *et al.*, 2012) e alla richiesta di un brevetto internazionale (De Curtis *et al.*, 2013). Fra i BCA selezionati, inoltre, alcuni manifestano la capacità di degradare importanti micotossine quali patulina e ocratossina A (Castoria *et al.*, 2005; De Felice *et al.*, 2008). In particolare, è emerso che il lievito *R. kratochvilovae* isolato LS11 resiste ad alte concentrazioni di patulina e la degrada *in vitro* in due composti di cui uno, il DPA, non risulta tossico verso microrganismi che sono normalmente inibiti dalla patulina (Castoria *et al.* 2005; Wright *et al.*, 2008).

In questo lavoro di ricerca è stata allestita presso i laboratori di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise una collezione di lieviti rosa, utilizzando i microrganismi isolati in un precedente lavoro (De Curtis *et al.*, 2009a, 2009b, 2010) dalla fillosfera e dalla carposfera di 35 specie vegetali in sei diverse zone pedo-climatiche del centro-sud Italia. All'isolamento è seguita, nel lavoro precedente, la loro caratterizzazione

morfologica in base al colore delle colonie, alla morfologia cellulare e ad altre caratteristiche morfologiche delle colonie, secondo la letteratura in materia di tassonomia dei lieviti (Kurtzmann e Fell, 1998; Barnett *et al.* 1990) ottenendo sette morfo-gruppi; i lieviti sono stati sottoposti anche a test di tipo fisiologico (De Curtis *et al.*, 2009a, 2009b, 2010).

L'obiettivo principale di questo lavoro di ricerca è stato quello di ottenere una loro prima probabile identificazione tassonomica e di individuare tra di essi quelli capaci di degradare la micotossina patulina. Infine una parte della ricerca è stata dedicata ad esperimenti volti all'identificazione di un metabolita intermedio del processo degradativo della patulina ad opera del lievito *R. kratochvilovae* LS11.

Per uno *screening* preliminare a scopo tassonomico dei lieviti, è stata utilizzata l'analisi RFLP delle regioni ITS che ha permesso di individuare almeno dieci profili RFLP diversi (Fig. 3). In alcuni casi i risultati non hanno permesso di escludere la presenza di ulteriori gruppi RFLP; per questo si rimanda a future ricerche. A tal riguardo la maggiore biodiversità è stata riscontrata tra gli isolati provenienti da *Ficus carica* con il maggiore numero di gruppi RFLP (Grafico 1). Probabilmente la pianta di fico offre un habitat particolarmente favorevole per i lieviti rosa delle varie specie; questo potrebbe essere spiegato sia per la tipologia di crescita della pianta, che consentirebbe riparo ai microrganismi dalle radiazioni UV in periodi particolarmente caldi, sia per fattori collegati ai parametri fisici, chimici e biochimici caratterizzanti le superfici fogliari del fico (Andrews e Harris, 2000). I lieviti isolati dall'albicocco (*Prunus armeniaca*) appartengono a cinque gruppi RFLP, quindi anche in questo caso pare che si tratti di una specie vegetale con habitat favorevole alla sopravvivenza dei lieviti rosa. Al contrario le piante spontanee tipiche della Macchia Mediterranea

(*Herbaceous plants, Rosmarinus officinalis, Asparagus acutifolia*) sembrerebbero favorire la sopravvivenza solo di alcuni lieviti, appartenenti a due gruppi RFLP, tre nel caso dell'*Asparagus acutifolia*. Nei lieviti isolati dalle specie vegetali *Acacia penninervio, Diospyros kaki, Euphorbia paralias, Lobularia maritima, Salsola kali, Smilax aspera, Spartium junceum* e *Punica granatum* si nota una bassissima biodiversità con un solo gruppo RFLP per ogni specie vegetale (Grafico 1). Per quanto riguarda invece la zona geografica origine degli isolamenti, il più alto grado di biodiversità è stato riscontrato nelle Isole Tremiti (FG), con sei gruppi RFLP; nella località di Castel San Vincenzo (IS), invece, si è osservato solo un gruppo RFLP ma probabilmente ciò è da ascrivere ad un minore numero di isolamenti effettuati in quest'area (Grafici 2, 3). Un'ulteriore considerazione a proposito dei gruppi RFLP riguarda la maggior diffusione del gruppo E nei diversi habitat sia spontanei che antropizzati, rispetto al gruppo H. Probabilmente le specie appartenenti a questo gruppo hanno sviluppato un alto grado di adattamento all'ambiente circostante (Grafico 1, 2).

Ulteriori informazioni sono state ottenute da una prima probabile identificazione tassonomica dei lieviti rosa oggetto di questo lavoro di ricerca. Lo *screening* a scopo tassonomico effettuato rappresenta la tappa preliminare per la successiva identificazione tassonomica certa dei lieviti. Le sequenze del DNA dei lieviti rosa della collezione in argomento sono state confrontate con quelle presenti nelle banche dati mondiali; questo ha fatto rilevare la prevalenza di alcuni generi rispetto ad altri. In particolare i generi *Rhodotorula, Cryptococcus, Sporobolomyces, Rhodosporidium* spp. che in letteratura sono noti per le loro caratteristiche funzionali all'attività antagonista e/o degradativa di metaboliti tossici, risulterebbero

maggiormente rappresentati rispetto agli altri generi *Erythrobasidium*, *Sporidiobolus*, e *Aureobasidium* spp. (Grafico 4).

Nella prospettiva di una detossificazione biologica della patulina, è stato effettuato uno *screening* per individuare tra i lieviti della collezione quelli capaci di degradarla. In letteratura sono riportati vari esempi di degradazione microbica della patulina. In condizioni di anaerobiosi il lievito *S. cerevisiae* la degrada formando i due metaboliti *E* ascladiolo e il suo isomero *Z* ascladiolo (Moss e Long, 2002). L'*E* ascladiolo risulta anche essere il precursore della patulina nella sua biosintesi da *P. expansum* (Moake *et al.*, 2005). In condizioni aerobiche *G. oxydans* la degrada in una miscela di *E* ascladiolo e *Z* ascladiolo in rapporto di 3.5:1; inoltre concentrazioni di 100µg/ml di patulina riducono la crescita di *G. oxydans* ma non influiscono sulla sua capacità di trasformarla in ascladiolo (Ricelli *et al.*, 2007). L'agente di lotta biologica *R. kratochvilovae* LS11 sopravvive in presenza di diverse concentrazioni di patulina (Castoria *et al.*, 2005) riuscendo a degradarla, in aerobiosi, in due composti principali di cui il più stabile, il DPA, ha una tossicità inferiore a quella della micotossina (Scott *et al.*, 1972; Wright *et al.*, 2008; Castoria *et al.*, 2011). Nel saggio di degradazione della patulina, in aerobiosi, i lieviti che si sono rivelati capaci di sopravvivere tollerando la presenza della micotossina, riuscendo contemporaneamente anche a degradarla, appartenerebbero principalmente ai generi *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus* spp. e in misura minore ai generi *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, ed *Erythrobasidium* spp.; in riferimento ai gruppi RFLP, la maggioranza di loro appartiene al gruppo E (Grafici 5, 6, 7). Dall'analisi mediante TLC degli estratti colturali sono stati rilevati alla luce UV (λ 254 nm) diversi spot; oltre a quello della patulina (se non ancora completamente degradata)

avente $R_f = 0.56$ sono comparsi altri due spot, di cui uno con $R_f=0.46$ ed uno con $R_f=0.25$. L'intensità di questi ultimi è aumentata contestualmente alla diminuzione di quella dello spot relativo alla patulina; tali spot non sono stati rilevati nel controllo positivo nel quale non sono stati inoculati lieviti e per il quale è visibile solo lo spot della patulina. I principali prodotti della degradazione della patulina da parte dei lieviti rosa sottoposti allo *screening* hanno mostrato quindi i valori di R_f che in altre sperimentazioni sono stati associati a DPA e ascladiolo (Ianiri *et al.*, 2013; Ricelli *et al.*, 2007). È interessante notare che, tra gli altri, l'isolato L200 si è distinto per la velocità con la quale ha iniziato e terminato la degradazione della patulina, con la produzione finale di DPA (Fig. 4, 5, 6). Isolato da *Ficus carica* a Larino (CB), è stato inserito nel gruppo E (RFLP) e dai dati ottenuti dal confronto delle sequenze apparterebbe al genere *Rhodosporidium* spp.. Anche L134, isolato da *Ficus carica* a Larino (CB), ha iniziato e concluso velocemente la degradazione della micotossina; i prodotti finali su TLC hanno mostrato due spot con $R_f=0.46$ e $R_f= 0.25$ (Fig. 7, 8). Tra gli altri isolati quelli più veloci nei processi degradativi sono risultati essere L104, L105, L106, L108, L109, L110, L111, L370 che al terzo giorno di incubazione hanno fatto rilevare la scomparsa della patulina e la comparsa dei nuovi prodotti. Al sesto giorno di incubazione con la micotossina i seguenti isolati hanno quasi concluso la sua degradazione: L127, L129, L209, L268, L269, L214, L215, L350, L352, L357, L358, L359, L360, L361, L363, L366, L372, L373; mentre nel caso dei lieviti L145, L146, L151 lo spot della patulina è già scomparso (Fig. 9).

Un gruppo di isolati è stato più lento nell'iniziare la degradazione e comprende i lieviti: L117, L138, L144, L147, L150, L153, L201, L207, L211, L249, L250, L251, L252, L386, L378, L413, L420. In questi casi al

sesto giorno di incubazione lo spot della micotossina è risultato ancora presente, nonostante la comparsa dei prodotti di degradazione (Fig. 9). In particolare, dei 48 lieviti capaci di degradare la micotossina, 22 risultano provenire da isolamenti effettuati a Larino (CB) da due specie vegetali (*Ficus carica* e *Malus domestica*). Altri 20 derivano da isolamenti nelle Isole Tremiti; le specie vegetali di origine sono state *Crithmum maritimum*, *Malus domestica*, *Ficus carica*, *Prunus persica*, *Spartium junceum*, *Asparagus acutifolia*, *Punica granatum*, *Smilax aspera*. Da queste due aree geografiche proviene il maggior numero di isolati (Grafici 3, 8, 9, 10). In entrambi i casi il gruppo RFLP prevalente è E. Il fatto che un gran numero di lieviti risultati in grado di degradare la patulina siano stati isolati da specie vegetali coltivate (*Ficus carica* e *Malus domestica*) può far ipotizzare che questa loro caratteristica possa essere il risultato di una pressione selettiva esercitata da funghi patogeni (*P. expansum*) presenti nel microhabitat, condizione che spinge a sviluppare meccanismi di resistenza alla tossina. Infatti da isolamenti effettuati su marciumi di mele è stato possibile ottenere solo batteri risultati capaci di crescere e di degradare la patulina alla concentrazione di 10µg/ml; probabilmente nei marciumi la tossina agisce da fattore selettivo nei confronti dei microrganismi presenti sulla superficie dei frutti (Ricelli *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda l'identificazione del metabolita intermedio (X2) prodotto durante la degradazione aerobica della patulina da parte del lievito *R. kratochvilovae* LS11, sono state effettuate numerose prove di degradazione per isolarlo e, nonostante dagli estratti colturali si evidenziasse la presenza di tale prodotto, la sua concentrazione (minoritaria in rapporto a quelle degli altri componenti) e la sua forte instabilità non hanno permesso di ottenerne una quantità sufficiente e pura per chiarirne la

struttura chimica. Si è constatato durante le prove di purificazione che il composto si trasforma velocemente in DPA, di cui è probabilmente precursore. Le prove effettuate possono fornire indicazioni per future ricerche, necessarie per individuare la struttura chimica di tale metabolita.

9. Conclusioni

Nell'ambito della lotta biologica un'importante fonte di biodiversità per la selezione di nuovi antagonisti è rappresentata dalle popolazioni di microrganismi naturalmente presenti sulle superfici vegetali di piante e frutti. Sebbene i lieviti più noti (come *S. cerevisiae*) rivestano un ruolo importante nelle diverse applicazioni scientifiche, commerciali, mediche, ignorare l'esistenza di migliaia altre specie di lieviti rischia di far perdere le opportunità che una enorme fonte di biodiversità genetica e biotecnologica offre. Molti generi dei cosiddetti 'lieviti non convenzionali' presentano naturalmente caratteristiche molto promettenti come: un'alta tolleranza agli acidi organici, ai composti aromatici e fenolici, la capacità di crescere in presenza di metanolo o di resistere ad una gran varietà di composti tossici. La scoperta di tali peculiarità ha determinato un rinnovato interesse nello studio della fisiologia, del metabolismo e della genetica dei 'lieviti non convenzionali' che potrà permettere di arrivare a nuove utili applicazioni biotecnologiche ed industriali in un prossimo futuro (Buzzini e Vaughan – Martini, 2006).

Questo lavoro di ricerca ha studiato i lieviti rosa collezionati presso il laboratorio di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise ed isolati dalla fillosfera e dalla carposfera di diverse specie vegetali. Una loro prima probabile identificazione tassonomica ha evidenziato la prevalenza

di appartenenti ai generi *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Rhodosporidium* spp. che in letteratura sono noti per possedere capacità funzionali alla lotta biologica. Inoltre quarantotto isolati hanno tollerato la presenza della patulina nel mezzo colturale degradandola in condizioni di aerobiosi; questo li rende particolarmente interessanti per eventuali applicazioni nel campo della detossificazione biologica della patulina. La maggior parte di essi apparterebbe ai generi *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus* spp.. Questo dato conferma la possibilità di isolare dalle superfici vegetali lieviti che hanno sviluppato la capacità di degradare micotossine, probabilmente per una pressione selettiva esercitata nel microhabitat dal fungo fitopatogeno. La comprensione dei meccanismi alla base della degradazione aerobica della patulina da parte dei lieviti rosa potrebbe permettere di sviluppare nuove strategie per prevenire la contaminazione da tale micotossina o per detossificare i prodotti derivati da frutti infetti. La possibilità di una degradazione aerobica eviterebbe inoltre le complicazioni connesse ai costi della rimozione dell'ossigeno necessarie per operare in anaerobiosi. In conclusione, gli studi sull'ecologia dei lieviti e sulla loro distribuzione negli ecosistemi, sulla loro biodiversità e sulla complessità delle interazioni esistenti tra i microrganismi e i diversi fattori ambientali nonché quelli sui meccanismi alla base della loro capacità degradativa nei confronti di metaboliti tossici, rappresentano un'importante risorsa per acquisire nuove conoscenze utili ad orientare le future ricerche nell'ambito della lotta biologica. L'insieme di tali informazioni potrebbe costituire la base per lo sviluppo di nuove tecnologie innovative che, oltre a garantire una produzione migliore in termini di quantità e di qualità, siano più compatibili con l'esigenza di operare nell'ottica della salvaguardia dell'ambiente tutelando la salute del consumatore.

10. Tabelle

Tabella 1. Raggruppamento di isolati di lieviti rosa in base ai profili RFLP (*pattern* ottenuti dalla digestione con enzima di restrizione *Hinf* I delle regioni ITS amplificate).

GRUPPI RFLP	ISOLATI
GRUPPO A	L2, L3, L75, L89, L91, L129, L144, L147, L150, L158, L160, L161, L162A, L162B, L163, L166, L167, L207, L231, L235 e L237;
GRUPPO B	L244, L377, L394, L405 e L413;
GRUPPO C	L226, L239, L241, L242, L375, L387, L422, L427, L384 e L448
GRUPPO D	L393, L382, L383, L389, L395, L398, L399, L425, L431 e 437
GRUPPO E	L4, L94, L104, L105, L106, L107, L109, L110, L111, L127, L139, L143, L145, L148, L151, L154, L155, L156, L168, L172, L175, L178, L183, L201, L209, L210, L215, L257, L268, L345, L350, L351, L353, L357, L359, L361, L362, L363, L366, L370, L371B, L372 e L373
GRUPPO F	L200 e i ceppi di riferimento LS11, PYCC 4818, SJ73, SJ76, SJ77, SJ94, SJ176 e SJ178
GRUPPO G	L206, L384B e L435, e il ceppo di riferimento L-76-2
GRUPPO H	L249
GRUPPO I	L420, L371A e L386A
GRUPPO J	L421
GRUPPO K	LS69
GRUPPO L	LS70

Tabella 2. Lieviti rosa con attività degradativa verso la patulina, con indicazione della specie vegetale, della zona geografica origine dell'isolamento e del gruppo RFLP.

Isolato	specie vegetale	zona geografica	RFLP
L104	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	E
L105	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	E
L106	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	E
L108	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	/
L109	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	E
L110	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	E
L111	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	E
L117	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	/
L127	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	E
L129	<i>Malus domestica</i>	Larino (CB)	A
L134	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	/
L138	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	/
L144	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	A
L145	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	E
L146	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	/
L147	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	A
L150	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	A
L151	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	E
L153	<i>Olea europea</i>	Larino (CB)	/
L200	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	F
L201	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	E
L207	<i>Ficus carica</i>	Larino (CB)	A

Tabella 2. Lieviti rosa con attività degradativa verso la patulina, con indicazione della specie vegetale, della zona geografica origine dell'isolamento e del gruppo RFLP.

Isolato	specie vegetale	zona geografica	RFLP
L209	<i>Prunus persica</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L211	<i>Malus domestica</i>	Isole Tremiti (FG)	/
L214	<i>Ficus carica</i>	Isole Tremiti (FG)	/
L215	<i>Prunus persica</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L249	<i>Prunus armeniaca</i>	Portocannone (CB)	H
L250	<i>Pistacia lentiscus</i>	Campomarino (CB)	/
L251	<i>Pistacia lentiscus</i>	Campomarino (CB)	/
L252	<i>Pistacia lentiscus</i>	Campomarino (CB)	/
L268	<i>Euphorbia paralias</i>	Campomarino (CB)	E
L269	<i>Euphorbia paralias</i>	Campomarino (CB)	/
L350	<i>Crithmum maritimum</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L352	<i>Crithmum maritimum</i>	Isole Tremiti (FG)	/
L357	<i>Crithmum maritimum</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L358	<i>Crithmum maritimum</i>	Isole Tremiti (FG)	/
L359	<i>Crithmum maritimum</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L360	<i>Spartium junceum</i>	Isole Tremiti (FG)	/
L361	<i>Spartium junceum</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L363	<i>Malus domestica</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L366	<i>Malus domestica</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L370	<i>Crithmum maritimum</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L372	<i>Crithmum maritimum</i>	Isole Tremiti (FG)	E
L373	<i>Crithmum maritimum</i>	Isole Tremiti (FG)	E

Tabella 2. Lieviti rosa con attività degradativa verso la patulina, con indicazione della specie vegetale, della zona geografica origine dell'isolamento e del gruppo RFLP.

Isolato	specie vegetale	zona geografica	RFLP
L378	<i>Asparagus acutifolia</i>	Isole Tremiti (FG)	/
L386	<i>Ficus carica</i>	Isole Tremiti (FG)	I
L413	<i>Punica granatum</i>	Isole Tremiti (FG)	B
L420	<i>Smilax aspera</i>	Isole Tremiti (FG)	I

11. Grafici

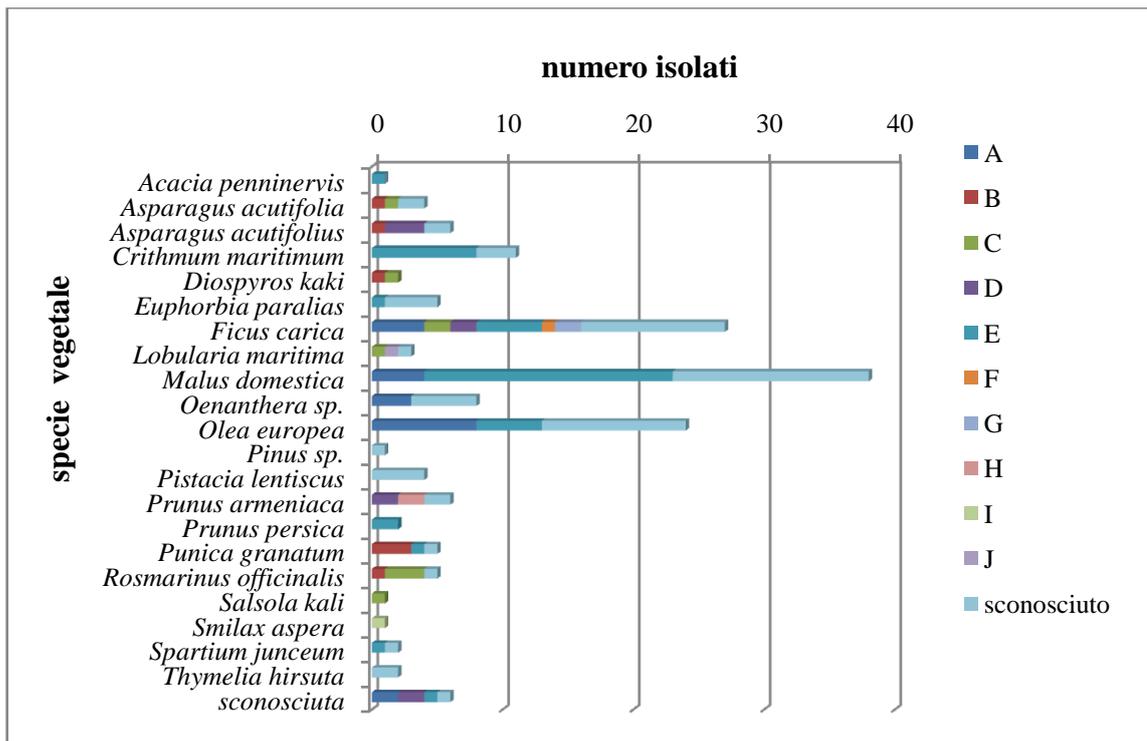


Grafico 1. Distribuzione dei lieviti rosa in funzione della specie vegetale da cui sono stati isolati e del gruppo RFLP di appartenenza.

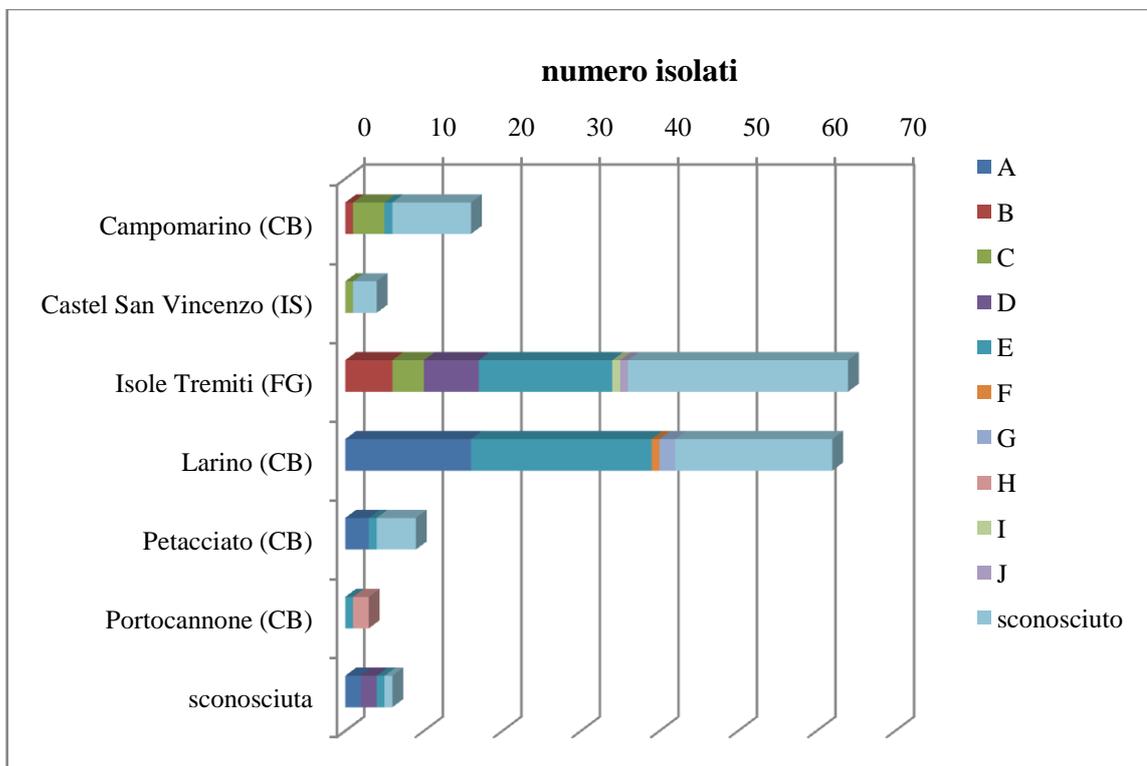


Grafico 2. Distribuzione dei lieviti rosa in funzione della zona geografica dove sono stati isolati e del gruppo RFLP di appartenenza.

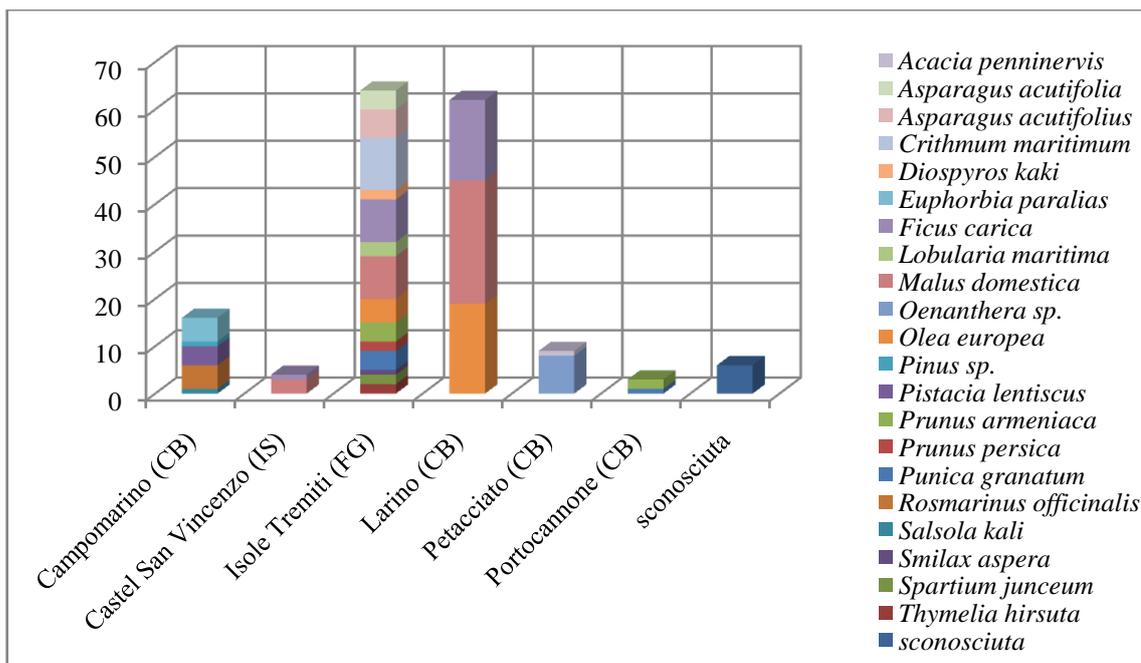


Grafico 3. Numero di isolati dei lieviti rosa in funzione della specie vegetale da cui sono stati isolati e della zona geografica dove sono stati isolati.

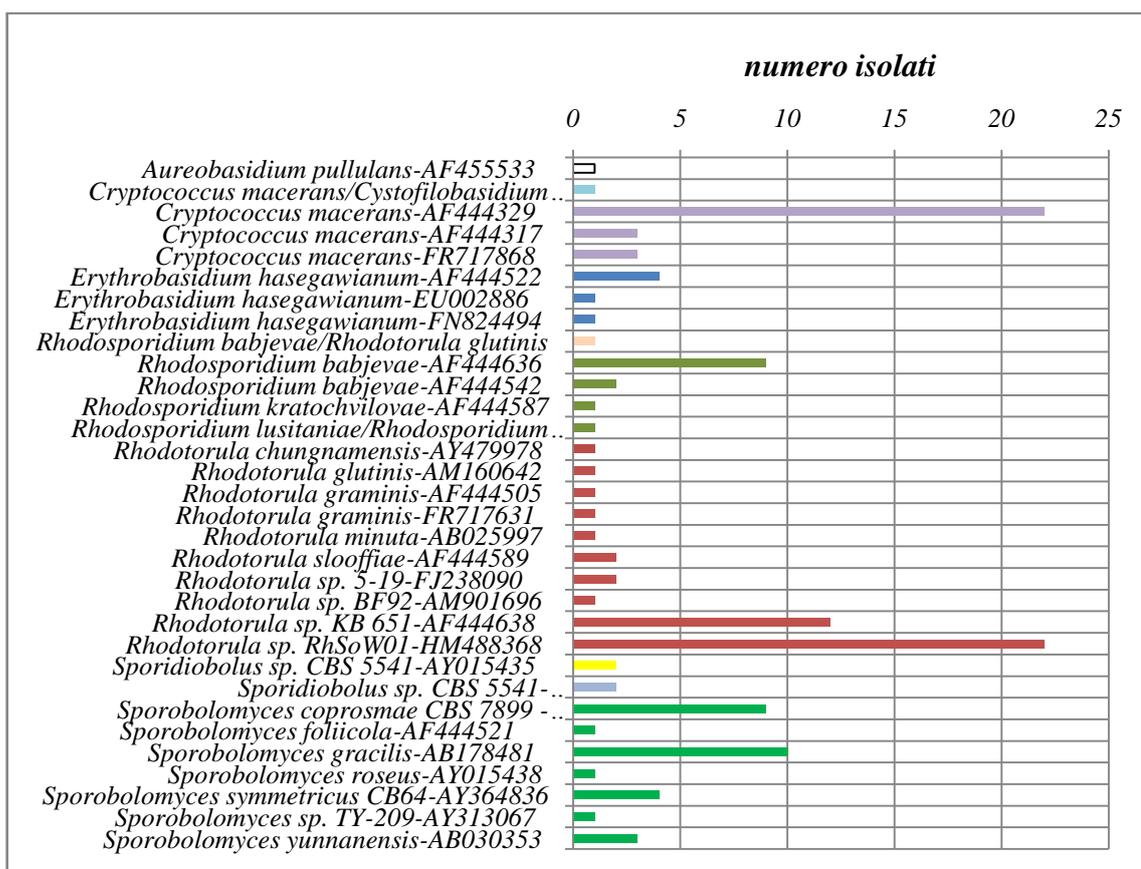


Grafico 4. Distribuzione delle specie di lieviti rosa, ottenute dalla prima probabile identificazione tassonomica.

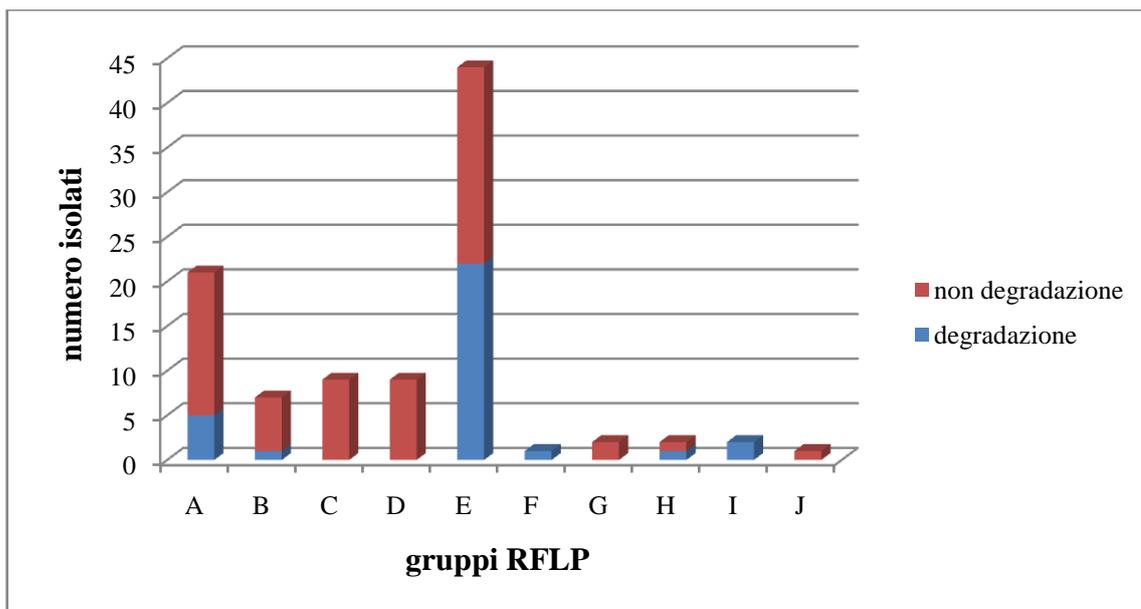


Grafico 5. Distribuzione dei lieviti rosa in funzione della degradazione della patulina e del gruppo RFLP.

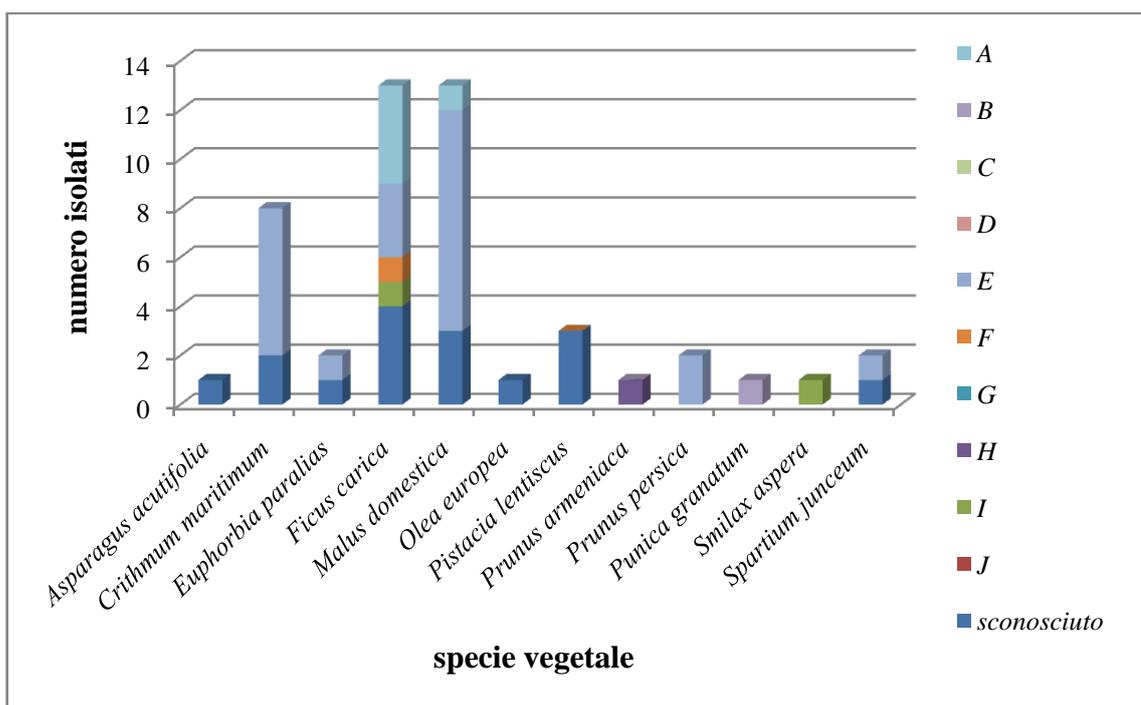


Grafico 6. Distribuzione dei lieviti rosa che degradano la patulina in funzione della specie vegetale da cui sono stati isolati e del gruppo RFLP.

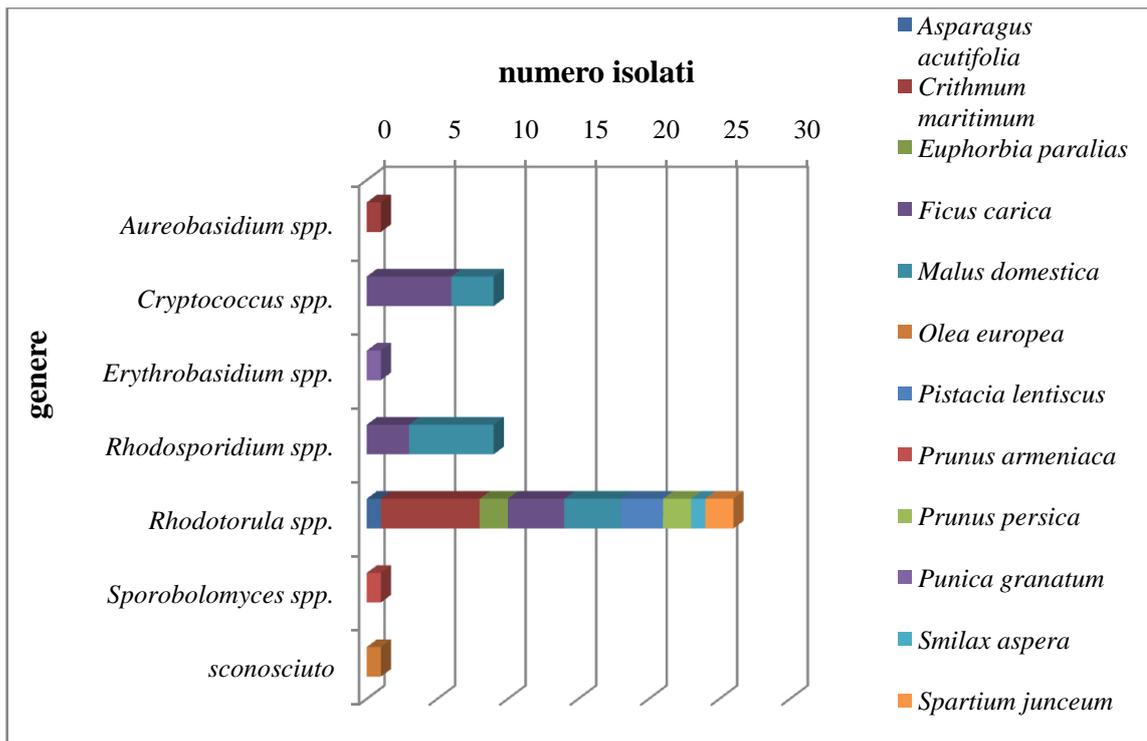


Grafico 7. Distribuzione dei lieviti rosa che degradano la patulina in funzione del probabile genere scientifico di appartenenza e della specie vegetale da cui sono stati isolati.

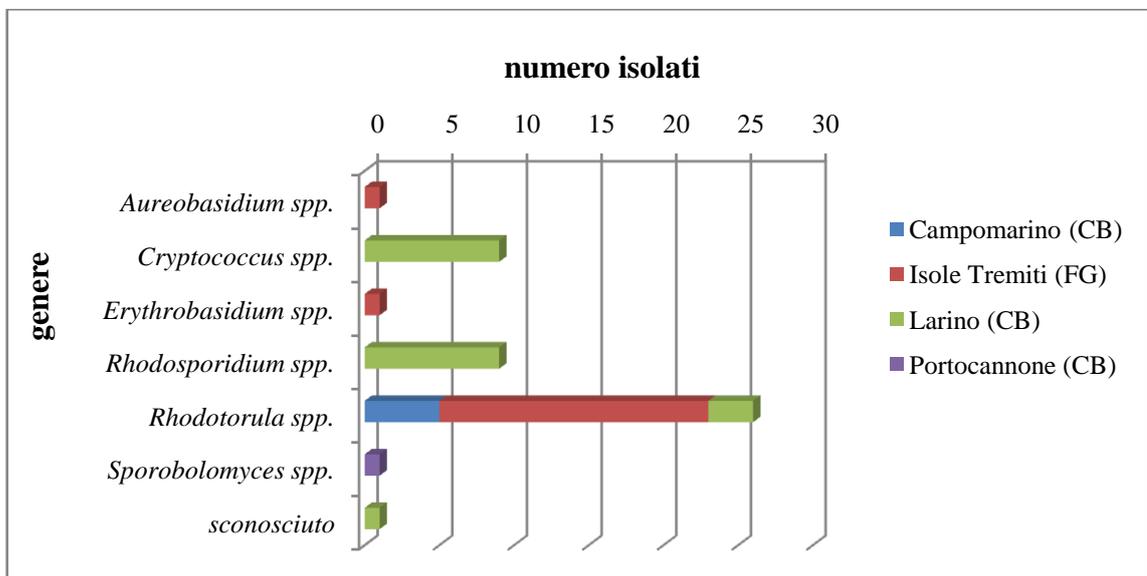


Grafico 8. Distribuzione dei lieviti rosa che degradano la patulina in funzione del probabile genere scientifico di appartenenza e della zona geografica da cui sono stati isolati.

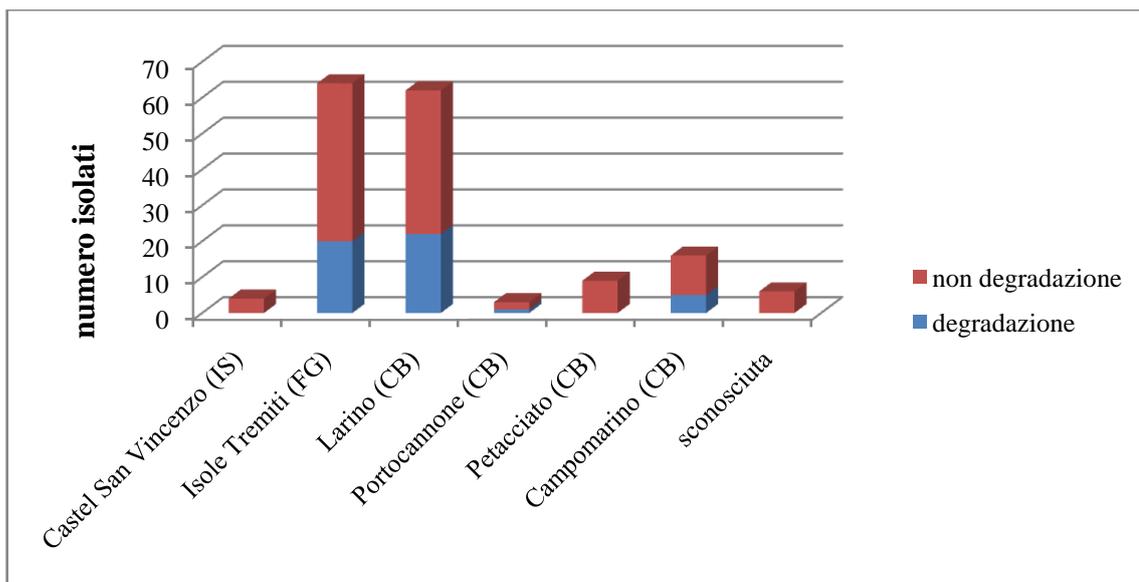


Grafico 9. Distribuzione dei lieviti rosa che degradano e che non degradano la patulina, in funzione della zona geografica da cui sono stati isolati.

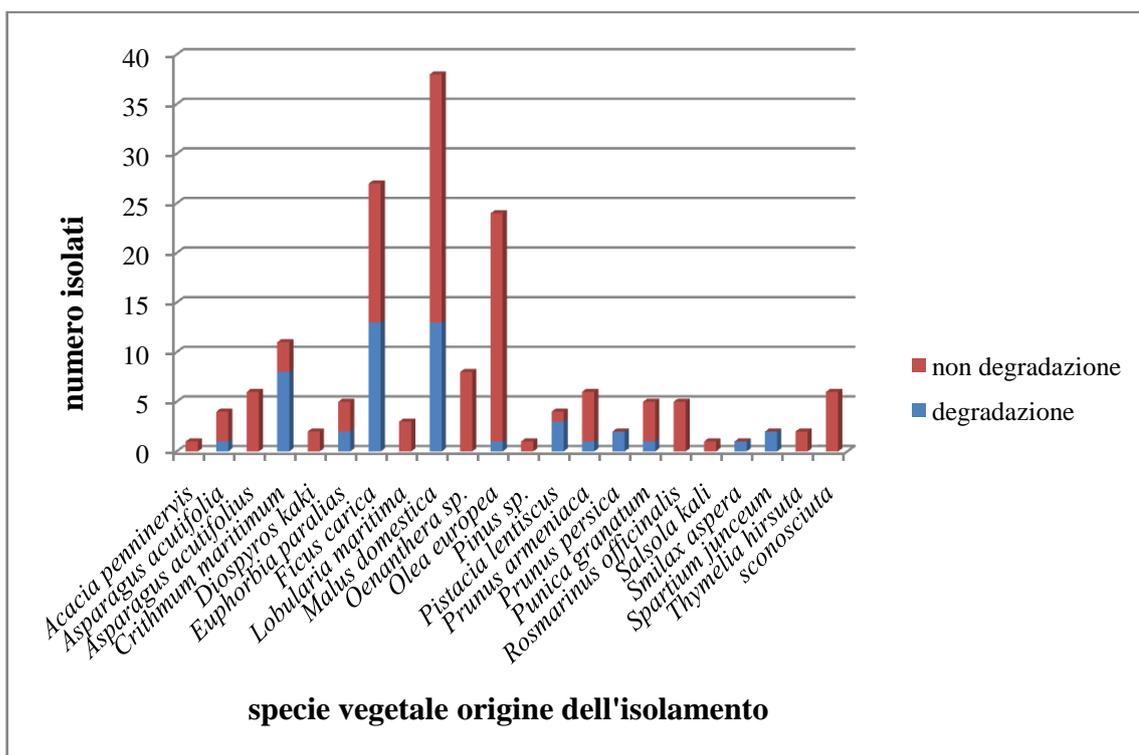


Grafico 10. Distribuzione dei lieviti rosa che degradano e che non degradano la patulina, in funzione della specie vegetale da cui sono stati isolati.

12. Figure

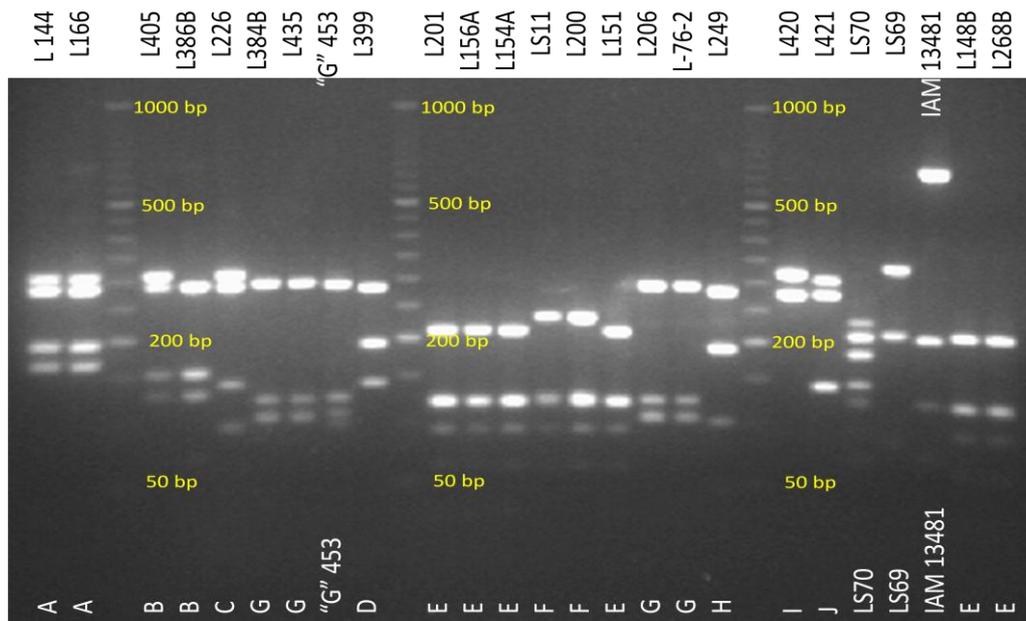


Figura 3. Gel elettroforetico delle regioni ITS di lievito rosa amplificate usando i primer ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990) e successivamente sottoposte a digestione utilizzando l'enzima di restrizione *HinfI*. I profili individuano almeno 10 diversi gruppi RFLP. Il profilo corrispondente all'isolato L453 è molto simile a quelli indicati con 'G' e relativi ad altri ceppi ma contiene due bande, di circa 105 e 115 basi, anziché una banda di 110 come gli altri membri di questo gruppo. I ceppi di riferimento sono: L-76-2, *Sporobolomyces*. spp; LS69, *Rhodotorula mucilaginosa*, LS70, *Rhodotorula minuta* e IAM 13.481, *Sporobolomyces* spp.

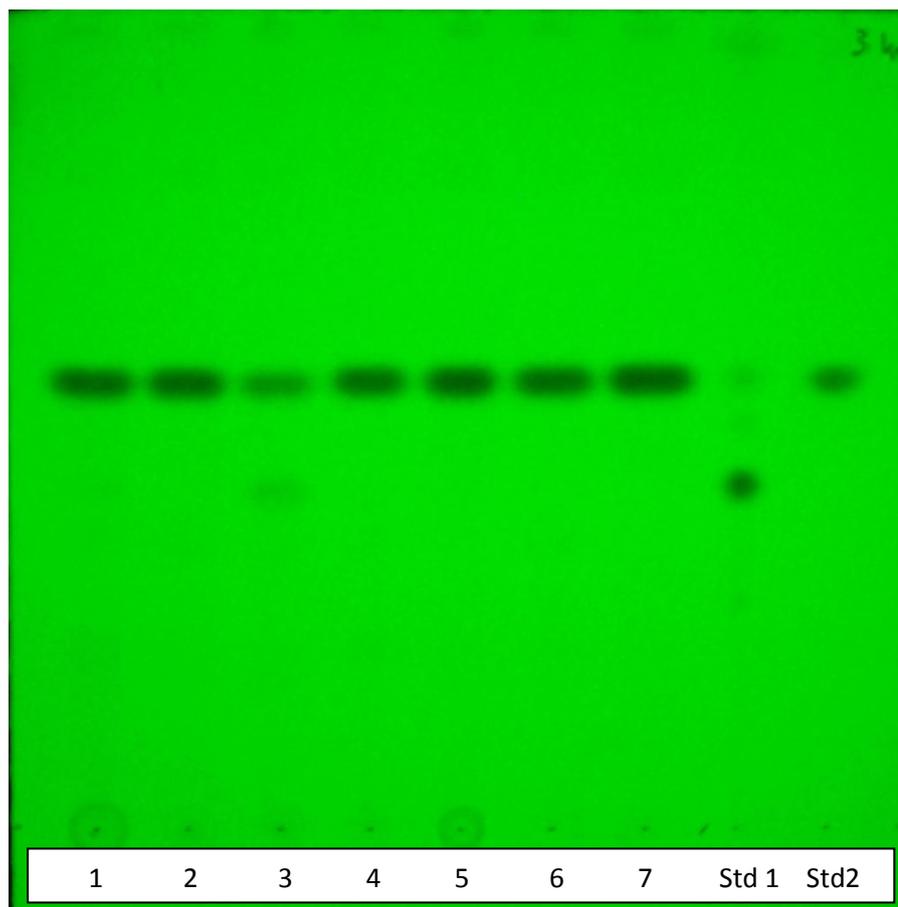


Figura 4. TLC relativa agli estratti colturali del 1° giorno di incubazione del saggio di degradazione della patulina degli isolati: 1. LS11, 2. LS28, 3. L200, 4. L201, 5. L206, 6. L207 in presenza di patulina 100 µg/ml. Il controllo (7) è costituito dal substrato colturale LiBa+patulina 100 µg/ml; lo standard 1 è costituito da DPA, lo standard 2 da patulina.

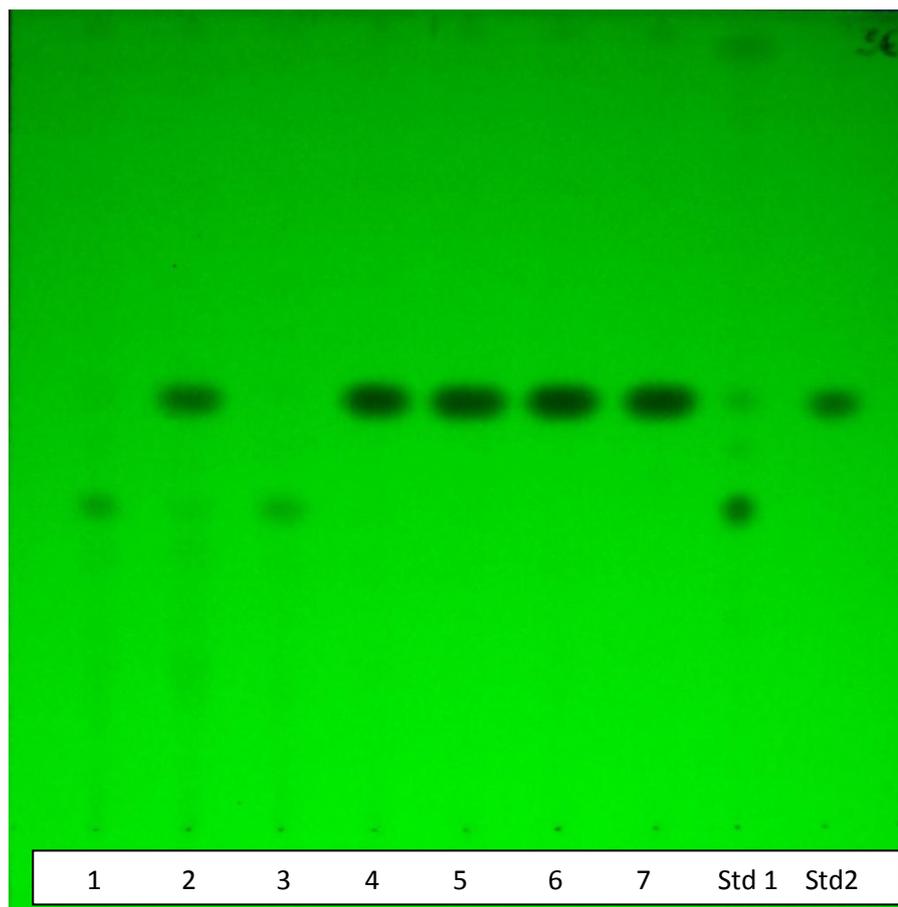


Figura 5. TLC relativa agli estratti colturali del 3° giorno di incubazione del saggio di degradazione della patulina degli isolati : 1. LS11, 2. LS28, 3. L200, 4. L201, 5. L206, 6. L207 in presenza di patulina 100 µg/ml. Il controllo (7) è costituito dal substrato colturale LiBa+patulina 100 µg/ml; lo standard 1 è costituito da DPA, lo standard 2 da patulina.

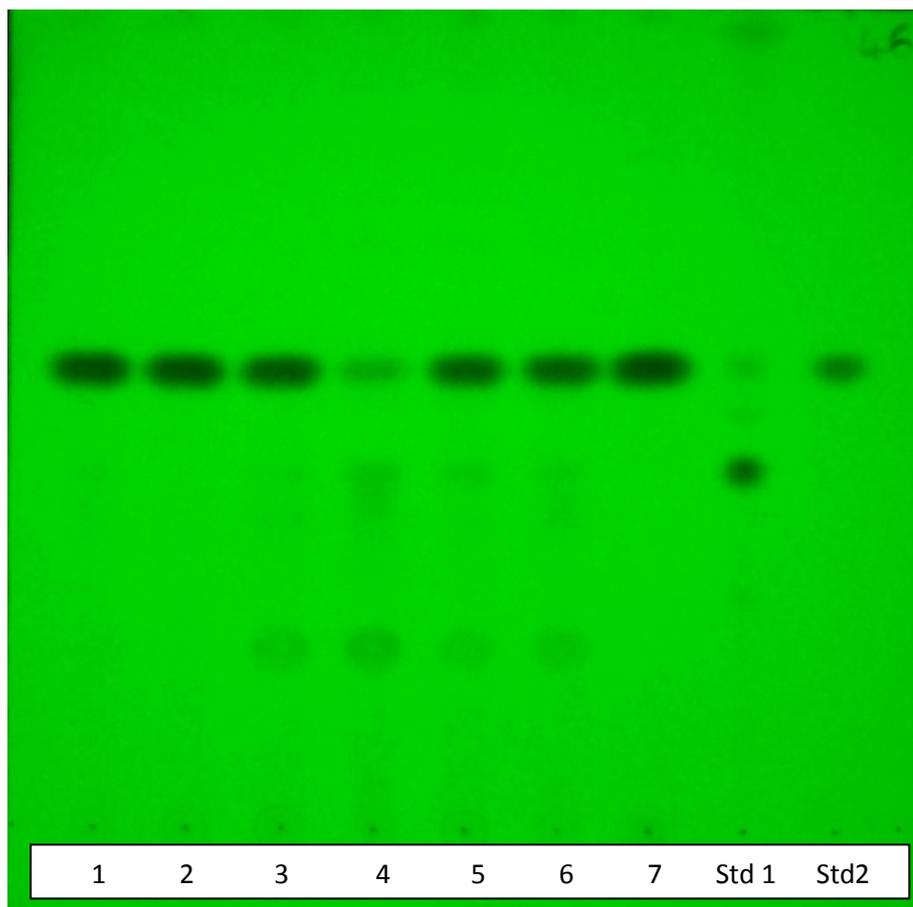


Figura 7. TLC relativa agli estratti culturali del 1° giorno di incubazione del saggio di degradazione della patulina degli isolati: 1. LS11, 2. LS28, 3. L117, 4. L134 , 5. L138, 6. L144 in presenza di patulina 100 µg/ml. Il controllo (7) è costituito dal substrato culturale LiBa+patulina 100 µg/ml; lo standard 1 è costituito da DPA, lo standard 2 da patulina.

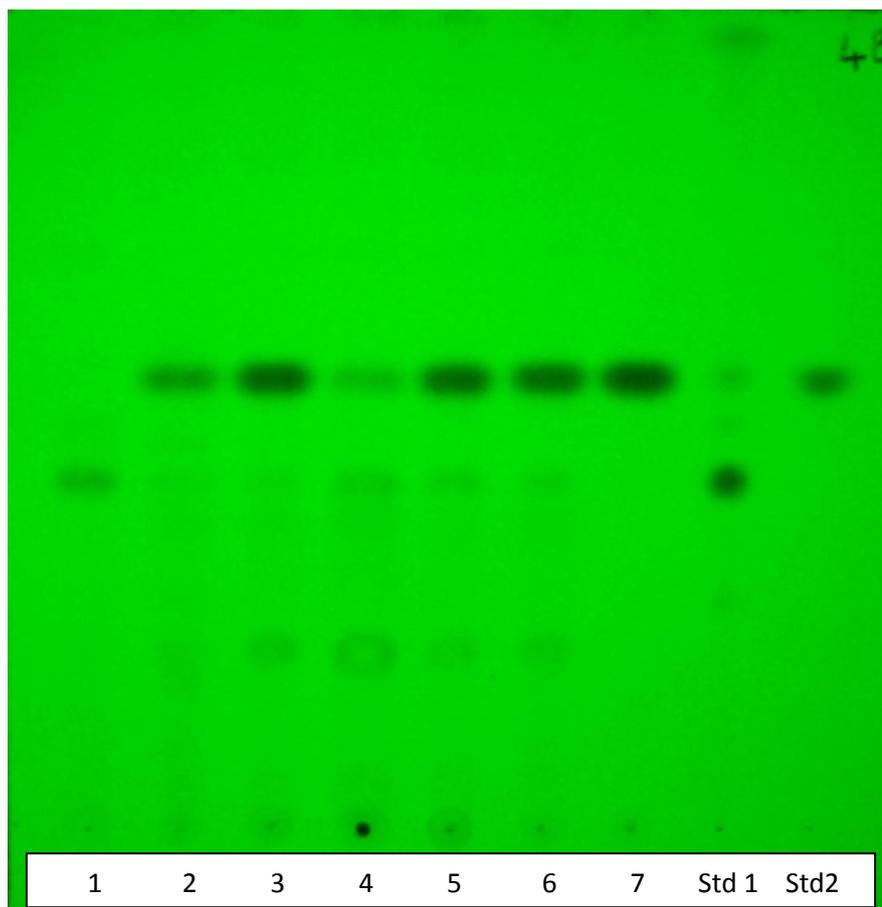


Figura 8. TLC relativa agli estratti colturali del 3° giorno di incubazione del saggio di degradazione della patulina degli isolati: 1. LS11, 2. LS28, 3. L117, 4. L134, 5. L138, 6. L144 in presenza di patulina 100 µg/ml. Il controllo (7) è costituito dal substrato colturale LiBa+patulina 100 µg/ml; lo standard 1 è costituito da DPA, lo standard 2 da patulina.

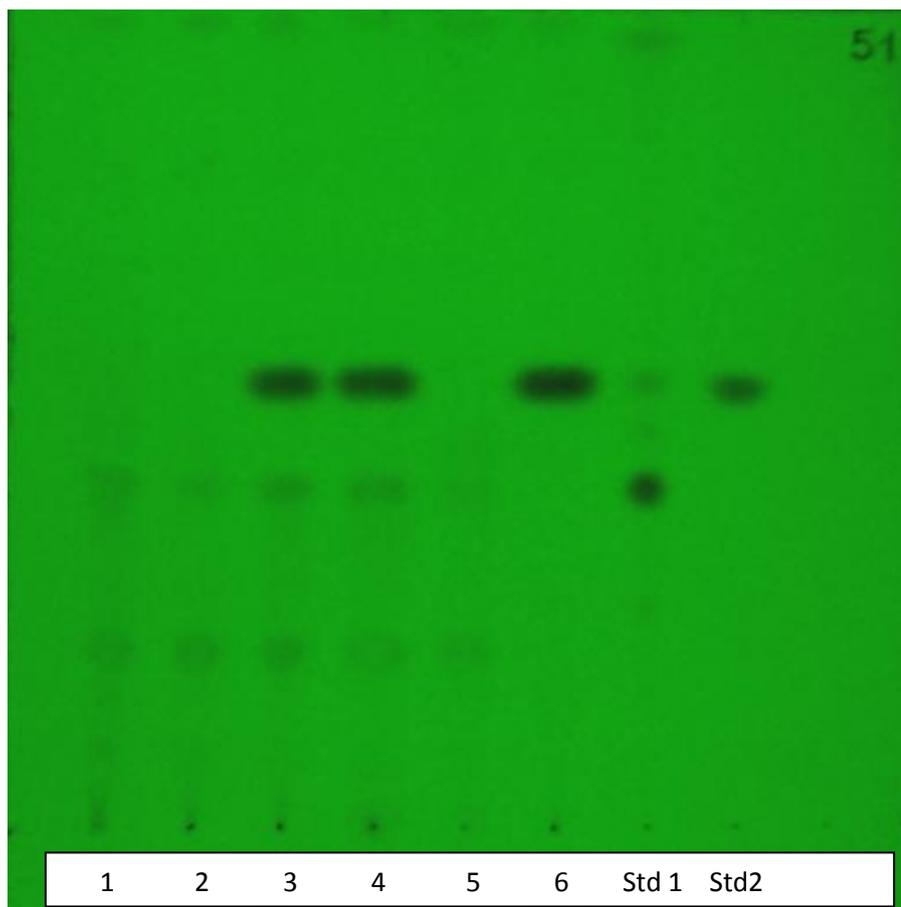


Figura 9. TLC relativa agli estratti colturali del 6° giorno di incubazione del saggio di degradazione della patulina degli isolati: 1. L145, 2. L146, 3. L147, 4. L150, 5. L151, in presenza di patulina 100 µg/ml. Il controllo (6) è costituito dal substrato colturale LiBa+patulina 100 µg/ml; lo standard 1 è costituito da DPA, lo standard 2 da patulina.

13. Bibliografia

- Adikaram N. K. B., Joyce D. C. and Terry L.A., 2002. Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. *Australasian Plant Pathology* 31: 223-229.
- Aleksieva Z., Ivanova D, Godjevargova T., Atanasov B., 2002. Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochem* 37(11): 1215-1219.
- Alvisi F., 1987. Incidenza degli scarti dopo la raccolta nel settore ortofrutticolo: considerazioni generali. Strategie nella difesa postraccolta dei prodotti ortofrutticoli freschi; Mac Fruit, Cesena (FO), Italy, pp. 5-14.
- Andrews J. H. and Harris R.F., 2000. The Ecology and Biogeography of Microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 38: 145-180.
- Anonymous ,1992. Convention on biological diversity, United Nations. Adopted in 1992 at the Rio de Janeiro Earth Summit. <http://www.biodiv.org/convention/articles.asp>
- Atkinson N. and Stanley N., 1943. Antibacterial substances produced by molds. IV, The detection and occurrence of suppressors of penicidin activity. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 21: 249.
- Avantaggiato G., De Girolamo A., Fanelli C. e Ricelli A., 2002. Funghi tossigeni e micotossine: Metodi di decontaminazione delle derrate. Speciale Micotossine. Estratto da *Informatore Fitopatologico*. Anno LII- n- 12/12.
- Avila-Adame C., Koller W., 2003. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Curr. Genet.* 42: 332–338 DOI 10.1007/s00294-002-0356-1
- Barnett J. A., Payne R. W. & Yarrow D., 1990. Yeasts: Characteristics and identification 2nd ed, Cambridge University Press, Avon, Great Britain.
- Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D., 2000.– YEAST characteristics and identification, third edition – Cambridge University Press: 598-617.

- Bata Á. and Lásztity R., 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganism. *Trends in Food Science & Technology* 10: 223-228.
- Battilani P., Barbano C. and Antonio Logrieco A., 2008. Risk Assessment and Safety Evaluation of Mycotoxins in Fruits. In: Barkai-Golan R. and Paster N., (2008) Mycotoxins in fruits and vegetables, cap. 1.
- Becci P. J.; Hess F. G.; Johnson W. D.; Gallo M. A.; Babish J. G.; Dailey R. E.; Parent R. A, 1981. Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. *J. Appl. Toxicol.*, 1: 256–261.
- Bennett J.W. and Klich M., 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497-516.
- Beretta B., Gaiaschi A., Galli C. L. e Restani P., 2000. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 17 (5): 399-406.
- Bertolini P. e Nigro F., 2009. In De Cicco V., Bertolini P., Salerno M.G., 2009. Patologia postraccolta dei prodotti vegetali. Piccin, cap. 6.
- Betina V., 1984. Biological effects of mycotoxins. In: Betina V (Ed.), Mycotoxins production, Isolation, Separation and Purification. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 25-26.
- Birkinshaw J.H., Michael S.E., Bracken A., Raistrick H., 1943. Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier. II *Biochemistry and chemistry*. *Lancet* 242 (6273): 245-625.
- Björnberg A. and Schnürer J., 1993. Inhibition of the growth of grain-storage molds in vitro by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman. *Canadian Journal of Microbiology* 39: 623-628.
- Blackeman K. J. F., Fokkema N.J., 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 20:167-192.
- Bottalico A., 2000. Prevenzione e prospettive di lotta e di controllo, cap. 9. In: Muffe alimenti e micotossicosi. Ivan Dragoni, Città Studi Edizioni.
- Bottalico A., 2002. Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali. Speciale micotossine. Estratto da *Informatore Fitopatologico*. Anno LII – n. 12 Dicembre.
- Bottalico A., 2004. Micotossine. In: Cabras P., Martelli A., Chimica degli alimenti. Piccin.

- Bourdiol D. and L. Escoula, 1990. Effect of Patulin on microbicidal activity of mouse peritoneal macrophages. *Food Chem. Toxicol.*, 28: 29-33.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J., 1990. *Microbiologia Alimentare. Tecniche Nuove.*
- Buck J. W. and Burpee L. L., 2002. The effects of fungicides on the phylloplane yeast populations of creeping bentgrass. *Canadian Journal of Microbiology* 48(6): 522–529 DOI: 10.1139/w02-050.
- Buzzini P. and Vaughan - Martini A., 2006. Yeast biodiversity and biotechnology. In: Rosa C.A. and Péter G. (2006) Biodiversity and ecophysiology of yeasts; Ed. Springer. Cap 22.
- Calvo J., Calvente V., De Orellano M. E., Benuzzi D., De Tosetti M. I. S., 2003. Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. *BioControl* 48: 579–593, 2003.
- Castoria R., 2009. In: De Cicco V., Bertolini P., Salerno M.G., 2009. Patologia postraccolta dei prodotti vegetali. Piccin, cap. 9.
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., and De Cicco, V., 1997. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biol. Technol.*, 12: 293–300.
- Castoria R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S. and De Cicco V., 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest. Biol. Technol.*, 22: 7–17.
- Castoria R., Caputo L., De Curtis F., and De Cicco V., 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: A possible new mechanism of action. *Phytopathology*, 93: 564–572.
- Castoria R., Morena V., Caputo L., De Curtis F., Panfili G. and De Cicco V., 2005. Effect of the Biocontrol Yeast *Rhodotorula glutinis* Strain LS11 on Patulin Accumulation in Stored Apples. *Phytopathology*, 95: 1271-1278.
- Castoria R., Wright S. A. I., Droby S. , 2008. Biological control of mycotoxigenic fungi in fruits. Ch. 16, In R. Barkai-Golan and N. Paster (eds), *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Elsevier, San Diego.

- Castoria R., Mannina L., Durán Patrón R., Wright S. A. I., Maffei F., Sobolev A. P., de Felice D. V., Pinedo-Rivilla C., Ritieni A., Ferracane R., 2011. The biocontrol yeast *R. kratochvilovae* strain LS11 converts the mycotoxin patulin to less toxic desoxypatulinic acid. *J Agric. Food Chem.* 59: 11571–11578
dx.doi.org/10.1021/jf203098v
- Chain E., Florey H.W. and Jennings M.A., 1942. An antibacterial substance produced by *Penicillium claviforme*. *Br. J. Exp. Pathol.* 23:202.
- Chalutz E. and Wilson C.L., 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Dis* 74: 134-137.
- Chand-Goyal T. and Spotts R.A., 1996. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest. Biol. Technol.* 7: 51–64.
- Ciegler A., Beckwith A. C., Jackson L. K., 1976. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl Environ Microbiol*, 31: 664–667.
- Ciegler A., Vesonder R.F. and Jackson L.K., 1977. Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1004.
- Cleveland T. E., Dowd P.F., Desjardins A.E., Bhatnagar D., Cotty P.J., 2003. United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Management Science* 59: 629-642.
- Codex Alimentarius Commission, 2003. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Patulin Contamination in Apple Juice and Apple Juice Ingredients in other Beverages. CA/RCP-2003. *Food and Agriculture Organization*, Rome. Italy.
- Coelho A. R., Celli M. G., Sataque Ono E. Y., Hoffmann F. L., Pagnocca F. C., Garcia S., Sabino M., Harada K.-I., Wosiacki G. and Hirooka E. Y., 2008. Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Mycotoxin Journal*, August 2008; 1(3): 325-331.

- Coelho A. R., Celli M. G., Sataque Ono E. Y., Wosiacki G., Hoffmann F. L., Pagnocca F. C., Hirooka E. Y., 2007. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation in vitro. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50 (4): 725-733.
- Cole R. J. and Cox R. H., 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites, Eds. Academic Press pp. 511.
- Cook R. J., Baker K. F., 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, MN: *American Phytopathological Society* pp. 539.
- Coursey D.G., Booth R.H., 1972. The postharvest phytopathology of perishable tropical produce. *Review of Plant Pathology*, 51: 751-765.
- Cubeta M.A. e Echandi E., 1991. Biological control of *Rhizoctonia* and *Pythium* clamping-off of cucumber: An integrated approach. *Biological Control* 1: 227-36.
- Dauben H.J. and Weisenborn F.L., 1949. The structure of patulin. *J. Am. Chem. Soc.* 71: 3853
- De Cal A., Pascual S. e Melgarejo P., 1994. In vitro studies of the effects of fungicides on beneficial fungi of peach twig mycoflora. *Mycopathologia* 126: 15-20 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Deak T., 2006. Environmental factors influencing yeasts. In: Rosa C.A. and Péter G. (2006) Biodiversity and ecophysiology of yeasts; Ed. Springer. Cap. 8.
- De Curtis F., 1998. I lieviti nella lotta biologica contro patogeni fungini degli ortofrutticoli in postraccolta, attività e meccanismi d'azione coinvolti. Ph.D. Thesis, International libraries of Florence and Rome.
- De Curtis F., Caputo L., Castoria R., Lima G. and De Cicco V., 2004. Use of Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (fAFLP) for Molecular Characterization of the Biocontrol Agent *Aureobasidium pullulans* strain LS30. *Postharvest Biol. Technol.*, 34: 179-186.
- De Curtis F., Castoria R., Lima G. and De Cicco V., 2012. Nuovi ceppi di lievito e loro uso per il controllo di funghi fitopatogeni – N. ITMI20111292 del 12/01/2013.

- De Curtis F., Castoria R., Lima G., De Cicco V., 2013. New yeast strains and use thereof for the control of phytopathogenic fungi – N. WO2013008173 del 17/01/2013.
- De Curtis F., Castoria R., Palmgren L., Ianiri G., Wright S.A.I., 2009a. The origin of plant-associated pink yeasts influences their biodiversity, biocontrol efficacy and ability to degrade patulin. *J. Plant Pathol*, 91(4, Supplement), S4.58.
- De Curtis F., Palmgren L., Castoria R., De Cicco V. and Wright S.A.I., 2009b. Plant-Associated Pink Yeasts: Isolation, characterization and *screening* for biocontrol ability. FEMS 2009, 3rd Congress of European Microbiologist: Microbes and Man-interdependence and future challenges. Goteborg, Sweden – July, 2, 2009.
- De Curtis F., Quici R., Ianiri G., Palmgren L., De Cicco V., Castoria R., Wright S.A.I., 2010. The influence of yeast origin and identity on modes of biodegradation of patulin by basidiomycetous pink yeasts. *J. Plant Pathol*, S4.81.
- De Curtis F., Torriani S., Rossi F. and De Cicco V., 1996. Selection and use of *Metschnikowia pulcherrima* as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 46: 45-55.
- de Felice D. V., Solfrizzo M., De Curtis F., Visconti A. and Castoria R., 2008. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology*, doi:10.1094/PHYTO-98-12-1261.
- Dickens F. and Jones H.E.H., 1961. Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *Brit J Cancer*, 15: 85–100.
- Dombrink-Kurtzman M.A. and Blackburn J.A., 2005. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 98: 241-248.
- De Souza Sant’Ana A., Rosenthal A., de Massaguer P.R., 2008. The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food research International* 41: 441-453.
- Dragoni I. e Cantoni C., 1987. *Muffe e Alimenti*. Milano Clesav ed.
- Dragoni I., Cantoni C., Papa A. e Vallone L., 1997. Alimenti, micotossine e micotossicosi. In: *Muffe, alimenti e micotossicosi*. Ivan Dragoni, Città Studi Edizioni, cap. 10.

- Droby S., Chalutz E., Wilson C. L., Wisniewski M. E., 1992. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica*, 20: 1495–1503.
- Droby S., Wisniewski M., El Ghaouth A., Wilson C., 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product *Aspire*. *Postharvest Biology and Technology* 27: 127-135.
- Droby S., 2006. Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Horticulturae* 709: 45–51.
- Elad Y., Köhl J., Fokkema N.J., 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology* 84(10): 1193-1200.
- Elad Y. and Zimand G., 1991. Experience in integrated chemical biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*). *IOBC/WPRS Bulletin*. Integrated control in protected crops under mediterranean climate 195-99.
- El-Ghaouth A., Wilson C. L., Wisniewski M. E., 2004. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: Naqvi, S.A.M.H. (Ed.), Diseases of Fruit and Vegetables, vol. 2. *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands, pp. 511–535.
- Errampalli D., Brubacher N.R., 2006a. Biological and integrated control of postharvest blue mold (*Penicillium expansum*) of apples by *Pseudomonas syringae* and cyprodinil. *Biological Control* 36: 49–56.
- Errampalli D., Brubacher N.R., DeEll J.R., 2006b. Sensitivity of *Penicillium expansum* to diphenylamine and thiabendazole and postharvest control of blue mold with fludioxonil in ‘McIntosh’ apples. *Postharvest Biology and Technology* 39: 101–107.
- Errampalli D., Northover J., Skog L., Brubacher N.R. and Collucci C.A., 2005. Control of blue mold (*Penicillium expansum*) by fludioxonil in apples (cv Empire) under controlled atmosphere and cold storage conditions. *Pest Management Science* 61:591–596. DOI: 10.1002/ps.1010.
- FAO, 1997. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. *FAO Paper* n. 64. FAO Food and Nutrition, Roma, pp. 43.

- FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation of United Nations/World Health Organisation), 2002. Proposed draft code of practice for the prevention of Patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. In : Summary Meeting reports, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 34th session Rotterdam, The Netherlands, 11-15 March.
- Ferrer E., Juan-García A., Font G., Ruiz M. J., 2009. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicol In Vitro*, 23(8): 1504-1509.
- Filinow A.B., Vishniac H.S., Anderson J.A., Janisiewicz W.J., 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol Control* 7: 212-220.
- Fink-Gremmels J., 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *The Veterinary Quarterly* 21(4): 115-20.
- Fliege R. and Metzler M., 2000. Electrophilic Properties of Patulin. Adduct Structures and Reaction Pathways with 4-Bromothiophenol and Other Model Nucleophiles. *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 363-372.
- Florjanowicz T. , 2001. Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *European Food Research and Technology*, 212: 282-286.
- Fonseca A., Scorzetti G., Fell J.W., 2000. Diversity in the yeasts *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Can J. Microbiol* 46: 7-27.
- Gibson G., 2002. Microarrays in ecology and evolution: a preview. *Mol. Ecol* 11: 17-24.
- Giuffrida P., 2012. Micotossine, Università degli Studi di Catania; WWW.UNICT.IT/dfsc/micotossine.htm
- Goidànich G., 1975. Manuale di Patologia Vegetale, volume primo. Edizioni Agricole Bologna.
- Grant P.G., Philips T.D., 1998. Isothermal adsorption of aflatoxin B1 on HSCAS clay. *J. Agric. Food Chem.* 46: 599-605.
- Gullino M. L., 1994. Lotta biologica a funghi agenti di marciumi della frutta in postraccolta. *Informatore fitopatologico*, 9: 5-13.

- Gullino M. L. and Kuijpers L. A. M., 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32: 559-579.
- Harwing J., Scott P.M., Kennedy B.P.C. e Chen Y.K., 1973. Disappearance of Patulin from apple juice fermented by *Saccharomyces* spp. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 6: 45.
- Heatley N.G. and Philpot F.J., 1947. The routine examination for antibiotics produced by molds. *J. Gen. Microbiol.* 1:232.
- Hooper I.R., Anderson H.W., Skell P. and Carter H.E., 1944. The identity of clavacin with patulin. *Science* 99:16.
- Hoffman and Winston, 1987. Genomic and plasmid DNA isolation from yeast (glass beads method). *Gene* 57: 267-272.
- Horváth E., Papp G., Belágyi J., Gazdag Z., Vágvölgyi C and Pesti M., 2010. *In vivo* direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Food and chemical toxicology*, 48(7): 1898-904.
- Hussein H.S. and Brasel J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.
- Ianiri G., Idnurm A., Wright S.A.I., Durán Patrón R., Mannina L., Ferracane R., Ritieni A. and Castoria R., 2013. Searching for Genes Responsible for Patulin Degradation in a Biocontrol Yeast Provides Insight into the Basis for Resistance to This Mycotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(9): 3101-3115.
- IARC, 1986. Patulin. In Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 40: 83-98.
- IARC, 1993. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Vol. 56. Some naturally occurring substances food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer. Lione, pp 397-444, 445-466, 467-488.
- Ippolito A. and Nigro F., 2000. Impact of postharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection*, 19: 715-723.
- Janisiewicz W. J. and Bors B., 1995. Development of a Microbial Community of Bacterial and Yeast Antagonists To Control Wound-

- Invading Postharvest Pathogens of Fruits . *Applied and environmental microbiology*, Vol. 61(9): 3261–3267.
- Janisiewicz W. J. and Korsten L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40: 411–41.
- Jard G., Liboz T., Mathieu F., Guyonvarc'h A., and Lebrihi A., 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants: Part A* Vol. 28(11): 1590-1609.
- Kabak B., Dobson A. D. W., and Var I., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 46 (8): 593-619.
- Karlovsky P., 1999. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, Vol. 7(1): 1-23.
- Karow E.O. and Foster J.W., 1944. An antibiotic substance from species of *Gymnoascus* and *Penicillium*. *Science* 99:265.
- Katzman P.A., Hays E.E., Cain C.K., Van Wyk J.J., Reithel F.J., Thayer S.A., Doisy E.A., Wade N.J., Gaby W.L., Carroll C.J., Muir R.D. and Jones L.R., 1944. Clavacin, an antibiotic substance from *Aspergillus clavatus*. *J. boil. Chem.* 154:475.
- Keblys M., Bernhoft A., Höfer C.C., Ellen Morrison E., Larsen H. J. S e Flåøyen A., 2004. The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on *in vitro* proliferation of porcine lymphocytes. *Mycopathologia*, 158: 317–324.
- Korsten L., 2006. Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*. 1(1), 48–61.
- Kurtzman C.P. and Fell J. W., 1998. The yeasts: a taxonomy study 4th ed., Elsevier Science, Netherlands.
- Kurtzman C.P. and Fell J. W., 2006. Yeasts systematic and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa C.A. and Péter G. (2006) Biodiversity and ecophysiology of yeasts; Ed. Springer. Cap 2.

- Lachance M.A., 2006. Yeast Biodiversity: how many and how much? In: Rosa C.A. and Péter G. (2006) Biodiversity and ecophysiology of yeasts; Ed. Springer. Cap. 1.
- Lilly V. G. and Barnett H. L. 1951. Physiology of the Fungi. McGraw-Hill, New York.
- Lima G., Arru S., De Curtis F., Arras G., 1999. Influence of antagonist, host fruit, and pathogen on the control of postharvest fungal diseases by yeasts. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 23: 223–229.
- Lima G. e De Cicco V., 2009. In: De Cicco V., Bertolini P., Salerno M.G., 2009. Patologia postraccolta dei prodotti vegetali. Piccin, cap. 5-6.
- Lima G., De Curtis F., Castoria R. and De Cicco V., 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technologies*, 8: 257-267.
- Lima G., De Curtis F., Castoria R. and De Cicco V., 2003. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 341–349.
- Lima G., De Curtis F. e De Cicco V., 2008. Interaction of microbial biocontrol agents and fungicides in the control of postharvest diseases. *Stewart Postharvest Review* 2008, 1:4; doi: 10.2212/spr.2008.1.4
- Lima G., De Curtis F., Piedimonte D., Spina A.M., De Cicco V., 2006. Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 40: 301–307.
- Lima G., Castoria R., De Curtis F., Raiola A., Ritieni A., De Cicco V., 2011. Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. *Postharvest Biology and Technology* 60 (2011) 164–172.
- Lima G., Ippolito A., Nigro F. e Salerno M., 1997a. Lotta biologica contro la muffa grigia dell’uva da tavola in conservazione mediante trattamenti pre-raccolta con *Aureobasidium pullulans* e *Candida oleophila*. *Difesa Piante*, 20 (1-2): 21-28.

- Lima G., Ippolito A., Nigro F. e Salerno M., 1997b. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*, 10: 169-178.
- Lima G., Spina A., Castoria R., De Curtis F., De Cicco V., 2005. Integration of Biocontrol Agents and Food-Grade Additives for Enhancing Protection of Stored Apples from *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*, 10: 2012-2241.
- Liu B. H., F. Y. Yu, T. S. Wu, S. Y. Li, M. C. Su, M. C. Wang, e S. M. Shih, 2003. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol Appl Pharm.*, 191: 255-63.
- Lodder J., 1970. The yeasts, a taxonomic study, 2nd edn. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Logrieco A., Solfrizzo M. e Castoria R., 2002. Funghi tossigeni e micotossine: filiera orto-frutticola. Speciale micotossine. Estratto da *Informatore Fitopatologico*. Anno LII- n- 12/12.
- Lorenzini G., 2001. Principi di Fitoiatria. Calderini edagricole.
- Machado A., 2006. Tecnologie chimico-agrarie, Poseidonia.
- Magan N., 2006. Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia* 162(3): 245-53.
- Majerus P. and Kapp K., 2002. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States, March 2002, http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html.
- Manners J. G., 1993. Invasion of the host plant and damage to host tissues. *In: Principles of plant pathology*. Second Edition. Cambridge University Press.
- Mari M. and Ippolito A., 2009. Malattie degli ortofrutticoli in postraccolta. Georgofili, Quaderni. *Innovazioni nella difesa delle colture con mezzi a basso impatto ambientale* 7: 145-167.
- Mari M., Neri F., Bertolini P., 2007. Novel Approaches to Prevent and Control Postharvest Diseases of Fruit. *Stewart Postharvest Review*, 3(6): Article 4. Stewart Postharvest Solutions Ltd., London, UK.
- Material Safety Data Sheet, 2004. MP Biomedicals Germany GmbH. www.mpbio.com
- Matta A., Luisoni E. e Surico G., 1996. *Fondamenti di Patologia Vegetale*. Patron Editore, Bologna, pp. 94-107, 328-333.

- McKinley E. R. and Carlton W. W., 1991. Patulin. In: *Mycotoxins and phytoalexins* (Sharma, R.P., and Salunkhe, D.K., Eds.) pp. 191-236, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Merck Index, 12th ed., (1996) #7185.
- Middelhoven W.J., Scorzetti G., Fell J.W., 2004. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. *Int J Syst Evol microbial* 54: 975-986.
- Miraglia M., e Brera C., 2000. Le micotossine negli alimenti; informazioni disponibili ed impatto sulla salute umana. In: *Proceedings of the 6th International Feed Production Conference*, Facoltà di Agraria U.C.S.C., Piacenza, pp. 27-28.
- Moake M. M.; Padilla-Zakour O. I.; Worobo R. W, 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 1, 8–21.
- Montesinos E., 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol* 6: 245-252 DOI 10.1007/s10123-003-0144-x review article.
- Morales H., Marín S., Ramos A. J., Sanchis V., 2010. Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. *Food Control*, 21: 953-962.
- Morales H., Sanchis V., Usall J., Ramos A. J. and Marín S., 2008. Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 61-67.
- Moss M. O. and Long M. T., 2002. Fate of patulin in the presence of yeast *Saccharomices cerevisiae*. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 19(4), 387-399.
- Naceur Haouet M. e Altissimi S. M., 2003. Micotossine negli alimenti e micotossicosi animale e umana (1ª parte). Webzine Sanità Pubblica Veterinaria, n. 18, febbraio, <http://www.pg.izs.it/indice-spv.html#147>
- Nigro F., Ippolito A., Lima G., 2009. In: De Cicco V., Bertolini P., Salerno M.G., 2009. Patologia postraccolta dei prodotti vegetali. Piccin cap. 6.

- Ordentlich A., Nachmias A., Chet I., 1990. Integrated control of *Verticillium dahliae* in potato by *Trichoderma harzianum* and captan. *Crop Protection* 9: 363-66.
- Osswald H.; Frank H. K.; Komitowski D.; Winter H., 1978. Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Food Cosmet.*, 16: 243–247.
- Paster N., Huppert D., and Barkai-Golan R., 1995. Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres. *Food Additives and Contaminants*, 12(1): 51-58.
- Pfeiffer E., Gross K., Metzler M., 1998. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis*, 19: 1313–1318.
- Powelson R.L. (1960). Initiation of strawberry fruit rot caused by *B. cinerea*. *Phytopathology* 50: 491-494.
- Puel O., Galtier P. and Oswald I. P., 2010. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* 2: 613-631; doi:10.3390/toxins2040613.
- Purvis A. and Hector A., 2000. Getting the measure of biodiversity. *Nature* 405: 212-219.
- Ricelli A., Baruzzi F., Solfrizzo M., Morea M., Fanizzi F. P., 2007. Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73(3): 785–792.
- Rodriguez-Valera F., 2004. Environmental genomics: the big picture? *FEMS Microbiol Lett* 231: 153-158.
- Salerno M.G., 2009. In: De Cicco V., Bertolini P., Salerno M.G., 2009. *Patologia postraccolta dei prodotti vegetali*. Piccin; cap. 1.
- Sampaio J. P., Gadanho M., Santos S., Duarte F. L., Pais C., Fonseca A., Fell J. W., 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 687-697.
- Schumacher D. M.; Metzler M. and Lehmann L., 2005a. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Arch. Toxicol.* 2005, 79: 110–121.

- Schumacher D. M.; Wagner J.; Metzler M.; Lehmann L, 2005b. Influence of decreased intracellular glutathione level on the mutagenicity of patulin in cultured mouse lymphoma cells. *Mycotoxin Res.* 21: 150–152.
- Schumacher D. M., Muller C., Metzler M., Lehmann L., 2006. DNA–DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. *Toxicology Letters*, 166: 268–275.
- Scott P. M., 1974. Patulin. In: *Mycotoxins*. Purchase I. F. H., Ed. Elsevier, Amsterdam, 383.
- Scott P.M., 1984. Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 6: 428-499.
- Scott P.M., 1998. Industrial and farm detoxification process for mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* 149: 543-548.
- Scott P. M., Kennedy B. e Van Walbeek W.,1972. Desoxypatulinic acid from a patulin-producing strain of *Penicillium patulum*. *Experientia*, 28: 1252.
- Selmanoglu G., 2006. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats. *Food Chem. Toxicol.* 44: 2019–2024.
- Selmanoglu G.; Kockaya E. A, 2004. Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. *Food Chem. Toxicol.* 42: 721–727.
- Sharma R. R., Singh D., Singh R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonist: A review. *Biological control*, 50: 205-221.
- Singh J., 1967. Patulin. In: *Antibiotics*. Vol. 1, Mechanism of action. Gottlieb D. and Shaw P.D., Ed. Springer-Verlag, New York, 621.
- Singh D., Sharma R. R., 2007. Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. In: Prasad, D. (Ed.), *Sustainable Pest Management*. Daya Publishing House, New Delhi, India.
- Smith J. E.; Lewis C. W. e Anderson J. G.,1994. Mycotoxins in human nutrition and health. European Comm, Directorate.-General XII; Science, Research and Development, EUR 16048 EN.
- Sommer N.F., Buchanan J.R. and Fortlage, 1974. Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.* 28: 589.
- Sommer N.F., Fortlage R.J., Edwards D.C., 1992. Postharvest diseases of selected commodities. In Kader A.A., *Postharvest Technology of*

- Horticultural Crops, University of California, Div. Agriculture and Natural Resources, Publication 3311, pp. 117-160.
- Spadaro D. and Gullino M.L., 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91: 185-194.
- Stansfeld J. M., Francis A. E. and Stuart-Harris C.H., 1944. Laboratory and clinical trials of patulin. *The Lancet* Vol. 244 (6316): pp. 370-372.
- Stork N.E., 1999. The magnitude of global biodiversity and its decline. In: Cracraft J., Grifo F.T. (eds) *The living planet: biodiversity science and policy in crisis*. Columbia University Press, New York, pp. 3-32.
- Swinburne T.R. and Brown A.E., 1976. A comparison of the use of *Bacillus subtilis* with conventional fungicides for the control of apple canker (*Nectria galligena*). *Ann. Appl. Biol.* 82: 365-68.
- Umeda M., Tsutsui T., Saito M., 1977. Mutagenicity and inducibility of DNA single-strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins. *Gann*, 68, 619–625.
- van Egmond H.P. and Jonker M.A., 2008. Regulations and Limits for Mycotoxins in Fruits and Vegetables. In: Barkai-Golan R. and Paster N., *Mycotoxins in fruits and vegetables*, cap. 3.
- Varga J., Peteri Z., Tabori K., Teren K., Vagvolgyi C., 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus isolates*. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 321– 328.
- Welke J. E., Hoeltz M., Dottori H. A., Noll I.B., 2009. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. *Food Control* 20: 48-52.
- White T. J. T. Bruns, Lee S., and Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- World Health Organization, 1990. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Chapter Patulin. The 35th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Food Additives Series 26, pp. 143–165.
- World Health Organization, 1991. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Chapter Ochratoxin A. The 37th

- meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Food Additives Series 28, pp. 365–417.
- World Health Organization, 1996. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Chapters Ochratoxin A and Patulin. The 44th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Food Additives Series 35, pp. 363–402.
- World Health Organization, 1999. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Aflatoxins. Forty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Technical Report Series 884, pp. 69–77.
- World Health Organization, 2000. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Zearalenone. Fifty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Technical Report Series 896, pp. 93–96.
- World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food: Aflatoxin M1, Fumonisin, Ochratoxin A, trichothecenes Deoxynivalenol, T-2 and HT-2. Prepared by the 56th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Food Additives Series 47 & FAO Food and Nutrition Paper, 74, WHO Geneva, pp. 701.
- World Health Organization, 2002. Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Technical Report Series 906, pp 62.
- Wilson D.M., 1976. Patulin and penicillic acid. *Adv. Chem.* 149-90.
- Wilson C. L. and Wisniewski M. E., 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 425-441.
- Wisniewski M. E. and Wilson C. L., 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. *Hort. Science*, 27: 94-98.

- Wolf K., Breunig K., Barth G., 2003. Non conventional yeasts in genetics, biochemistry, and biotechnology. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Woodward R.B. and Singh G., 1949. The structure of patulin. *J. Am. Chem. Soc.* 71: 758.
- Wright S. A. I., De Felice D. V., Ianiri G., Pinedo-Rivilla C., De Curtis F. and Castoria R. 2013. Two rapid assays for *screening* of patulin biodegradation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* DOI 10.1007/s13762-013-0325-x
- Wright S. A. I., Ianiri G., De Felice D. V. and Castoria R., 2008. A rapid assay for patulin degradation by the basidiomycetous yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11. COST Action 924. Novel approaches for the control of postharvest diseases and disorders, pp. 19-29.
- Zhou S., Jiang L., Geng C., Cao J. and Zhong L, 2009. Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. *Toxicol.* 55: 390-395.
- Zhu S. J., 2006. Non-chemical approaches to decay control in postharvest fruit. In: Nouredine, B., Norio, S. (Eds.), *Advances in Postharvest Technologies for Horticultural Crops*. Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 297–313.

Ringraziamenti

Ringrazio in modo particolare il tutor Prof. Vincenzo De Cicco per la sua gentilezza e disponibilità e i Prof. Giuseppe Lima, Filippo De Curtis, Sandra Wright, Raffaello Castoria e tutti i ragazzi del laboratorio di Patologia Vegetale del Dipartimento A.A.A. dell'Università degli Studi del Molise.

Ringrazio inoltre la prof. ssa Rosa Durán Patrón e con lei anche tutti i professori e i ragazzi dei laboratori del Dipartimento di Chimica Organica dell'Università di *Cadiz* (Spagna) per l'ospitalità e la cordialità.