

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

PATLOGIA VEGETALE

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinari di afferenza: AGR/12-Patologia Vegetale

**ENZIMI, ACIDI ORGANICI ED ALTRI METABOLITI
COINVOLTI NELLA PATOGENESI
DI *PENICILLIUM SPP.***

Presentata da: IRENE DONATI

Coordinatore Dottorato PROF. PAOLO BERTOLINI

Relatore PROF. PAOLO BERTOLINI

Correlatore PROF.SSA MARTA MARI

Esame finale anno 2008

1.1 INTRODUZIONE

1.1.1 Produzione pericola

Il pero (famiglia *Rosaceae*, sottofamiglia *Pomoideae*, genere *Pyrus*) con oltre 19 milioni di tonnellate prodotte nel 2005 è la seconda specie frutticola dei climi temperati dopo il melo (quasi 60 milioni di tonnellate) e prima del pesco (poco meno di 16 milioni di tonnellate) (Fonte CSO).

Geograficamente le aree a maggior produzione al mondo sono tre: l'Oriente, con la Cina al primo posto tra i paesi produttori, l'Europa, con l'Italia al secondo posto e le Americhe, con gli USA al terzo posto nella graduatoria internazionale

Le influenze che ciascun paese gioca sul piano produttivo, non necessariamente si riflettono a livello di commercio globale. Infatti paesi come l'Argentina, Cile, e Sud Africa, ad esempio, destinano la quasi totalità delle loro produzioni sul mercato estero, diventando così importanti presenze sul mercato mondiale, nonostante i modesti livelli produttivi.

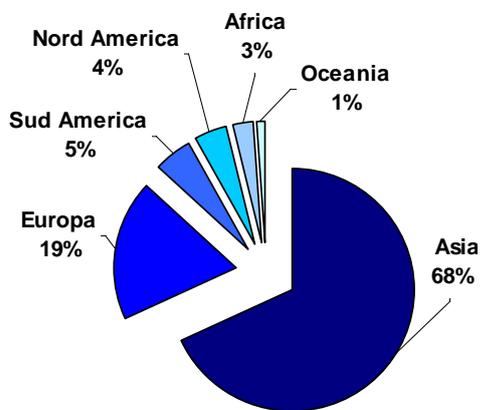


Figura 1- Produzione mondiale pere - Media 2003/2005 (Fonte FAO)

In tutto il continente asiatico vengono prodotte oltre il 90 % delle pere, con la Cina che da sola produce il 57% della produzione mondiale. La gran parte della produzione cinese è destinata al mercato interno, ma negli ultimi tempi le esportazioni si aggirano intorno alle 350.000 tonnellate, mostrando un trend in crescita nelle ultime campagne.

La produzione europea si colloca, da circa un decennio, intorno ai 2,5 milioni di tonnellate. L'Italia è il secondo produttore mondiale e il primo produttore europeo di pere (Miotto, 2005), gran parte della produzione nazionale è destinata al consumo fresco, mentre circa il 10% del totale viene utilizzato dall'industria di trasformazione per la produzione di sciroppati, succhi e nettari.

Il nostro paese provvede ad oltre il 35% della produzione totale europea. Le aree produttive sono fortemente concentrate in Emilia Romagna e particolarmente nel triangolo formato dalle province di Ferrara, Modena e Bologna, con il 61 % della superficie e il 68 % della produzione.

La pericoltura statunitense copre il 98 % della produzione nord americana. Gli Stati Uniti sono al secondo posto per quanto riguarda le pere di tipo europeo con la varietà Bartlett che è praticamente l'unica coltivata in California, insieme con il suo mutante Red Bartlett coltivato in Oregon e Washington. La pericoltura nel continente sudamericano si concentra in due Paesi: Argentina e Cile che, da soli, coprono il 91% del totale prodotto. L'Argentina è un paese a forte vocazionalità nella coltivazione delle pere, favorita anche dall'assenza di malattie, molto comuni nelle altre zone produttive (come fuoco batterico e psilla), mentre in Cile la pericoltura, risente di un momento di congiuntura, come dimostrano i dati relativi sia alle superfici che alle produzioni.

Accanto a questa elevata e costante produzione è stata osservata una forte contrazione del numero di varietà di pero coltivate. Tale numero si è ridotto da un centinaio (Branzanti e Sansavini, 1964) ad appena un trentina, di cui solo cinque costituiscono oltre l'80% della produzione (Sansavini *et al*, 2000). La causa è da

ricercare nella coincidenza fra concentrazione produttiva e preferenzialità del mercato che hanno fatto restringere un interesse commerciale verso poche cultivar che da sole coprono l'intero calendario di consumo. Per quanto riguarda il panorama varietale, a livello europeo, spicca la 'Conference', la cui produzione rappresenta oltre il 30% del totale delle pere coltivate nella Comunità. La 'William B.C.', diffusa prevalentemente in Italia e Francia, si mantiene tendenzialmente stabile, al di sopra delle 300.000 tonnellate. In ordine di importanza si colloca al terzo posto l' 'Abate Fetel', diffusa praticamente solo in Italia, segue la 'Blanquilla' spagnola, e in netto declino appaiono varietà come 'Guyot-Limonera', e 'Decana del Comizio'. In questi ultimi anni i produttori di pere hanno cercato di valorizzare sempre di più il loro prodotto, introducendo come in altri casi, il concetto di qualità, che nel tempo ha assunto un significato sempre più ampio comprendendo l'aspetto esteriore (dimensioni, colore, forma), le caratteristiche organolettiche, nutrizionali, igienico-sanitarie, e commerciali (confezionamento, presentazione, marchi). Nel loro complesso tutti questi parametri sono influenzati non solo dai fattori climatici, e pedologici, ma anche da numerose variabili collegate al processo di produzione, conservazione e distribuzione, e da ultimo il consumatore.

1.1.2 Conservazione

Prerrefrigerati fino ad una temperatura di 3 - 4°C, i frutti completano il raffreddamento fino a -0,5/ -1°C nelle celle di conservazione, dove in condizioni di elevata umidità relativa (90-95%) il prodotto raccolto, può essere conservato in Refrigerazione Normale (RN). Tuttavia in considerazione sia del miglioramento delle qualità organolettiche, sia delle necessità di prolungare il periodo di conservazione, solitamente viene consigliato l'impiego dell'atmosfera modifica (AC) o a basso tenore di ossigeno (ULO). Quest'ultima tecnica è particolarmente consigliata per il prodotto

destinato a quei mercati che richiedono frutti ancora verdi. Nella tabella 1 sono riportate le diverse formulazioni gassose impiegate anche in relazione alle caratteristiche peculiari delle singole cultivar.

Cultivar	Temperatura	Mesi	O ₂ %	CO ₂ %
Conference	- 1/0	7-8	4	2
Decana del Comizio	- 1/0	5-6	1,2-1,5	0,8
Decana di inverno	- 1/0	8-9	2-3	5
Kaiser	- 1/0	6-7	1,7	0,8
Passa Crassana	- 1/0	8-9	2-3	5
Rosada	- 1/0	4	4	2
Red Bartlett	- 1/0	4	4	2
William	- 1/0	2-3	2-3	5

Tabella 1 - Formule di conservazione in atmosfera controllata (AC)
o a basso tenore di ossigeno (ULO)

1.2 ALTERAZIONI POST-RACCOLTA

Le alterazioni che si sviluppano durante la fase post-raccolta possono rappresentare un ostacolo alla conservazione e commercializzazione dei prodotti ortofrutticoli freschi e causano perdite spesso anche ingenti di prodotto. Il valore economico delle perdite è considerevole, in quanto si tratta di frutti con un elevato valore aggiunto poiché raccolti, selezionati e pronti per la vendita al dettaglio. Applicando le opportune tecnologie di pre-refrigerazione, conservazione e trasporto, è possibile rallentare i naturali processi di maturazione dei frutti, e limitare l'insorgenza delle alterazioni di origine parassitaria prevenendone le cause

d'insorgenza e intervenendo al momento più opportuno con trattamenti appropriati. Le patologie più importanti, per il loro carattere distruttivo, sono causate da microrganismi (quasi esclusivamente funghi) in grado di contaminare i frutti in vari momenti della filiera produttiva: in campo, in magazzino dopo la raccolta, in cella frigorifera e durante il trasporto.

In riferimento alla *Pomacee* le maggiori perdite si verificano durante la conservazione, anche se soprattutto nel caso delle pere tali perdite si manifestano frequentemente nella fase di distribuzione e di shelf-life, a causa dell'insorgenza di marciumi e fisiopatie (disfacimenti da sovraturazione, riscaldamento, ed imbrunimenti). Le principali alterazioni parassitarie sono : *Penicillium expansum* Link agente della muffa verde-azzurra, *Botrytis cinerea* Pers agente del marciume grigio, e *Phlyctaena vagabunda* (ex *Gloeosporium album*) agente del marciume lenticellare. Occasionalmente, sui frutti conservati per lungo tempo e senescenti si possono riscontrare marciumi dovuti ad altri patogeni quali: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor piriformis* ecc. Questi miceti, spesso ubiquitari e polifagi, sono generalmente patogeni da ferita che iniziano il processo infettivo attraverso soluzioni di continuità come ferite di natura biotica (animali, insetti,) o abiotica (spaccature, contusioni e abrasioni causate da situazioni ambientali e/o dalle operazioni di raccolta e lavorazione dei frutti). Frequente è anche la penetrazione attraverso vie naturali come stomi e lenticelle. Importanti e diffuse sono le " infezioni latenti" (causate ad esempio da *P. vagabunda*) ovvero infezioni il cui sviluppo risulta temporaneamente inibito dalle condizioni fisiologiche, biochimiche e strutturali caratteristiche del frutto immaturo, e che si manifestano tardivamente nel frutto in avanzato stadio di maturazione. Meno diffusa risulta invece la penetrazione attiva dei tessuti indenni, anche se in tale ambito si può ascrivere l'inoculazione per contatto tra organi infetti e frutti sani realizzata dal micelio evaso.

L'incidenza delle alterazioni è altresì influenzata da fattori che possono essere così riassunti:

- temperature e umidità sia in campo (durante la maturazione), sia nella fase post-raccolta;
- suscettibilità varietale
- tecniche di conservazione non sempre applicate in modo appropriato e, comunque, con un limitato effetto nella prevenzione degli attacchi d'origine microbica;
- legislazione fitosanitaria nazionale e comunitaria sempre più restrittiva nell'uso dei prodotti chimici di sintesi;

Tra i patogeni citati, il *P. expansum* è uno fra i più pericolosi in quanto soprattutto a causa della carenza di principi attivi autorizzati ed efficaci, nonché dall'impiego dell'acqua nei sistemi per la veicolazione dei frutti (Bertolini e Folchi, 1993).

1.3 IL GENERE *PENICILLIUM*

Penicillium significa piccolo pennello: tale nome è stato attribuito a questo genere a causa dell'analogia esistente tra la forma di un pennello e quella dei conidiofori tipiche strutture per la riproduzione asessuata che caratterizzano questo raggruppamento tassonomico (Pitt e Hocking, 1999).

Penicillium, è uno tra i generi fungini più diffusi in natura e le sue molte specie riescono a svilupparsi negli habitat più diversi, considerate nel loro complesso ubiquitarie esse generalmente si comportano in modo saprofitario. Alcune sono in grado di causare marciumi su diversi ospiti vegetali, sia in campo sia durante la conservazione. Altre hanno importanti impieghi nel campo della micologia industriale,

per la produzione di antibiotici (penicillina, griseofulvina) e di enzimi (ribonucleasi) (Locci, 1999). In campo alimentare è noto il loro ruolo nella maturazione di formaggi, come il gorgonzola ed il roquefort. Rispetto ad altri raggruppamenti sistematici (come ad esempio *Aspergillus*), il genere *Penicillium* è caratterizzato da una xerofilia meno spiccata e da un minore adattamento ad elevate temperature. Alcune specie sono psicrofile e quindi in grado di contaminare derrate conservate a basse temperature, poichè possono crescere sia pure lentamente a temperature vicine o pari a 0 °C.

I conidiofori sono composti da un insieme di fialidi che portano catenelle di conidi. Le fialidi sono collegate al ramo conidioforo direttamente o tramite una o più ramificazioni. La morfologia del ramo conidioforo determina la suddivisione del genere in quattro subgenera, in funzione del numero e della conformazione delle suddivisioni riscontrate nel ramo conidioforo.

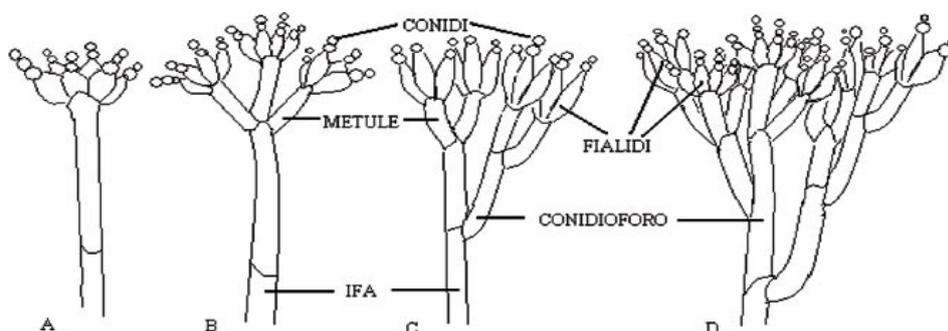


Figura 2 - Caratteristiche del ramo conidioforo di: A: subgenus *Aspergilloides*,
B e C: subgenera *Furcatum* e *Biverticillium*; D: subgenus *Penicillium*

Il subgenus *Aspergilloides* Dierckx non presenta ramificazioni del ramo conidioforo e i conidi hanno infatti origine direttamente dalle fialidi, che a loro volta si inseriscono direttamente sul ramo conidioforo, costituendo la forma monoverticillata.

La struttura più complessa del ramo conidioforo denominata terverticillata è invece caratterizzata da tre ramificazioni, talvolta anche quattro, che collegano le fialidi al ramo conidioforo principale: tale struttura è tipica del subgenus *Penicillium* Raper e Thom. Tra questi due estremi si collocano le forme biverticillate, il cui nome suggerisce siano presenti due ramificazioni, comprese nei subgenera *Furcatum* Pitt e *Biverticillium* Dierckx.

Le specie che più frequentemente contaminano le derrate alimentari sia in campo sia durante la conservazione (Pitt e Hocking, 1999) appartengono al subgenus *Penicillium*. La tassonomia è piuttosto difficoltosa, a causa della notevole variabilità morfologica che caratterizza gli appartenenti alla stessa specie e dei pochi caratteri sui quali si basa la differenziazione tra le specie. Inoltre molte specie appartenenti a questo subgenus sono in grado di produrre micotossine (Frisvad e Filtenborg, 1989). Fra i più frequenti patogeni si distinguono: *P.expansum* ad ambito pressoché polifago (pomacee, drupacee, uva, actinidia, numerose famiglie di ortaggi), e *P.digitatum* ed *italicum* che insidiano soprattutto gli agrumi. *P. canescens*, *citrinum*, e *cyclopium* che normalmente associati alla specie *expansum* insidiano l'uva, *P. crustosum*, *pallidum*, e *viridicatum* su melone, e *P. funiculosum* su ananas.

Il genere *Penicillium* è in rapporto metagenetico con la forma sessuata *Carpenteles* spp. afferente alla sottodivisione *Ascomycotina*, classe *Plectomycetes*, ordine *Erotiades*, tale forma è molto rara e ha scarsa importanza epidemiologica.

Tra le specie di *Penicillium* spp. individuate nelle pomacce, la specie più interessante per l'elevata patogenicità è sicuramente *P. expansum* Link, anche se frequentemente è possibile riscontrate anche la presenza di *P. solitum* e *P. aurantiogriseum*.

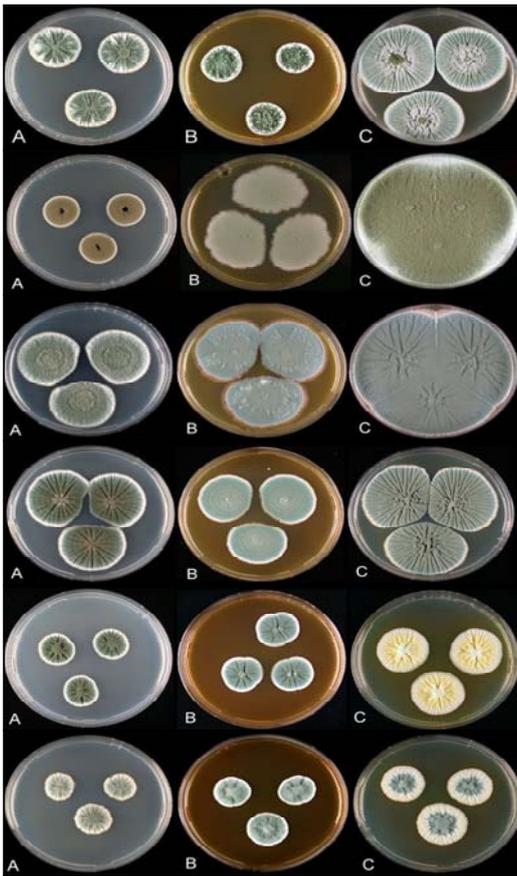


Figura 3 - Alcuni esempi di specie del subgenus *Penicillium*. Sviluppo della colonia su A (CYA), B (MEA), C (YES) dopo 7 giorni.

In ordine *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *P. crustosum*, *P. cyclopium*, *P. viridicatum*

Specie	Mele	Pere
<i>P. aurantiogriseum</i>	+	+
<i>P. atramentosum</i>	-	+
<i>P. brevicompactum</i>	+	-
<i>P. commune</i>	+	+
<i>P. crysogenum</i>	+	-
<i>P. crustosum</i>	+	+
<i>P. digitatum</i>	+	-
<i>P. expansum</i>	+	+
<i>P. granulatum</i>	-	+
<i>P. griseofulvum</i>	+	-
<i>P. roquefortii</i>	+	+?
<i>P. solitum</i>	+	+
<i>P. verrucosum</i>	+	+
<i>P. viridicatum</i>	+	+?

Tabella 2 - Specie di *Penicillium* patogene ritrovate sulle pomacee (Sanderson e Spott 1995, modificato)

1.4 LA MUFFA VERDE AZZURRA

Come già accennato *P. expansum* è l'agente responsabile della " muffa verde-azzurra, grave alterazione delle pomacee in conservazione, ma anche su altri frutti come pomodoro (Barkai-Golan 1974, Fajola 1979), fragola (Barkai-Golan, 1974), avocado (Morales *et al*,/1979), mango (Johnson *et al*,1990), uva (Lorenz e Eichhorn, 1985), e numerose altre specie indicandone l'ampio spettro di patogenicità (Snowdon, 1990). L'isolamento da ortaggi freschi è invece meno frequente è stata riportato su carote (Snowdon, 1991) e su cipolla (Sepulveda e Apablaza, 1979).

La denominazione di questa avversità è legata al colore delle fruttificazioni conidiche, che inizialmente bianche, con il progressivo invecchiamento della colonia assumono la caratteristica colorazione.

Generalmente nelle diverse zone di produzione (esempio USA ed Israele) l'infezione è più grave per le mele (Jones e Aldawincklek, 1991), mentre soprattutto in Italia, l'infezione risulta più consistente nelle pere (Pratella, 1996), è stata inoltre riscontrata una diversificazione varietale della suscettibilità, cultivar come 'Conference' e 'Kaiser' in condizioni particolarmente favorevoli sono normalmente caratterizzate da una maggiore predisposizione alle infezioni, e possono raggiungere valori di morbilità anche del 30-40% (Tonini, 1996).

1.4.1 Sintomatologia

I primi sintomi dell'infezione sono costituiti da aree edematose, molli, dai margini definiti, e di colore marrone chiaro. I tessuti del mesocarpo vanno incontro ad un disfacimento succoso, inizialmente superficiale, ma che rapidamente aggredisce in profondità il frutto, queste aree tendono ad enuclearsi con estrema facilità (Pratella, 1996).

A temperatura ambiente (20-25 °C) la lesione ha uno sviluppo piuttosto rapido, e in presenza di un'umidità relativa elevata, a partire dalla porzione centrale compare un micelio biancastro, a sua volta circondato da una striscia di tessuto marcescente. Con il procedere dell'infezione, il fungo evade dall'ospite formando cuscinetti (sporodochi) di muffa molto polverulenta, dapprima di colore bianco quindi, a sporulazione avvenuta, verde-azzurra. I frutti infetti risultano flaccidi, perdono succhi cellulari e sono completamente ricoperti dalle spore del patogeno.



Figura 4 - Manifestazione di marciume da *P. expansum* su mele e pere

1.4.2 Epidemiologia e patogenesi

Il fungo vive saprofiticamente sui residui vegetali presenti negli imballaggi, lungo le linee di lavorazione dei magazzini frigoriferi e anche sulle pareti delle stesse celle di conservazione. In particolare i frutti affetti da muffa verde-azzurra e scartati rappresentano un'importante fonte di inoculo.

La diffusione delle spore e la successiva contaminazione dei frutti, è legata prevalentemente alla movimentazione dell'aria nei magazzini e nelle celle.

P. expansum è il tipico esempio di patogeno da ferita, in quanto la via preferenziale di penetrazione è rappresentata da microlesioni e contusioni provocate durante la movimentazione del prodotto (raccolta, lavorazione e confezionamento).

La presenza di canali stilari pervi soprattutto per le mele, oppure i peduncoli dei frutti e le lenticelle nei frutti maturi, possono costituire ulteriori facili vie di penetrazione per il patogeno.



Figura 5 - Esempio di enucleazione della tacca di marciume, ed evasione del micelio del patogeno dal picciolo del frutto

La movimentazione attraverso l'acqua, e i trattamenti antiriscaldamento o con fungicidi mediante "drencher" favoriscono l'infezione per contaminazione dell'acqua da parte delle spore. Frequente è anche la diffusione per contatto fra frutti ammalati e frutti sani, inoltre altri centri di infezione possono insorgere sui tessuti alterati da altre patologie infettive e/o fisiologiche.



Figura 6 - In condizioni di alta umidità relativa e con temperature superiori ai 4°C il patogeno può penetrare anche per contatto

Come già accennato si tratta di un fungo a carattere psicrofilo, ha la capacità di svilupparsi attivamente a temperature prossime a 0°C, sono stati riscontrati valori minimi di temperatura di crescita attorno ai -2,-3 °C (Panassenko 1967, Mislivec e Tuite, 1970 a) perciò è in grado di accrescersi anche durante lo stivaggio dei frutti a 0/-1°C.

La condizione ottimale di temperatura per questa specie è comunque attorno ai 25°C, con temperature massime vicine ai 35°C (Panassenko, 1967).

Per la germinazione dei conidi sono necessari livelli minimi di attività dell'acqua (a_w) attorno a 0,82-0,84 (Mislivec e Tuite, 1970 b; Hocking e Pitt, 1979). L'attività dell'acqua rappresenta il rapporto tra la pressione parziale del vapore acqueo nella matrice considerata e la pressione di vapore a saturazione dell'acqua pura nelle stesse condizioni. Nelle derrate alimentari essa varia da 1 a 0,65: mentre i miceti normalmente sono in grado di crescere e svilupparsi con a_w pari a 1 (tipica di frutta e ortaggi) man mano che tale valore decresce (< 0,80) la capacità di colonizzazione si riduce consentendo la crescita dei cosiddetti funghi xerofili.

Alcune specie xerofile estreme crescono seppur lentamente in presenza di a_w pari a 0,61-0,62.

Bisogna inoltre considerare la presenza di acqua libera e lo stadio di maturazione dei frutti, in questo caso lo sviluppo più consistente delle infezioni si verifica proprio sui frutti maturi, al momento della distribuzione quando risulta più difficile poter controllare gli altri parametri.

1.4.3 Terapia

Per la lotta alla muffa verde-azzurra valgono soprattutto misure preventive mirate a eliminare o evitare le possibili cause di infezione, e quindi essenzialmente si basano su accorgimenti di tipo agronomico e su una corretta tecnica di conservazione.

Si cerca di limitare le possibilità di lesionare il frutto, riducendo le manipolazioni dello stesso e ponendo una maggiore attenzione nelle loro esecuzione, essenziale risulta la disinfezione degli imballaggi e degli ambienti di lavorazione e conservazione. Inoltre come precedentemente sottolineato è importante la disinfezione ripetuta delle acqua di lavaggio e il mantenimento della catena del freddo onde evitare la formazione di acqua di condensa sui frutti.

Le possibilità di intervento chimico post-raccolta, stante il vigente quadro delle norme fitosanitarie sono limitate ad un trattamento prima della conservazione con Tiabendazolo (TBZ) un fungicida appartenente alla famiglia dei benzimidazolici. L'impiego massiccio negli anni passati di questi principi attivi (p.a.) ha favorito l'insorgenza di ceppi resistenti.

1.4.4 Il problema "Benzimidazolici"

L'introduzione dei benzimidazolici nel settore fitoiatrico, è avvenuta verso la fine degli anni '60 e senza dubbio ha determinato una svolta importante nella lotta ad alcuni patogeni fungini. La loro importanza è data principalmente dalla capacità sistemica (acropeta) che ha consentito di svolgere non più solo un'azione preventiva

bensì curativa ed eradicante. Inoltre anche il vasto spettro d'azione (efficaci contro numerosissime crittogame ad eccezione dei ficomiceti) è stato uno degli aspetti che più ha contribuito alla loro utilizzazione in campo agronomico. Il loro meccanismo d'azione è estremamente specifico, e agiscono inibendo l'assemblaggio dei microtubuli, strutture cellulari che fanno parte del citoscheletro, sono proteine filamentose formate da dimeri di α - e β -tubulina, importanti per la migrazione delle cellule e per il movimento degli organuli cellulari. Le due suddette proteine si associano a spirale all'estremità del microtubulo formando un cilindro cavo; la facilità con cui si ha la polimerizzazione e depolimerizzazione di tali filamenti determina la loro capacità cinetica

Le due subunità proteiche di α - β tubulina (di dimensioni $4\text{nm}\times 5\text{nm}\times 8\text{nm}$ e 100.000Da di peso molecolare) si organizzano a loro volta in gruppi di tredici per formare dei microtubuli con 25nm di diametro.

Il microtubulo, inoltre, possiede un'intrinseca polarità, dovuta alla disposizione delle subunità proteiche di tubulina. Infatti sono orientate nella stessa direzione in modo che tutte le subunità di tubulina α siano rivolte verso la stessa estremità del microtubulo, determinando così una diversità strutturale e chimica tra le due estremità. Si polimerizzano e depolimerizzano in continuazione all'interno della cellula e si accrescono a partire da un centro organizzato (detto MTOC, acronimo di "MicroTubules Organization Centre" e rappresentato dal centrosoma.

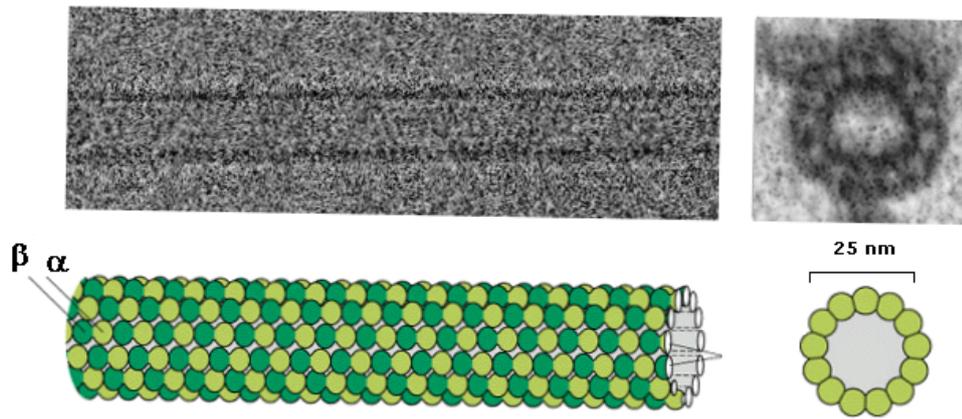


Figura 7 - Microtubuli

Il ruolo dei microtubuli abbraccia una serie di funzioni di natura trofica e meccanica, insieme ad altri tipi di strutture (microfilamenti e filamenti intermedi) sono infatti i costituenti del citoscheletro, sono i responsabili del transito di organuli e vescicole all'interno della cellula. Durante la divisione cellulare presiedono la costituzione del fuso, struttura responsabile della migrazione dei cromosomi e della corretta ripartizione del patrimonio genetico nel processo mitotico (Clemons e Sisler, 1971). La mancata formazione provoca gravi alterazioni di tutti i processi in cui queste strutture proteiche sono direttamente e indirettamente coinvolte.

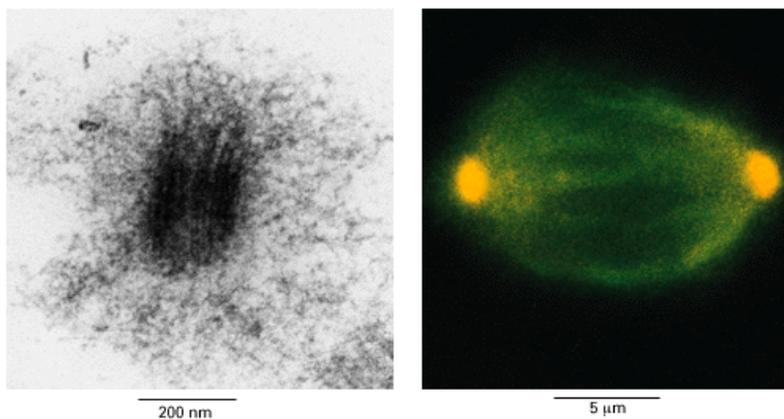


Figura 8 - Formazione del fuso mitotico

Data l'alta specificità del sito d'azione l'interazione tra β -tubulina e benzimidazolici è estremamente vulnerabile.

In natura a seguito di mutazioni nel gene della β -tubulina si può verificare un'alterazione strutturale del sito di legame, tale da ridurre l'efficacia del p. a.

A seconda del tipo di mutazione l'affinità della β -tubulina per i benzimidazolici quindi varia significativamente, dando origine a razze più o meno resistenti al trattamento.

Ceppi a diversa sensibilità ai benzimidazolici sono stati riscontrati in numerose specie del genere *Penicillium* così come in altri generi fungini (p.e.. *Botrytis*, *Neurospora*, *Aspergillus*). (Bolay *et al*, 1974; Bryk, 1997).

Utilizzando mutanti da laboratorio, i cambiamenti localizzati a livello dei codoni 198 e 200 ("benzimidazole box") del gene della β -tubulina (Hastie e Georgopoulos, 1971), determinano la sostituzione di alcuni aminoacidi, e tali modificazioni intervengono nell'interazione con il gruppo radicale del principio attivo. A seconda del livello di resistenza, si possono considerare le sostituzioni del codone 198 che determinano il passaggio progressivo da fortemente sensibile a fortemente resistente, nel seguente ordine: acido aspartico, acido glutammico, treonina, glicina, lisina, alanina, e glutammica.

L'analisi molecolare ha inoltre dimostrato il coinvolgimento di mutazioni puntiformi a carico del codone 240 con sostituzione della leucina con la fenilalanina (Albertini *et al*, 1999). La maggior parte delle sostituzioni che riguardano il codone 198 sono correlate con alti, moderati e bassi gradi di resistenza ai benzimidazolici e con una variabile modificazione della risposta del fungo ai N-fenilcarbammati (Fijimura *et al*, 1992). Altre mutazioni coinvolte riguardano i condoni : 6-50-134-165-160-168-200-241-257 (Devidse e Ishii, 1995). La perdita di efficacia dei benzimidazolici nei confronti delle infezioni da *Penicillium* è stata ampiamente documentata, (Wild, 1983; Lee, 1985; Rosenberger *et al*, 1991), soprattutto in Italia alcuni studi hanno evidenziato come la maggior parte dei ceppi isolati da frutti affetti da muffa verde-azzurra risultino resistenti (Baraldi *et al*, 2003), e in alcuni casi è stato evidenziato

un effetto stimolante del trattamento nei confronti del patogeno, un effetto simile è stato documentato precedentemente per altri fungicidi, come nel caso del metalaxyl sulla crescita vegetativa di alcuni isolati di *Phytophthora infestans* (Zhang *et al*, 1997).

1.4.5 Effetto iatrogeno

In patologia vegetale, una malattia prodotta da un agente biotico, indotta o peggiorata nella sua intensità dall'utilizzo di un specifico trattamento fitoiatrico viene definita come *malattia iatrogena* (Griffiths, 1981). Il termine deriva dalla medicina umana, ma come indicato da Horsfall (1972) equamente applicabile alla patologia vegetale, viene anche definita come: *boomerang effect* o *disease exchange*. Esempi di tale malattia sono abbastanza comuni, mentre le informazioni a riguardo si limitano alla semplice osservazione del fenomeno. Il prodotto chimico può aggravare una malattia biotica sostanzialmente agendo su tre livelli distinti: **ospite**, **patogeno** e **"microclima"**.

Il p.a. può influire sull'ospite determinando cambiamenti nella sua composizione biochimica e nelle naturali strutture di difesa, riducendo sostanzialmente la sua resistenza. Horsfall e Dimond (1957) hanno evidenziato come l'idrazeide maleica induca cambiamenti nella quantità di zuccheri presenti nel tessuto ospite, d'altronde incrementando la concentrazione zuccherina si rende più suscettibile l'ospite a quelle patologie causate dai cosiddetti "high sugar fungi" e viceversa.

Alcuni ditiocarbammati possono favorire lo sviluppo di *B. cinerea* interferendo sulla nutrizione minerale e determinando un aumento di essudati zuccherini e aminoacidici (su vite e pomodoro) (Stall *et al*, 1965; Cox *et al*, 1957;)

In altri casi il p.a. può ridurre il contenuto in cellulosa e pectine delle pareti cellulari determinando una riduzione della resistenza meccanica del tessuto alla penetrazione

da parte del patogeno (Romig e Sasser, 1972). Si assiste di conseguenza ad un aumento del potenziale di inoculo, legato non solo alla maggiore disponibilità di elementi nutritivi, ma permettendo lo sfruttamento da parte del agente infettivo del p.a. come substrato di crescita (Smith, 1970).

Infine bisogna considerare l'influenza del prodotto chimico sull'alterazione della microflora in favore della manifestazione della malattia, ciò è dato dall'eliminazione dei antagonisti naturali in seguito al trattamento con il fitofarmaco, antagonisti che dovrebbero invece contribuire a contenere lo sviluppo del patogeno (Fokkema *et al*, 1975; Hislop, 1976, Cook, 1981).

1.5. METABOLITI DI ORIGINE FUNGINA

Si é soliti distinguere i metaboliti prodotti da un microrganismo in due ampi raggruppamenti:

- **primari:** prodotti intermediari e finali dei comuni processi metabolici di tutti gli organismi viventi (zuccheri, amminoacidi, acidi organici, glicerolo) e che sono essenziali per le normali funzioni cellulari;
- **secondari:** composti di varia natura chimica che si originano da specifici processi metabolici in alcuni organismi, composti non essenziali per la crescita ma che possono favorire lo sviluppo dell'organismo che li produce (antibiotici, micotossine);

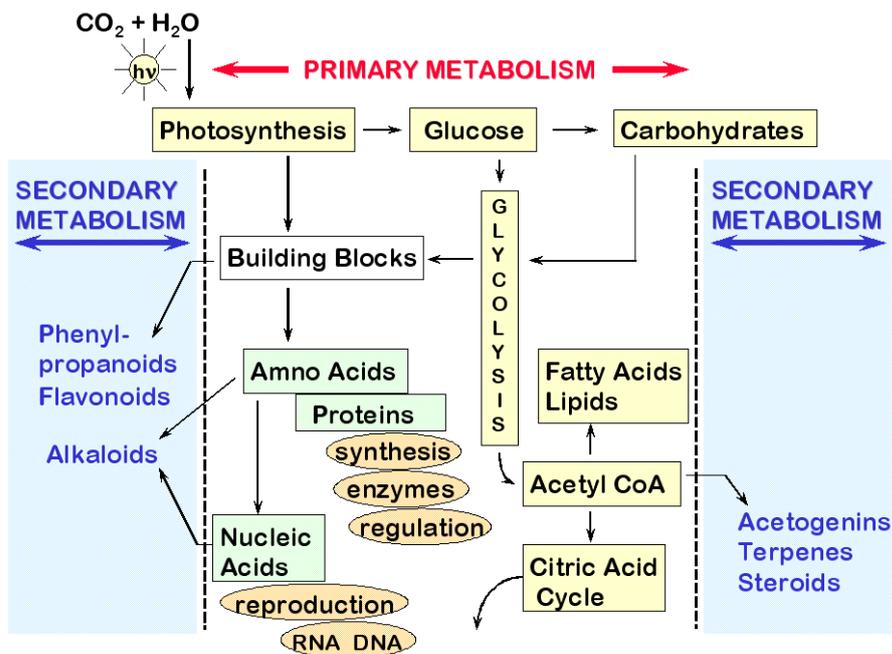


Figura 9 - Schema riassuntivo del metabolismo primario e secondario

1.5.1 Produzione di acid organici

Le cellule viventi sono in grado di produrre una ampia gamma di acidi organici, ad esempio *A. niger* quando si sviluppa in presenza di elevate concentrazioni di glucosio (15-20%) e basso pH (2.0) è in grado di convertire lo zucchero in acido citrico e di rilasciarlo nel substrato di crescita.

E' nota la produzione in particolare di acido ossalico, malico e fumarico e di pochi altri esempi. Ceppi di *A. niger* sono in grado di determinare un repentino abbassamento del pH del mezzo di crescita attraverso la conversione del glucosio extracellulare in acido gluconico mediante l'attività delle glucosidasi.

Altri ceppi sempre di *A. niger* posso produrre acido citrico intracellulare che poi esportano all'esterno della cellula probabilmente con azione acidificante e chelante, successivamente sono in grado di riassorbirlo per utilizzarlo come fonte carboniosa *A. terreus* riesce ad acidificare l'ambiente attraverso la produzione di acidi

itaconico, che pur non essendo un metabolita primario viene utilizzato per inibire lo sviluppo di altri microrganismi, inoltre l'inusuale natura di questo acido fa sì che possa essere catabolizzato solo da *A. terreus* e da poche altre specie. È interessante notare come il genere *Aspergillus*, ma in generale molti funghi del phylum Ascomycota non sono in grado ad esempio di produrre acido lattico, caratteristico invece del phylum Zygomycota. Ad esempio *Rhizopus oryzae* mette in atto diverse strategie mirate all'acidificazione del substrato attraverso la produzione di acido lattico, vincendo la competizione con funghi non in grado di metabolizzarlo. Questi funghi spesso producono sia etanolo sia acido lattico, una combinazione che potrebbe inibire molti concorrenti.

Gli acidi carbossilici provengono principalmente da tre vie degradative:

- **Ciclo di Krebs**
- **Biosintesi degli acidi grassi**
- **Transaminazione degli amminoacidi**

Il destino del piruvato in un microrganismo aerobio è generalmente collegato al ciclo di Krebs al fine di produrre ATP (AdenosinTrifosfato) e riossidare cofattori utili nei processi glicolitici e come risultato finale la completa ossidazione a CO_2 del substrato organico. L'acido piruvico è l'intermedio comune nel catabolismo degli zuccheri di molti microrganismi infatti essi sono provvisti di enzimi che competono per l'utilizzazione di questo acido costituendo il passaggio cruciale per la determinazione dei prodotti finali dei processi degradativi. Il destino del piruvato è strettamente legato alla possibilità per il microrganismo di respirare o fermentare. È quindi possibile parlare di un destino che contraddistingue un metabolismo aerobico e un metabolismo anaerobico, nel senso di non utilizzazione dell' O_2 come accettore finale di elettroni.

In condizioni aerobiche il glucosio viene principalmente trasformato in acetil-CoA e CO₂ mediante una piruvato deidrogenasi (PDH) che catalizza una decarbossilazione ossidativa. Questo è un multienzima di grandi dimensioni che necessita l'intervento di diversi cofattori (TPP: Tiamina Pirofosfato, FAD: Flavin Adenin Dinucleotide, NAD: Nicotinammide Adenina Dinucleotide) e dove tutti i numerosi prodotti intermedi, più o meno attivati, rimangono legati al complesso multienzimatico. Poiché questo sistema enzimatico promuove una reazione irreversibile esso è sottoposto ad un rigoroso controllo metabolico.

In aerobi obbligati (es. muffe come *Aspergillus*, *Penicillium*), l'unica reazione veramente competitiva è la rimozione dell'acido piruvico mediante vie anaplerotiche catalizzate da piruvato carbossilasi. Queste reazioni collegano le vie glicolitiche al ciclo di Krebs, ossia il sistema ossidativo che produce cofattori in forma riducente: in presenza di una funzionante catena di trasporto di elettroni collegata all'ossigeno, questi cofattori sono riciclati in forma ossidante con concomitante formazione di ATP.

1.6 IL CICLO DI KREBS

Anche detto ciclo degli acidi tricarbossilici o ciclo dell'acido citrico è un ciclo metabolico di importanza fondamentale in tutte le cellule che utilizzano ossigeno nel processo della respirazione cellulare. In questi organismi aerobici, il ciclo di Krebs è l'anello di congiunzione delle vie metaboliche responsabili della degradazione (catabolismo) dei carboidrati, dei grassi e delle proteine in anidride carbonica e acqua con la formazione di energia chimica. E' una via metabolica anfibolica, poiché partecipa sia a processi catabolici che anabolici, fornisce infatti anche molti precursori per la produzione di alcuni amminoacidi (ad esempio l' α -chetoglutarato e l'ossalacetato) e di altre molecole fondamentali per la cellula (Donald *et al*, 2001). I catabolismi glucidico e lipidico (attraverso la glicolisi e la beta ossidazione),

producono acetil-CoA, un gruppo acetile legato al coenzima A. L'acetil-CoA costituisce il principale substrato del ciclo. Al termine del ciclo stesso, i due atomi di carbonio immessi dall'acetil-CoA verranno ossidati in due molecole di CO_2 , rigenerando nuovamente ossalacetato in grado di condensare con acetil-CoA. La produzione rilevante dal punto di vista energetico, tuttavia, è quella di una molecola di GTP (Guanosin Trifosfato) (immediatamente utilizzata per rigenerare una molecola di ATP), di tre molecole di NADH ed una di FADH₂. I cofattori ridotti (NADH e FADH₂), si comportano come intermedi ossido/riduttivi. Quando ridotti, essi sono in grado di trasportare elettroni ad energia relativamente alta (sottratti ai substrati ossidati ad esempio nella glicolisi o nello stesso ciclo di Krebs) fino alla catena respiratoria mitocondriale. Presso tale catena, essi vengono riossidati (a NAD⁺ e FAD) e cedono gli elettroni alla catena stessa, che sarà così in grado di rigenerare molecole di ADP ad ATP.

La velocità del ciclo di Krebs viene continuamente modulata per venire incontro alle esatte necessità energetiche della cellula. I siti primari di controllo sono gli enzimi allosterici, la isocitrato deidrogenasi e la α -chetoglutarato deidrogenasi. La isocitrato deidrogenasi è stimolata dalla presenza di ADP (AdenosinDifosfato), che aumenta l'affinità dell'enzima per il substrato, al contrario, il NADH così come l'ATP hanno un effetto inibitorio nei confronti dello stesso enzima.

Il secondo sito di controllo del ciclo è posto presso la α -chetoglutarato deidrogenasi. Alcuni aspetti del controllo di questo enzima sono simili a quelli del complesso della piruvato deidrogenasi. La α -chetoglutarato deidrogenasi è dunque inibita dal succinil CoA e dal NADH, i prodotti della reazione che catalizza. Vedremo di seguito come avviene nel dettaglio la produzione di alcuni acidi organici.

	Subrato	Coenzimi	Enzima	Tipo di reazione	Prodotto
1	Ossalacetato	Acetil-CoA, acqua	Citrato sintasi	Condensazione	Citrato
2a	Citrato	-	Aconitasi	Deidratazione	<i>cis</i> -Aconitato, acqua
2b	<i>cis</i> -Aconitato	Acqua	Aconitasi	Idratazione	Isocitrato
3a	Isocitrato	NAD ⁺	Isocitrato deidrogenasi	Ossidazione	Ossalsuccinato, NADH
3b	Ossalsuccinato	H ⁺	Isocitrato deidrogenasi	Decarbossilazione	α -chetoglutarato, CO ₂
4	α -Chetoglutarato	NAD ⁺ , CoA-SH	α -chetoglutarato deidrochinasi	Decarbossilazione ossidativa	Succinil-CoA, NADH, CO ₂
5	Succinil-CoA	GDP, Fosfato	Succinil-CoA-sintetasi	Trasferimento fosfato	Succinato, GTP, CoA-SH
6	Succinato	FAD	Succinato deidrogenasi	Ossidazione	Fumarato, FADH ₂
7	Fumarato	Acqua	Fumarasi	Idratazione	L-Malato
8	L-Malato	NAD ⁺	Malato deidrogenasi	Ossidazione	Ossalacetato, NADH

Tabella 1- Substrati ed enzimi coinvolti nel ciclo dei TCA

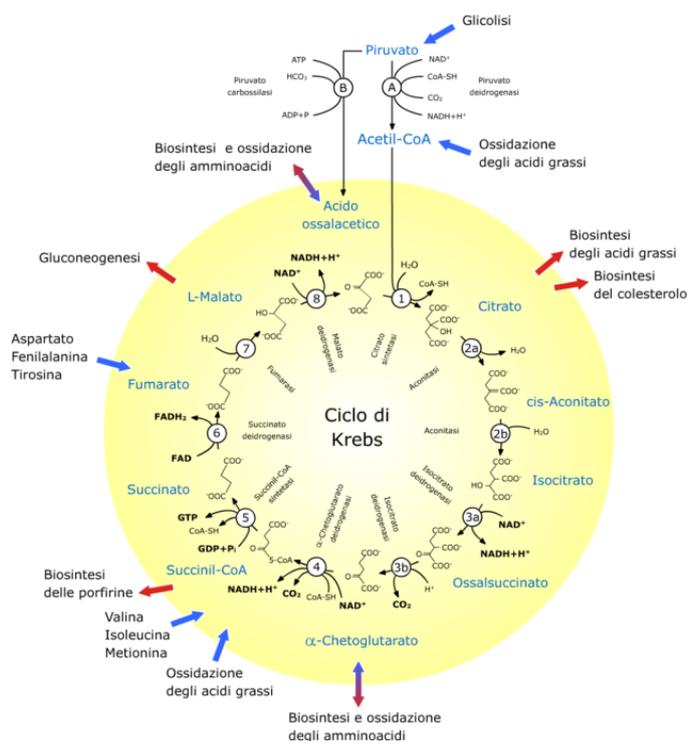


Figura 10 - Ciclo dei acidi tricarbossilici

1.6.1 Acido citrico

La produzione di acido citrico è stata accuratamente studiata soprattutto in relazione ai processi di fermentazione dei funghi filamentosi (Currie, 1917). I parametri critici per la produzione di acido citrico sono stati definiti empiricamente e comprendono: l'alta concentrazione di carboidrati, bassa concentrazione di manganese (~ 10 ppb), il mantenimento di elevati livelli di ossigeno disciolto, e un basso pH (Schreferl 1986; Zhang e Röhr, 2002 a,b). Molti interrogativi sui meccanismi fisiologici e biochimici di tali derivati restano senza risposta. La produzione di citrati a partire da glucosio o saccarosio coinvolge un ampio gruppo di attività enzimatiche con passaggi vincolati a due precisi compartimenti della membrana cellulare: citosol e mitocondri. Il glucosio viene assimilato dalla cellula e convertito in acido piruvico nel citosol. Una molecola del piruvato viene decarbossilata ad acetyl-CoA dalla piruvato deidrogenasi mitocondriale, a sua volta carbossilato nel citosol a ossalacetato da una piruvato carbossilasi. Il prodotto dell'ultima reazione viene trasportato nei mitocondri (via malato) e condensato con acetyl-CoA per formare citrato, che viene trasportato fuori dai mitocondri e finalmente fuori dalla cellula. (Kubicek e Röhr, 1986; Matthey, 1992; Ruijter *et al*/2002).

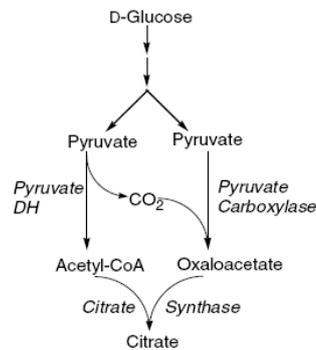


Figura 11 - Schema semplificato della sintesi di acido citrico

Attraverso la Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è stato possibile esaminare (in cellule intatte di *A. niger*), le connessioni tra l'attività glicolitica, la concentrazione di ossigeno, e il pH intracellulare. La natura di acidofila di *A. niger* è stata dimostrata constatando che, in condizioni esterne di pH estremamente bassi, nei compartimenti citosol e mitocondri vengono conservati valori di pH di 7,5 e 6,1. (Hesse *et al*, 2002). Ulteriori indagini hanno dimostrato che l'abbassamento del pH intracellulare è accompagnato generalmente dal calo della concentrazione di ossigeno disciolto (Legiša e Grdadolnik, 2002).

La dipendenza del pH intracellulare dalla concentrazione di ossigeno e il calo di specifiche attività enzimatiche in condizioni di basso pH, spiegano la necessità di regolare attentamente tali parametri per supportare il flusso da glucosio a acido citrico. Citrato sintasi è l'enzima terminale nella sintesi di acido citrico, e viene inibito dalla presenza di Mg^{2+} e di ATP (K_i pari a 1 mM), La reazione è altamente esoergonica ($\Delta G'^{\circ} = -31.4$ kJ/mole), motivo per cui questo stadio è irreversibile.

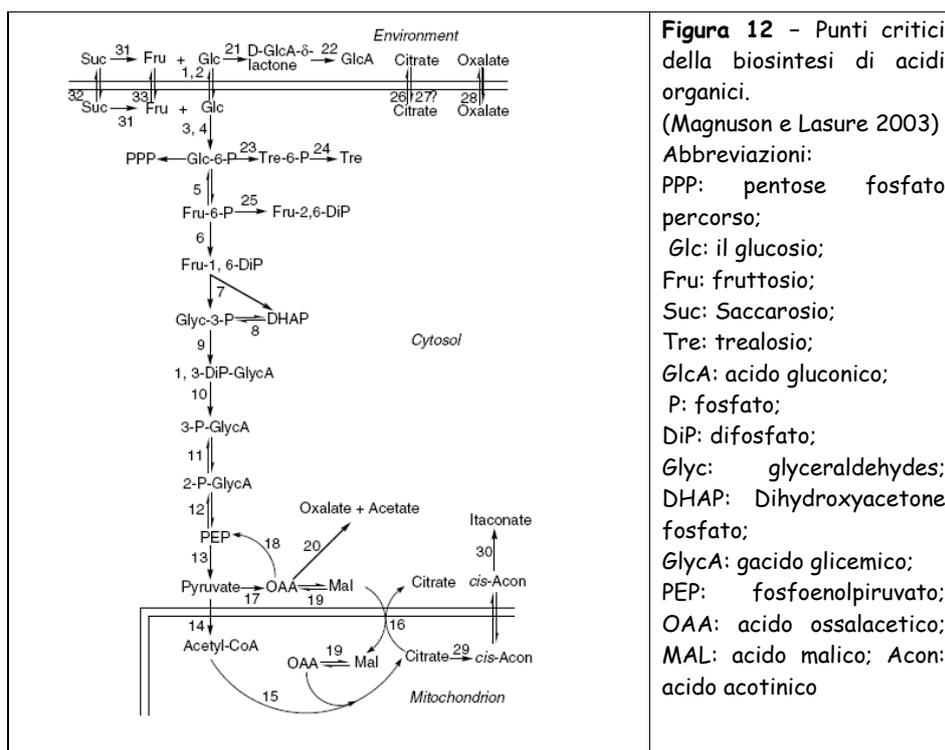
Il citrato prodotto, inoltre, è in grado di inibire competitivamente l'attività dell'enzima. Pur essendo la reazione molto favorita (perché esoergonica), può essere saldamente regolata. Questo aspetto ha una notevole importanza biologica, dal momento che permette una completa regolazione dell'intero ciclo di Krebs, rendendo l'enzima una sorta di 'pacemaker' dell'intero ciclo.

1.6.2 Acido ossalico

L'acido ossalico è prodotto da una grande varietà di funghi, e in contrasto con l'acido citrico, il suo ruolo fisiologico è noto ed è stato esaminato dettagliatamente (Dutton e Evans, 1996).

In *A. niger*, la biosintesi dell'ossalato è legata esclusivamente all'azione dell'enzima ossalatoacetasi, che catalizza l'idrolisi dell'ossalacetato in ossalato e acetato

(Hayaishi *et al*, 1956; Mueller, 1975; Lenz *et al*, 1976; Kubicek *et al*, 1988). L'enzima si trova nel citosol, e la sua espressione è indotta da valori di pH superiori a 4 (Kubicek *et al*, 1988; Pedersen *et al*, 2000). L'enzima necessita della presenza di Mn^{2+} ($K_m = 21 \mu M$), ha inoltre evidenti implicazioni nel processo di sintesi dell'acido citrico, ed è specifico per ossalacetato ($K_m = 220 \mu M$) (Hayaishi *et al*, 1956; Lenz *et al*, 1976). La presenza di piruvato carbossilasi nel citosol di *A. niger* (Bercovitz *et al*, 1990; Jaklitsch *et al*, 1991) insieme con l'insensibilità dell'ossalato all'azione inibente del fluorocitrato prodotto dal ciclo degli acidi tricarbossilici (Kubicek *et al*, 1988) indica che l'ossalato viene prodotto da un ramo del percorso della glicolisi come evidenziato nella figura 12. Il gene *oah* è stato clonato e sequenziato da *A. niger* (Pedersen *et al*, 2000) e viene considerato necessario e probabilmente sufficiente per l'espressioni funzionale dell'ossalacetato sintasi. In mutanti di laboratorio la distruzione di tale gene rende difettivo il processo di produzione di acido ossalico.



1.6.3 Acido succinico

Aspergillus spp. (Bercovitz et al, 1990), e *Penicillium spp.* (Gallmetzer et al, 2002) sono noti per la produzione e la secrezione di acido succinico. In *Aspergillus spp.* la via di sintesi dell'acido malico produce come prodotto secondario piccole concentrazioni di acido succinico. Ci sono tre possibili meccanismi metabolici per la produzione di succinato: dalla parte ossidativa del ciclo dei TCA, dalla parte riduttiva dello stesso ciclo o attraverso il ciclo gliossilato (Fig.16). Sia che si tratti della parte ossidativa del ciclo dei TCA, sia della gliocossilazione, dei sei atomi di carbonio del glucosio ne vengono conservati solo 4 per formare il succinato. D'altro canto, la porzione riduttiva del ciclo dei TCA produce due acidi a quattro atomi di carbonio per ogni molecola di glucosio metabolizzato attraverso la glicolisi, operando in combinazione con la piruvato carbossilasi. In questo modo il metabolismo anaerobico viene preferito per la produzione di acido succinico da parte dei microrganismi. Gallmetzer *et al*, (2002) suggeriscono che la produzione di acido succinico in *P. simplicissimum* può verificarsi anche dalla respirazione del fumarato, ma tale teoria non è stata ancora dimostrata.

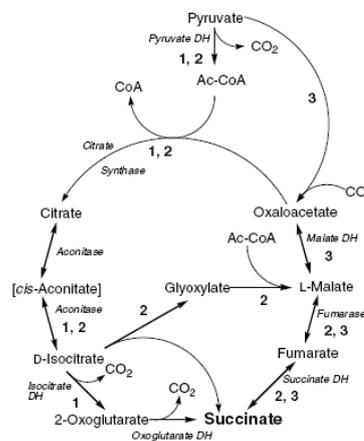


Figura 13 - Le tre vie potenziali di biosintesi dell'acido succinico

1.6.4 Acido fumarico

Intermediario del ciclo dei TCA, il suo accumulo durante la crescita aerobica di alcuni funghi come *Rhizopus spp* è riconosciuto da molto tempo. I fattori che possono influire sull'accumulo di fumarato sono stati approfonditi in particolare da Foster e Waksman (1939) e il loro lavoro ha costituito la base di tutti i successivi studi in questo campo. Sottolineando l'importanza di un alto rapporto carbonio-azoto e la necessaria presenza di ossigeno.

In particolare la conversione del glucosio in fumarato inizia solo dopo l'esaurimento della fonte azotata e solo dopo che il carbonio è stato utilizzato a fini della sintesi cellulare. L'acido fumarico è soprattutto un intermedio del ciclo di citrato, ma è anche coinvolto in altri percorsi metabolici.

Alla base sussiste un meccanismo di fissazione di una molecola di CO_2 catalizzato dalla piruvato carbossilasi (Overman e Romano, 1969), che porta alla formazione di acido ossalacetico (Osmani e Scrutton, 1985), quindi gli intermedi C4 del ciclo dell'acido citrico possono essere sfruttati durante la fase di crescita e quando la fonte azotata si esaurisce la fase di crescita si ferma. Il metabolismo del glucosio e la fissazione di CO_2 continuano e portano all'accumulo di acidi C4 (Romano *et al* 1967).

L'enzima piruvato carbossilasi, localizzato esclusivamente nel citosol, insieme con NAD-Malato deidrogenasi e la fumarinasi (presenti nel citosol e nei mitocondri), portano alla sintesi di acido fumarico in questo comparto cellulare. Studi svolti da Peleg *et al* (1989), hanno evidenziato che l'attività di questi enzimi è più elevata durante la produzione di acido fumarico. Studi con la marcatura del carbonio hanno dimostrato l'utilizzo simultaneo di entrambi i cicli, del citrato e quello riduttivo della piruvato carbossilazione (Fig.14). Si è anche riscontrato che l'aggiunta di cicloesamide eliminando isoenzima citosolico causa una forte diminuzione della quantità di acido fumarico prodotta da *R. oryzae*. Il ciclo della carbossilazione del

piruvato è stato studiato in modo più approfondito per la produzione di succinato, ma la comprensione dei diversi flussi metabolici coinvolti è ancora incompleta (McKinlay *et al*, 2007). L'alta produzione di acido fumarico è accompagnata generalmente, anche da altri acidi carbossilici come malico, lattico, acetico, succinico, e citrico (Rhodes *et al*, 1959; Carta *et al*, 1999).

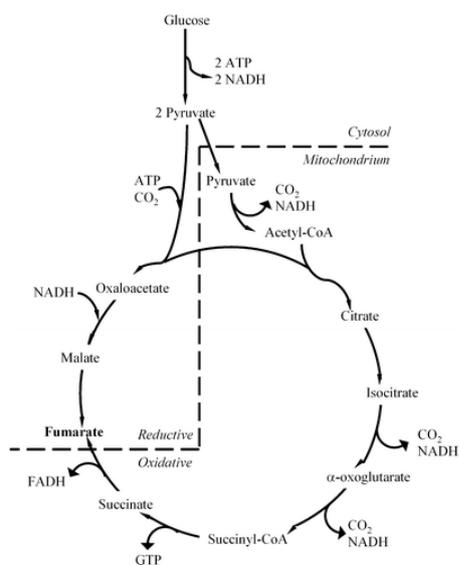


Figura 14 - Ciclo dell'acido citrico e ciclo riduttivo della carbossilazione entrambi portano all'accumulo di acido fumarico (adattato da Kenealy *et al* 1986).

Il rapporto tra i due percorsi non è 1:1 come suggerito dalla figura

Il meccanismo di trasporto dell'acido fumarico nei funghi non è stato ancora approfondito. Tuttavia, il trasporto di acido malico e degli altri acidi dicarbossilici, è stato studiato in lieviti come *Schizosaccharomyces pomb* (Corte-Real *et al*, 1989:), paragonabili per la produzione di fumarico ai funghi. L'adozione iniziale di acido malico è accompagnata dalla scomparsa di protoni extracellulare, ciò lascia supporre che la forma anionica dell'acido venga trasportata attraverso le proteine di

membrana. Dato che la presenza di acido fumarico sembra inibire l'assorbimento di acido malico, è stato suggerito che l'acido fumarico utilizzi lo stesso sistema di trasporto.

D'altra parte, questi studi hanno dimostrato che in forma indissociata l'acido entra lentamente nelle cellule per semplice diffusione, e il tasso di diffusione è influenzato inversamente dal pH: un aumento dell'acido indissociato con di conseguenza una diminuzione del pH, determina una riduzione della permeabilità della membrana cellulare con conseguente innalzamento del pH (Corte-Real e Leao, 1990).

1.6.5 Acido malico

Il meccanismo che porta alla produzione di acido malico è analogo a quello dell'acido fumarico ma più semplificato. Esso si può anche formare dal piruvato per via anaplerotica. Le reazioni anaplerotiche sono quell'insieme di reazioni che servono per rifornire il ciclo di Krebs degli intermedi sottratti in seguito alla sintesi di vari composti (glucosio da acido ossalacetico, acidi grassi e steroli da acido citrico, etc.) senza passare attraverso la formazione di Acetil-CoA.

1.6.6 Acido gluconico

Il processo di sintesi dell'acido gluconico è unico, in quanto si verifica interamente al di fuori della membrana citoplasmatica. Il primo stadio è catalizzato dalla glucosio ossidasi, che ossida β -D-glucopiranosio in D-glucono-1,5-lattone. L'idrolisi dell'acido gluconico dal lattone avviene spontaneamente in soluzione acquosa, ma il tasso di formazione è 6 volte superiore in presenza di gluconolattoneasi. (Jermyn, 1960). Tuttavia, questo secondo passo è relativamente importante, da un punto di vista pratico, infatti acido gluconico, D-glucono-1,5-lattone, e D-glucono-1,4-lattone raggiungono rapidamente un punto di equilibrio in

soluzione acquosa. Più importante è l'azione della catalasi, che catalizza l'eccessivo accumulo di perossido d'idrogeno (citotossico), formatosi dalla azione della glucosio-ossidasi, in acqua e in presenza di ossigeno molecolare.

L' enzima chiave in questo processo è la glucosio-ossidasi identificato per la prima volta in *Penicillium spp.* (Coulthard *et al*, 1945), poi purificato e caratterizzato in una ampia varietà di funghi. (Kusai *et al*, 1960; Pazur, 1966; Kelley e Reddy, 1986). Esso esiste come dimero di subunità identiche contenenti una molecola FAD per ogni subunità. Tale molecola viene ridotta nel corso dell'ossidazione del glucosio in acido gluconico, ed è la conseguente ossidazione del FAD ridotto da parte dell' ossigeno molecolare a generare il perossido di idrogeno (Gibson *et al*, 1964).

1.7 METABOLISMO DEGLI ACIDI GRASSI

La forma principale di conservazione dell'energia è rappresentata da acidi carbossilici con una catena idrocarburica composta da 4 a 36 atomi di carbonio (Moore, 1998). Questa catena può essere completamente satura o contenere uno o più doppi legami. La sintesi degli acidi grassi è un processo che richiede ATP ed equivalenti riducenti sotto forma di NADPH. Nei batteri e nei funghi, la funzione primaria è quella di fornire precursori per i lipidi di membrana.

Il palmitato (C16) è il precursore degli acidi grassi a catena più lunga, la catena viene allungata dal cosiddetto "sistema di allungamento degli acidi grassi" presente nel reticolo endoplasmatico liscio e nei mitocondri. L'ATP viene impiegato per la sintesi di malonil-CoA partendo da acetil-CoA catalizzata dall'acetil-CoA carbossilasi. Il malonil-CoA viene poi utilizzato ciclicamente dall'acido grasso sintasi per la condensazione di una catena carboniosa di 16 atomi, cioè fino a sintetizzare il palmitato. La tappa limitante la reazione di biosintesi è quella catalizzata dall'acetil-CoA carbossilasi. Il palmitoil-CoA, principale prodotto della sintesi degli acidi grassi, si comporta come potente inibitore retroattivo di questo enzima, invece il citrato si comporta come attivatore allosterico (Lodish *et al*, 1995). L'acido citrico fuoriesce dal mitocondrio ('navetta' del citrato) e giunge nel citoplasma della cellula qui si scinde di nuovo in Acetil-CoA (che rimane nel citoplasma) ed acido ossalacetico (che rientra dentro il mitocondrio) (Fig.15). In generale, quindi, possiamo affermare che all'interno del mitocondrio avviene la prima reazione del Ciclo di Krebs per permettere all'Acetil-CoA di arrivare nel citoplasma, dove agisce da substrato per la biosintesi degli acidi grassi. La sintesi è catalizzata da 2 enzimi specifici Acet per dare Malonil-CoA, e l'acido grasso sintasi, grande enzima catalizzante sette reazioni, ad ogni ciclo, aggiunge due atomi di carbonio dal lato del gruppo carbossilico dell'acetil-CoA che funge da substrato.

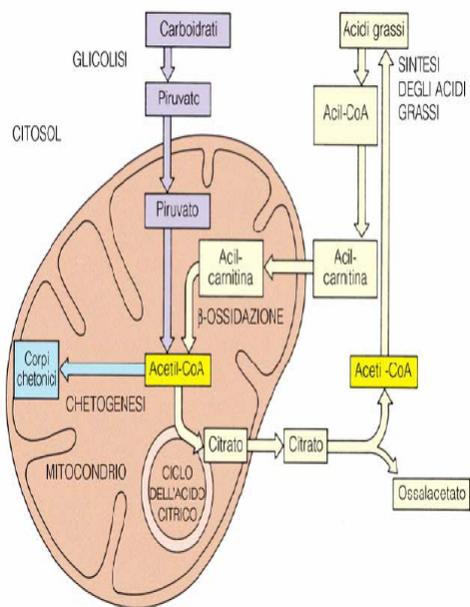


Figura 15 - Metabolismo degli acidi grassi

I due atomi di carbonio vengono aggiunti sotto forma di acido acetico e ricavati dalla scissione del malonil-CoA, dal quale il terzo carbonio si stacca sotto forma di CO_2 .il-CoA carbossilasi. Ad ogni ciclo, inoltre, vengono ossidate 2 molecole di NADPH.

Questo processo di allungamento non consuma ATP in quanto l'energia necessaria viene ricavata dalla rottura del legame ad alta energia del Malonil-CoA. Se come fonte di carbonio vengono utilizzati acidi grassi o acetato, l'acetil-CoA in eccesso induce il cammino della gluconeogenesi (formazione dei precursori metabolici della glicolisi attraverso la sintesi di Fru6P).

1.8 TRANSAMINAZIONE DEGLI AMINOACIDI

Il metabolismo dell'azoto prevede importanti reazioni quali la desaminazione e la transaminazione entrambe reazioni ossidative a carico degli aminoacidi (Rambelli, 1981). Con la prima reazione il gruppo amminico viene sostituito con un gruppo chetonico, con formazione di un chetoacido.

Le reazioni di transaminazione avvengono tra un aminoacido e un chetoacido e per azione delle transaminasi portano alla formazione, con trasferimento di gruppi, di un

nuovo amminoacido e un nuovo chetoacido. Nelle cellule esistono molti tipi di transaminasi le quali utilizzano α -chetoglutarato come accettore del gruppo amminico, ma divergono tra loro per la specificità nei confronti dell'amminoacido utilizzato (Moore, 1998). Le reazioni catalizzate da tali enzimi sono tutte facilmente reversibili (la loro costante di equilibrio, infatti, è molto vicina ad 1).

Tutte le transaminasi utilizzano lo stesso gruppo prostetico, il piridossal fosfato, forma coenzimatica della vitamina B6, quale trasportatore temporaneo del gruppo amminico (Nelson *et al*, 2000).

Il piridossal fosfato è legato covalentemente, con un il gruppo amminico ϵ di un residuo di lisina, in assenza del substrato (l'amminoacido). In presenza dell'amminoacido il suo gruppo amminico α si sostituisce a quello ϵ della lisina. La nuova base di Schiff che si è venuta a creare rimane saldata al sito attivo dell'enzima attraverso la formazione di legami multipli non covalenti. Essa perde un protone dal carbonio α , formando un intermedio, la cui riprotonazione determina la produzione di una chetina.

Una successiva reazione di idrolisi determina il distacco di un α -chetoacido e la formazione di piridossamina fosfato. La seconda parte della reazione si svolge in

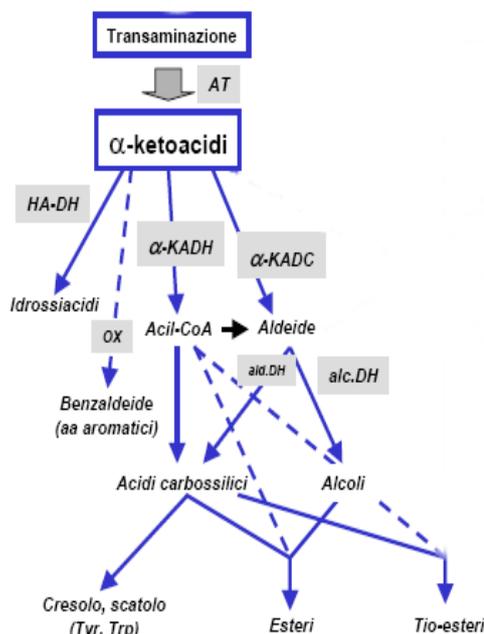


Figura 16 - Schema transaminazione
Yvon e Rijnen (2001)

modo diametralmente opposto: un α -chetoacido si lega alla piridossamina fosfato e successivamente si stacca un nuovo amminoacido e si rigenera il piridossal fosfato.

1.9 AZIONE ENZIMATICA A CARICO DELLA PARETE CELLULARE

Durante il processo infettivo il patogeno produce composti protonici, acidi organici, carbonio inorganico e composti ammoniacali che tendono a modificare il pH ambientale (Prusky e Yakoby, 2003; Claessens *et al*, 2006); ciò comporta una migliore sintesi e secrezione enzimatica da parte del patogeno e una disattivazione delle barriere difensive dell'ospite (PGIPs, PLIPs, PRIs e XGIPs) (Ham *et al*, 1997). Come descritto precedentemente il fungo è in grado, attraverso il suo metabolismo primario, di produrre un'ampia gamma di acidi organici e di trasportarli al di fuori della cellula attraverso sistemi di trasporto attivo e passivo. La migrazione extracellulare di questi composti è in grado di modulare il pH del mezzo di sviluppo, ma è anche accompagnata un'intensa attività enzimatica atta a demolire il tessuto ospite determinando la diffusione tra l'altro di molecole a carattere acido che vanno ad incrementare e a sostenere tale modulazione. Durante il processo patogenetico, la parete cellulare rappresenta la prima linea difensiva dell'ospite, ma anche, data la sua composizione in polisaccaridi, una importante fonte nutrizionale per il patogeno stesso, (Gomathi e Gnanamanickam, 2004; Wu *et al*, 1997). La degradazione enzimatica presenta un'alta specificità in relazione al patogeno, al pH, alla temperatura e alla composizione chimica della parete cellulare nelle differenti specie e cultivar ((Cooper, 1983; Prusky e Yakoby, 2003; Bailey *et al* 1992). Esiste, per esempio, una correlazione tra pH e temperatura a seconda dell'enzima interessato (Naidu e Panda, 2003; Rao *et al*/1998; Manteau, 2003).

Sintesi e secrezione enzimatiche sono influenzate da:

- il pH ambientale esterno all'ospite;
- il range di pH nell'ambito del quale il patogeno agisce;
- la temperatura;

La parete cellulare contiene gruppi funzionali, come carbossilati, fosfati, amminici che possono essere protonati o deprotonati in relazione al pH circostante, assumendo una carica variabile sempre in relazione al pH.

Alcuni studi, condotti su diversi substrati artificiali di crescita, a diversi pH, hanno evidenziato una diversa secrezione di specifici enzimi pectolitici da parte di funghi fitopatogeni (Maccheroni *et al* 2004).

<i>Enzima</i>	<i>pH ottimale</i>	<i>Temperatura ottimale (°C)</i>
PGs	4.5-5.5	25-40
PEs	6-9	25-40
PLs	4-9	25-40
Cellulasi	4-5.5	25-40
Proteasi	2.5-11	20-40

Tabella 2 - Esempi di CWDE e pH d'azione

Quindi in relazione al range di pH i patogeni possono essere in grado di alcalinizzare l'ambiente (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. coccoides*, *Alternaria alternata*) o di acidificarlo (*P. digitatum*, *P. italicum*, *P. expansum*, *B.cinerea*).

I principali enzimi degradativi sono le Cellulasi, Pectinasi, Xylanasi, Xylosidasi, Arabinasi, Glucosidasi, Glucanasi, Galattosidasi, Proteasi, Fosfolipasi, Cutinasi, Laccasi, Chitinasi, ecc.

Il contatto fra gli enzimi extracellulari prodotti dal patogeno e la parete cellulare dell'ospite rappresenta la prima interazione molecolare fra ospite e patogeno, con conseguente variazione sia del tipo che del bilancio nella relazione fra i due organismi (Cooper 1983). La produzione dei diversi enzimi avviene sequenzialmente: dapprima sono prodotti quelli necessari per la penetrazione, poi quelli utili per la colonizzazione (Nasi, 2001) La sequenza di produzione enzimatica, la velocità di

sintesi, la concentrazione e la diffusione delle molecole enzimatiche in prossimità del sito di secrezione sono aspetti fondamentali del processo di patogenesi ed essenziali requisiti del patogeno.

Il patogeno ha sviluppato un apparato biochimico in grado di percepire le caratteristiche ed i cambiamenti dello sviluppo delle pareti cellulari, congiuntamente ad un sistema di regolazione capace di controllare e coordinare la produzione degli enzimi più adatti.

1.9.1 Principali enzimi coinvolti nella degradazione della parete cellulare

Generalizzando due tipi di enzimi sono frequentemente presenti: il primo idrolizza la cuticola; il secondo degrada la cellulosa e i carboidrati trasformandoli in zuccheri semplici (Bailey *et al*/1992).

Molti funghi producono enzimi attivi sui diversi componenti della parete cellulare e tra questi sono particolarmente importanti (soprattutto per la funzione macerante del tessuto e per gli effetti necrotici sul simplasto) gli enzimi pectolitici che spezzano i legami delle catene lineari delle pectine (Nasi, 2001; Walton, 1994).

Sono classificati in base a:

- meccanismo d'attacco del polimero;
- substrato sul quale agiscono;
- sito d'azione lungo la molecola: interno (endo) o terminale (eso)
-

La macerazione dei tessuti, sintomatologicamente espressa in forma di marciumi molli, è la conseguenza più rilevante dell'attacco dei funghi dotati di una forte attività pectolitica specialmente di tipo endo. La macerazione consiste nella separazione delle cellule per digestione del cemento intercellulare e comporta danno e morte delle cellule.

1.9.2 Enzimi pectolitici

Tra gli enzimi pectolitici, sono inclusi :

- pectinasi (PG) e poligalatturonasi (PGA) (EC 3.2.1.15 e 3.2.1.58);
- pectin liasi (PL) (EC 4.2.2.10);
- pectin esterasi (PE) (EC 3.1.1.11);

Le pectine degradate dalle PGs e dalle PLs portano alla formazione di due differenti frammenti: le prime alla formazione di acido galatturonico, mentre le seconde a esteri uronici, insaturi (D'hallewin *et al*, 2004). Le PGAs vengono distinte in endo-poligalatturonasi (EC 3.2.1.15) e eso-poligalatturonasi (EC 3.2.1.58) (Collmer *et al*, 1988; Gomathi e Gnanamanickam, 2004).

L'importanza di questo enzima è stata messa in evidenza da alcune prove condotte su *C. lindemuthianum* in quanto la virulenza di questo fungo è legata alla maggiore o minore produzione di PGs.

Altri enzimi altamente degradativi sono le Pectin Liasi (PL) (EC 4.2.2.10), (Strange, 2003), in particolare le endo-PLs rompono i legami pectinici (β-eliminazione) portando alla formazione di esteri uronici insaturi.

Hanno peso molecolare tra 23-28 kDa con un optimum di pH tra 4 e 9.

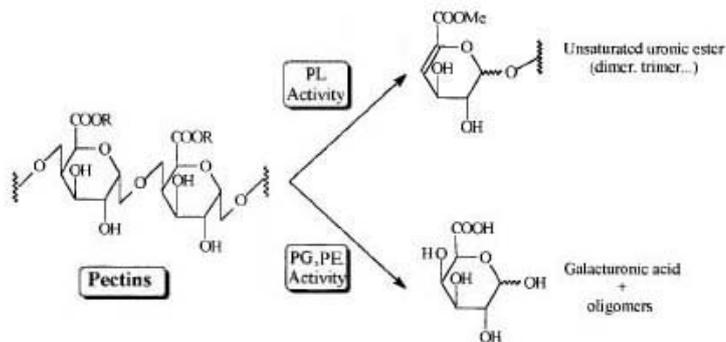


Figura 17 - Azione delle poligalatturonasi e delle pectin liasi

1.9.3 Emicellulasi e cellulasi

Le catene di xyloglucano, che costituiscono le emicellulose vengono degradate dall'endo-1,3(4)- β -glucanasi (EC 3.2.1.6), (enzima emicellulosolitico), mentre le cellulasi [endo-1,4- β -D-glucanasi] (EC 3.2.1.4) sono gli enzimi in grado di idrolizzare i polisaccaridi con legame 1-4- β -glucano, quindi di convertire la cellulosa componente della parete cellulare delle piante, in glucosio (Brummell *et al* 1997). L'optimum di pH per la cellulasi è compreso tra 4 e 5.5 e hanno un peso molecolare di 35 kDa. Spesso, quando i tessuti sono maturi, la cellulasi non è in grado di degradare la cellulosa, perché viene limitata dalla presenza della lignina.

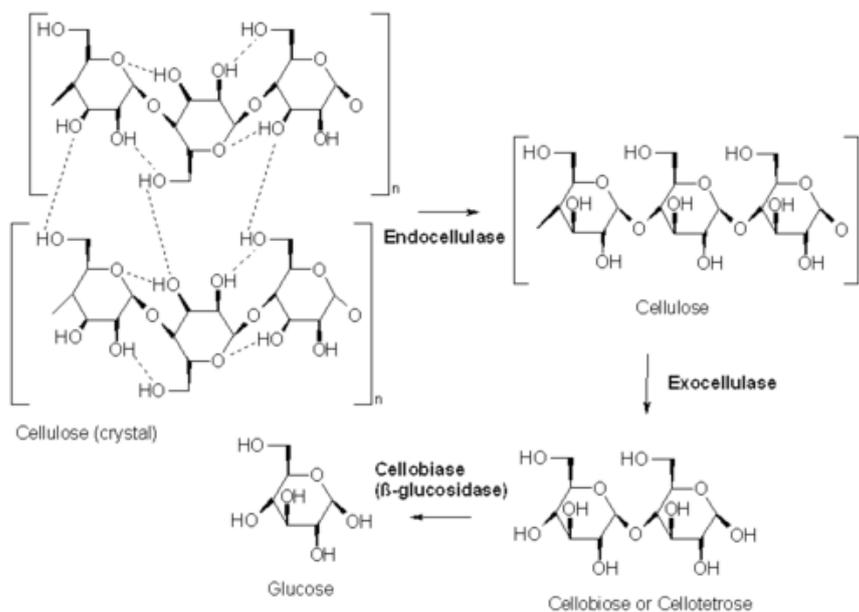


Figura 18 - I tre tipi di reazione catalizzate dalle cellulasi: rottura delle interazioni non covalenti presenti nella struttura cristallina di cellulosa (endo-cellulasi).
Idrolisi delle singole fibre di cellulosa per rompere in piccoli zuccheri (exo-cellulasi).
Idrolisi dei disaccaridi e tetrasaccoridi in glucosio (beta-glucosidasi)

1.9.4 Enzimi proteolitici

Per quanto riguarda gli enzimi degradativi delle proteine che costituiscono circa il 15% della parete cellulare, si fa riferimento alle proteasi. Il loro ruolo nella patogenicità e i fattori di virulenza non ha ricevuto le attenzioni date ad altri enzimi e solo negli ultimi anni si è riscontrata una inversione di tendenza (Strange, 2003). Sono un ampio gruppo di enzimi idrolitici delle proteine e giocano un ruolo importante nella degradazione della parete cellulare (Gregori *et al*, 2003), "gestiscono" una vastità di processi fisiologici e metabolici a "cascata" (Rao *et al*, 1998). Le proteasi giocano quindi un ruolo cruciale, ad esempio, la richiesta di proteasi per la sporulazione e germinazione fungina è stata messa in evidenza con l'impiego di inibitori della proteasi (Chilosi *et al*, 2000).

Catalizzano tutti i tipi di idrolisi delle proteine, per cui occupano una posizione importante in tutte le reazioni in cui i patogeni coinvolti degradano le pareti delle cellule vegetali, e sono classificate in eso-peptidasi e endo-peptidasi a seconda del sito di azione. Le endo-peptidasi sono largamente diffuse tra i patogeni fungini e sono rappresentate dalle serin proteasi, cysteine proteasi, metalloproteasi e aspartic proteasi. I funghi producono una vasta gamma di enzimi proteolitici (proteasi acida, neutra e alcalina), con un ampio range di pH, tra 2.5 e 11 e con un peso molecolare compreso tra 10 e 45 kDa (Hedstrom, 2002; Rao *et al*, 1998; Gregori *et al*, 2003). Le proteasi sono responsabili di processi molto complessi riguardanti la normale fisiologia della cellula, ma sono anche coinvolte in reazioni che portano a manifestazioni fitopatologiche.

A causa di questa grande diversità di forme, per il momento, si conosce veramente poco sul loro ruolo nella patogenesi. Non è ancora chiaro se intervengano direttamente sulla degradazione delle cellule vegetali oppure servano al fungo per attivare altri enzimi, poi coinvolti nell'idrolisi delle pareti cellulari; in altre parole non

sempre è stato provato il loro reale coinvolgimento nella patogenesi e nel determinare la sintomatologia.

1.10 REGOLAZIONE GENICA ALLA BASE DEL MECCANISMO DI MODULAZIONE DEL pH

L'abilità del patogeno di modulare il pH del mezzo di crescita è influenzata dalle condizioni di "accoglienza" del ospite, perciò lo stesso patogeno può comportarsi in maniera diversificata a seconda degli ospiti. La ricerca di un singolo gene in grado di influenzare l'attacco del patogeno non ha dato grandi risultati, presumibilmente a causa della complessità e molteplicità dei fattori coinvolti nel processo infettivo, cosicché una combinazione di geni può essere attivata in maniera specifica su ciascun ospite (Rogers *et al*, 2000). Wassenaar e Gaastra (2001) hanno proposto una definizione per i fattori di virulenza in base alla loro funzione durante il processo infettivo.

- **Classe I:** i veri geni di virulenza che danneggiano direttamente l'ospite, non sono presenti nei ceppi non patogeni e sono frequentemente bersaglio nello sviluppo dei meccanismi di resistenza specifica; codificano fattori di virulenza a basso e ad alto peso molecolare come tossine, ed enzimi che attaccano l'integrità strutturale del tessuto ospitante;
- **Classe II:** geni che codificano fattori di virulenza che regolano l'espressione dei geni della Classe I;
- **Classe III:** geni che compromettono le difese dell'ospite, le strutture citoscheletriche, specifici sistemi di trasporto, sistemi di regolazione del pH, e altri fattori necessari al patogeno per fronteggiare in maniera efficace l'ambiente ostile all'interno dell'ospite.

L'espressione dei geni coinvolti nei meccanismi di modulazione del pH viene regolata da l'azione integrata di sette geni: *pacC*, *paIA*, *paIB*, *paIC*, *paIF*, *paIH* e *paII* (Li e Mitchell 1997; Peñalva e Arst, 2002; Tilburn *et al* 1995).

L'evidenza suggerisce che tutte le proteine *Pal* agiscono a monte del fattore di trascrizione *pacC* e regolano sia l'attività di trasduzione che di trasformazione.

Si possono trovare tre forme di *pacC*, hanno masse molecolari di 72 kDa (*PacC*⁷²), 53 kDa (*PacC*⁵³) e 27 kDa (*PacC*²⁷). La *PacC*⁷² predomina in condizioni acide, e non ha alcun ruolo nella regolazione della trascrizione (Orejas *et al*, 1995). In condizioni alcaline, sono necessari due stadi proteolitici per attivare la *PacC*⁷²: in primo luogo, *PacC*⁷² viene tagliata a *PacC*⁵³, questa proteolisi è dipendente dal pH ed è presumibilmente effettuata dalla *PaIB* proteasi. In secondo luogo, indipendentemente dal pH, *PacC*⁵³ viene convertita a *PacC*²⁷, responsabile della repressione dei geni espressi in condizioni di pH acido e per l'espressione di geni espressi in pH alcalino, compresi la stessa *pacC* (Caracuel *et al*, 2003; Mingot *et al*, 1999). In condizioni ambientali acide, la *PacC* citosolica rimane inaccessibile per proteolisi. In risposta al segnale dipendente dal pH, il complesso *Pal* è in grado di attivare la *PacC*. Questo meccanismo di regolazione è stato ampiamente studiato per il genere *Aspergillus*, ma è anche in molti altri funghi (Tab.4).

Genus and species	Accession
<i>Aspergillus oryzae</i>	AB035899
<i>A. niger</i>	X98417
<i>A. nidulans</i>	Z47081
<i>A. fumigatus</i>	AF451286
<i>A. parasiticus</i>	AAK98616
<i>Penicillium chrysogenum</i>	U44726
<i>P. echinulatum</i>	AF536982
<i>P. expansum</i>	AY225524
<i>Fusarium oxysporum</i>	AAM95700
<i>Colletotrichum sublineolum</i>	AF260325
<i>C. gloeosporioides</i>	AF539700
<i>Gibberella moniliformis</i>	AY216461
<i>G. fujikuroi</i>	AJ14259
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	AY005467
<i>Neurospora crassa</i>	AF304568
<i>Trichophyton rubrum</i>	AF363788
<i>Acremonium chrysogenum</i>	AJ251521
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AAN06812
* <i>Yarrowia lipolytica</i>	X99616
* <i>Candida albicans</i>	AAD51714
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S43129

Tabella 3 - Funghi in cui è stata individuata la PacC e relativo numero di adesione

(Prusky e Yakoby 2003)

1.10.1 Effetto del pH ambientale sui fattori di patogenicità

Gli enzimi degradativi della componente peptica come, pectato liasi (PL), poligalatturonasi (PG) e pectin-metilesterasi sono regolati da geni appartenenti alla Classe I in quanto degradano direttamente il tessuto vegetale. Poiché la maggior parte degli agenti patogeni possiede un ampio potenziale espresso da svariati enzimi, è importante sottolineare che solo pochi di questi possono essere considerati come veri e propri fattori di patogenicità. Ad esempio nel caso di *C. gloeosporioides* (agente di marciume di numerosi frutti) è nota l'attività di pectin liasi A, pectin metil esterasi e di pectato liasi B durante la fase di colonizzazione del tessuto ospite (Prusky *et al*, 1989; Yakoby *et al*, 2000; Bowen *et al*, 1995; Templeton *et al.*, 1994, Ortega, 1996). Finora, solo il gene *pe/ B* è stato considerato come vero e proprio fattore di virulenza, in quanto ha dimostrato la sua capacità di aumentare la

virulenza quando espresso in *C. magna*, e di ridurre la virulenza se disturbato in *C. gloeosporioides* (Yakoby et al., 2000).

In molti casi la distruzione e la modifica di un solo enzima o la combinazione di alcuni, non determina cambiamenti nella virulenza del fungo. L'elenco degli enzimi degradativi della parete cellulare (CWDE) in grado di rappresentare un vero e proprio fattore di virulenza comprende anche il gene *PacA* a cui è legata la produzione di endoPG in *Aspergillus flavus* (Shieh et al 1997). In aggiunta la distruzione del gene per le endoPG *Bcpg1* in *B.cinerea* determina una riduzione dello sviluppo della lesione. Molti agenti patogeni possono svilupparsi in un ampio range di pH, e sono noti per possedere un sistema di regolamentazione che assicura che gli enzimi, ma anche altri prodotti, sino secreti solo a determinati livelli di pH, in modo che la loro funzione venga espletata in maniera efficace. Un cambiamento di pH ambientale durante l'attacco fungino rappresenta un fattore critico per l'espressione dei fattori di patogenicità (Eshel et al, 2002). Analisi delle endoglucanasi *Aak1* di *A. alternata* indicano che la massima espressione genica si ha con valori di pH superiori a 6, vale a dire a valori simili a quelli riscontrati nei tessuti infetti in cui è stata osservata la massima virulenza del patogeno (Eshel et al., 2002). Nel caso del gene *pel B* e delle relative PL codificate da *C. gloeosporioides* espressione e secrezione avvengono solo a pH superiori a 5,7 valore simile a quello presente nel tessuto in decomposizione, al contrario, l'espressione e la secrezione delle PG vengono fortemente limitate da valori bassi di pH, quando il frutto è resistente agli attacco fungino.

Similmente l'espressione di *pg1* e *pg5* in *Fusarium oxysporum* viene controllata da condizioni acide (Caracuel et al 2003); su pomodoro in condizioni di pH acido (5,5-6) mutanti *pacC^c* mostrano una significativa riduzione della virulenza, ad indicare una regolazione negativa di tale gene e della sua importanza per l'attacco patogeno in condizioni acide.

In *B. cinerea* il gruppo delle endoPG viene espresso in maniera differenziata in relazione al pH, tuttavia il ruolo della PacC nel loro controllo non è stata ancora stabilito. Analisi dei livelli di trascrizione delle PG (*pepg1*) in *P. expansum* hanno mostrato un elevato accumulo a valori di pH 3.5-4.0 e una minore espressione a valori di pH superiori a 5.0 (Prusky *et al*, 2003).

Altri fattori di virulenza, come l'acido ossalico, le laccasi e le proteasi, rispondono alla regolazione del pH e si esprimono principalmente con valori compresi tra 3,1 e 6; valori, che sono vicini a quelli medi del potenziale tessuto ospite (Manteau *et al* 2003; Movahedi e Heale, 1990).

Per le endoPGs di *B. cinerea*, e *S. sclerotiorum*, e per le glucanasi di *A. alternata*, si è ipotizzato che la presenza di questi grandi gruppi di geni sia collegata alla scelta dell'ospite da parte del patogeno. Dallo studio della differente espressione delle endoPG prodotte da *B. cinerea* su vari frutti, caratterizzati da diversa acidità, si è visto che la regolazione del gene *Bcpg2* è negativamente influenzata dal basso pH del tessuto (Wubben *et al* 2000), ciò potrebbe spiegare la mancanza di espressione ad esempio su frutti di melo; viceversa l'espressione del gene *Bcpg3* è stata indotta sia in coltura liquida a basso pH, sia su mela. Manteau *et al* (2003) hanno esaminato due isolati di *B. cinerea* provenienti rispettivamente da acini d'uva (pH 3,5) e pomodoro (pH 6), quest'ultimo era caratterizzato da un maggiore sintesi di PG, mentre il primo da un'alta concentrazione di laccasi. Questa variabilità di induzione e di secrezione enzimatica in risposta al pH ambientale, non avviene solo quindi a livello dell'ospite, ma anche dell'isolato, a dimostrare l'importanza di un specifico sistema di controllo da parte dell'ambiente.

1.10.2 Effetto del patogeno sul pH ambientale

La presenza di molteplici geni codificanti enzimi che possono degradare le barriere fisiche dell'ospite, fornisce una sorta di vantaggio evolutivo al patogeno. Sebbene questi geni manifestano una sovrapposizione di attività, la loro diversificata regolazione ed espressione consente al patogeno di indurre l'espressione del gene più appropriato in relazione all'ambiente di sviluppo.

Nel corso di interazione con l'ospite il patogeno è in grado di alterare localmente il pH, adattando il proprio corredo enzimatico e modulando il livello di patogenicità proporzionalmente alla sua efficienza nel cambiare il pH.

La misura della modifica del pH nel tessuto vegetale dipende dalla capacità patogenica del patogeno in relazione ai diversi ospiti (Prusky *et al*, 2001). Questa capacità è stata descritta in passato soprattutto per *S. sclerotiorum*, ma tali osservazioni sono state più di recente estese ad altri agenti patogeni, come *Colletotrichum spp.*, *Al. alternata*, *B. cinerea*, *P. expansum*, *P. digitatum* e *P. italicum* (Eshel *et al*, 2002; Manteau *et al*, 2003; Prusky *et al*, 2001, 2003; Rollins e Dickman, 2001). Baetman e Beer (1965) per primi hanno suggerito la stretta relazione tra pH e patogenicità, affermando che l'acidificazione del tessuto durante l'attacco patogeno ha lo scopo di regolare a livello apoplastico il pH, per renderlo più adeguato all'azione enzimatica a carico della parete cellulare. Altri patogeni fungini come *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *B. cinerea* (Prusky *Et al.*, 2003) e *S. sclerotiorum* (Bateman e Beer, 1965; Rollins E Dickman, 2001) utilizzano l'acidificazione del tessuto ospite per il loro attacco, grazie all'accumulo di acidi organici e secrezione di H⁺.

La capacità di *F. oxysporum* di acidificare il pH extracellulare è stata dimostrata attraverso l'attivazione H⁺-ATPasi di membrana (Brandao *et al.* 1992). Questo fungo è conosciuto anche per la secrezione di acido fusarico (FA), il quale è direttamente coinvolto nella patogenesi (Davis, 1969). La modalità di azione non è chiara, ma

sembra che aiuti l'espressione dei geni "acid" importanti per la virulenza (Caracuel *et al*, 2003). In *S. sclerotiorum* e *B. cinerea* la diminuzione del pH è legata alla secrezione di quantità significative di acido ossalico, mentre acido gluconico e citrico sono secreti soprattutto da *Penicillium* (Prusky *et al*, 2003) e *Aspergillus* (Ruijter *et al*, 1999).

Nel caso di *P. expansum*, la trascrizione di *pepg1* è significativamente superiore a pH attorno a 3,5-4, rispetto a quella ad un più alto livello di pH. L'espressione pH-acido specifica è stata trovata anche in *S. sclerotiorum* e in *B. cinerea* (Wubben *et al* 2000). Tuttavia, l'acidificazione ambientale non interessa solo l'espressione genica. È stato suggerito che l'acido ossalico agisca direttamente come un fattore di virulenza nel caso di *S. sclerotiorum*, e mutanti privi di secrezione di ossalato sono stati classificati come non-patogeni (Godoy *et al*, 1990).

Acido ossalico, citrico e gluconico, mostrano un'intensa attività Ca^{2+} chelante, che indebolisce la parete cellulare alterando il suo equilibrio minerale e influenzando sulla stabilità delle membrane (Batemen e Beer 1965; Cunningham e Kuiack 1992). Inoltre l'ossalato può creare effetti tossici inibendo indirettamente l'attività delle polifenolossidasi. (Magro *et al*, 1984; Marciano *et al*, 1983).

1.11 METABOLITI SECONDARI

I metaboliti "secondari" sono normalmente associati al periodo di sporulazione. L'aggettivo secondario è legato al fatto che normalmente vengono secreti dopo il periodo di moltiplicazione e di crescita cellulare, in opposizione ai metaboliti primari formati nel corso di queste fasi e costituenti componenti essenziali per il processo patogenetico (Burow *et al*/1997, Sekiguchi 1977).

Metabolismo primario e secondario coesistono nello stesso tempo e nella stessa cellula e formano intermediari differenti. Per molti aspetti comunque il metabolismo secondario presenta maggiori complessità biochimiche. Alcuni metaboliti derivano direttamente dal glucosio, senza scissione della catena carboniosa, come l'acido cogico prodotto da *Aspergillus* spp (Turner 1971), ma la maggior parte si origina da un ristretto numero di intermedi presenti nei processi metabolici visti precedentemente.

L'acetil-CoA rappresenta forse l'intermedio di maggiore rilevanza come precursore della sintesi di terpeni, steroidi, acidi grassi e polichetoni. Fosfoenolpiruvato ed eritrosio-4-fosfato sono coinvolti nella sintesi dei composti aromatici secondari prodotti attraverso la via dell'acido scichimico, altri metaboliti derivano da altri aminoacidi non aromatici.

Vengono generalmente divisi in tre gruppi: metaboliti che attivano la sporulazione (ad esempio i derivati dell'acido linolenico prodotti da *A. nidulans*), pigmenti necessari per le strutture di sporulazione (melanina) e metaboliti tossici definiti come "micotossine" (Adams e Yu,1998).

1.11.1 Metaboliti secondari come fattori di sporulazione

La produzione di metaboliti secondari di solito inizia in prossimità della fase stazionaria e si prolunga nelle fasi successive (Burow *et al*/1997).

I primi studi in materia evidenziarono che le condizioni ambientali richieste per la sporulazione e il metabolismo secondario spesso erano simili se non più critiche rispetto a quelle necessarie per la crescita vegetativa. Anche se si ritiene che i metaboliti secondari siano essenziali per la sporulazione, in realtà esistono molti esempi in cui la sporulazione non è accompagnata dalla loro produzione, per esempio, mutanti di *P. urticae* per la produzione di patulina (Sekiguchi 1977) ed mutanti di *A. nidulans* per sterigmatocisteina (Shimizu e Keller 2001). Inoltre, alcuni metaboliti come brevianamide A e B prodotte da *P. brevicompactum* appaiono solamente dopo la formazione dei conidi (Bird *et al* 1981). Recenti studi sulla produzione di sterigmatocisteina da parte di mutanti di *A. nidulans*, hanno indicato un calo nella produzione di spore asessuate (Ramaswamy 2002, e Sim 2001). Alcuni metaboliti sembrano influenzare la differenziazione morfologica del patogeno, altri ancora i sono in grado di influire sulla sporulazione asessuata o sessuata di altri funghi (Hadley e Harrold. 1958, Park e Robinson 1969).

La produzione di butyrolactone I da parte di *A. terreus* aumenta la ramificazione ifale e la sporulazione, influenzando la produzione di un altro metabolita da parte del fungo (Lovastatin) (Schimmel *et al*/1998).

In *A. nidulans* la produzione endogena di derivati dell'acido oleico e linolenico (chiamati "psi factor") regola il rapporto di spore asessuate e sessuali in (Calvo *et al* 2001, Champe e El-Zayat 1989).

1.11.2 Pigmenti

Tra i pigmenti fungini normalmente associati alle strutture di sviluppo, le melatonine sono quelle più diffuse. Sono pigmenti di colore scuro derivati dalla polimerizzazione ossidativa di composti fenolici, e sintetizzate durante la fase di formazione delle spore per deposizione sulla parete cellulare. La biosintesi di melanina è stata studiata in particolare nei funghi patogeni, dove il pigmento non solo contribuisce alla sopravvivenza della spora fungina proteggendola dall'effetto nocivo dei raggi UV, ma è anche un importante fattore di virulenza.

In *C. lagenarium*, la biosintesi di melanina è stata associata alla formazione degli appressori (Takano *et al* 2000), strutture di infezione richieste per penetrazione dell'ospite, qualsiasi danneggiamento nella loro formazione può ridurre la virulenza del patogeno. In *A. alternata*, la deposizione di melanina è coinvolta anche nello sviluppo delle spore, mutazioni genetiche a carico del gene coinvolto nella sua biosintesi (*brm2*) determinano la formazione di spore di ridotto diametro e più sensibili ai raggi UV rispetto a ceppi non mutati (Kawamura *et al*/1999).

1.11.3 Micotossine

La relazione tra produzione di micotossine e sporulazione è stata documentata in diversi generi, ad esempio nel caso *A. parasiticus* alcuni trattamenti chimici inibenti la sporulazione, interferiscono sulla formazione delle aflatossine (Reiß 1982). In *A. parasiticus* e *A. nidulans* trattamenti con inibitori della biosintesi della poliammide interferiscono sia sulla sporulazione sia sulla produzione di aflatossine e sterigmatocisteina (Guzman-de-Pen~a *et al*/1998).

Sekiguchi e Gaucher (1977) riportato che mutanti di *P. urticae* bloccati nella fase iniziale del processo di formazione dei conidi, producono livelli marcatamente inferiori di patulina. Questo studio suggerisce un effetto indiretto della

sporulazione sulla biosintesi di patulina, mentre al contrario mutazioni a carico della biosintesi della patulina non hanno effetto sulla formazione dei conidi.

Le micotossine sono un ampio gruppo di sostanze che differiscono notevolmente tra loro per la struttura chimica, sono steroidi, carotenoidi, alcaloidi, peptidi ciclici e cumarine. Vengono formati a partire da svariati processi metabolici, anche se spesso la via di biosintesi inizia dalla condensazione dei gruppi acetilati e malonilati di polichetoni. I carotenoidi possono determinare il colore delle colonie fungine, alcuni alcaloidi peptici e cumarine sono inclusi tra le micotossine per i loro effetti nocivi negli animali superiori.

Comunque nonostante alcuni esempi, nella maggior parte dei casi, nel processo infettivo, si ignora quale ruolo giochino questi metaboliti tossici. Sono state fatte diverse ipotesi sulla loro reale funzione, alcuni studi evidenziano che la loro sintesi viene attivata quando il substrato è ormai in esaurimento, altri dimostrano come essa sia legata alla necessità di prevenire l'accumulo eccessivo di composti possibilmente dannosi per il fungo stesso come acetati e manolati (Northolt e Bullerman, 1982).

1.11.4 Fattori che influenzano la formazione di micotossine

Le condizioni necessarie per la germinazione delle spore, la crescita del fungo e la tossinogenesi possono anche essere diverse.

La sintesi di tossine da parte dei miceti dipende:

- da **fattori genetici**: vale a dire il ceppo d'appartenenza, non tutti i ceppi di una specie potenzialmente produttrice di tossine hanno la stessa capacità di produrle; per l'*A. flavus*, per esempio, solo il 30-40% di ceppi è realmente in grado di secernere aflatossine;
- dall'**ambiente di sviluppo**: le condizioni ottimali di produzione delle micotossine non sono obbligatoriamente le stesse di sviluppo dei miceti. La sintesi di tossine

richiede, in particolare, delle condizioni di temperatura più restrittive talvolta sensibilmente più basse, ed una maggiore attività termodinamica dell'acqua

Tutto ciò significa che se si è in presenza di un fungo potenzialmente tossigeno, non si avrà necessariamente da parte dello stesso la loro secrezione. Inoltre uno stesso micete può elaborare tossine diverse a temperature differenti: è il caso di *A. ochraceus* che a 25°C produce ocratossine, ma a 20°C acido penicillico.

La presenza di ossigeno è un altro fattore importante, anche se i funghi possono crescere a concentrazioni di O₂ molto basse (< 4%), l'esposizione all'aria è condizione particolarmente favorevole non soltanto alla crescita dei miceti ma anche alla tossinogenesi. Ad esempio la produzione di patulina e acido penicillico, viene fortemente ridotta dai bassi livelli di ossigeno mentre la crescita del micelio non viene influenzata negativamente (Northolt 1979). D'altro canto la produzione di aflatossine viene ridotta da concentrazioni di ossigeno al di sotto dell'1% (Landers *et al*/1967).

La composizione del substrato e la concentrazione di zuccheri e lipidi o anche la presenza di alcuni microelementi come lo zinco possono favorire la sintesi di metaboliti tossici.

Le capacità tossinogene delle specie del genere *Penicillium* sono conosciute dal 1913, quando venne isolato per la prima volta l'acido penicillico da colture di *P. puberulum* Bain e da allora, le segnalazioni relative a ceppi di *Penicillium* in grado di determinare un accumulo di micotossine in numerose matrici vegetali, si sono susseguite abbastanza frequentemente.

Nell'ambito del genere *Penicillium* diverse sono le specie micotossigene così come *P. crustosum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. viridicatum*, *P. comune*, *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, ed *P. verrucosum*.

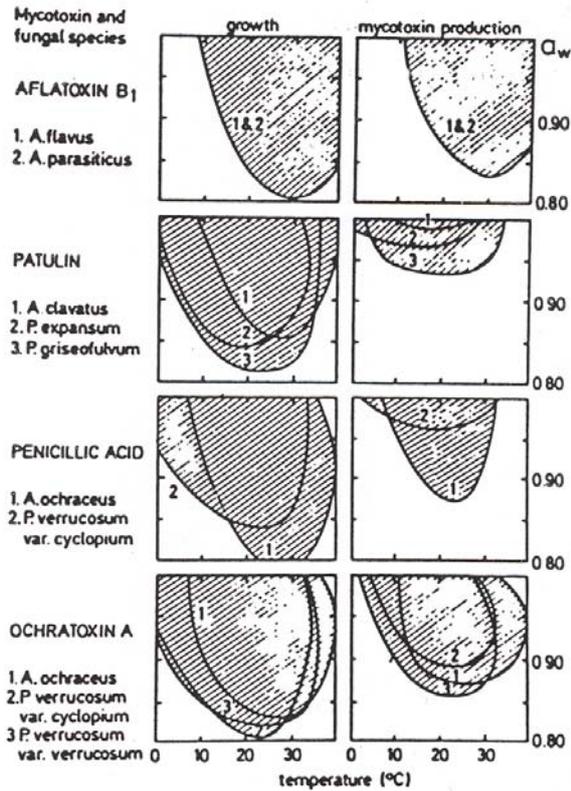


Figura 19 - Condizioni di temperatura e attività dell'acqua (a_w) favorenti la crescita e la produzione di micotossine da parte di alcune specie (Northolt 1979)

Per questi funghi è stata documentata ampiamente la produzioni di: citrinina (CIT), acido ciclopiazonico (CPA), ocratossina A (OA), patulina (PAT), acido penicillico (PIA), penitrem A e roquefortina C (RQC) (Frisvad e Thrane 2002).

Nello specifico in coltura pura *P. expansum* è in grado di produrre circa 50 metaboliti secondari diversi come: acido ciclopiazonico, chetoglobosina A, e C, citrinina, expansolide A, e B, acido micofenolico, ocratossina A, penitrem A, roquefortina C, rubratossina B, acido penicillio.

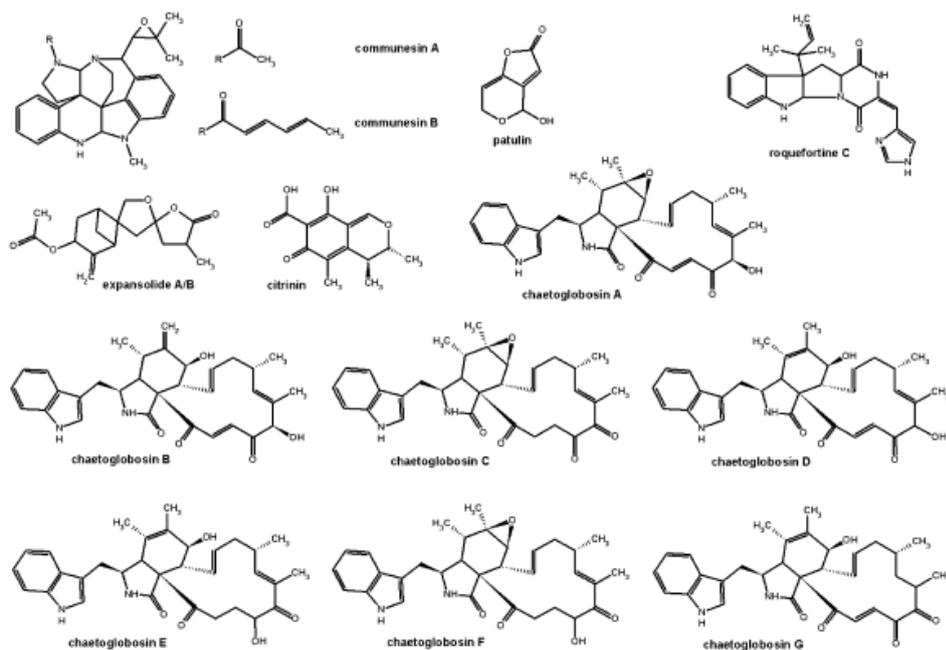


Figura 20 - Struttura dei metaboliti prodotti da *P. expansum* (Andersen et al 2004)

1.12 LA PATULINA

E' prodotta da più di 60 specie di funghi appartenenti ad oltre 30 generi. I principali funghi produttori sono: *P. expansum*, *Byssochlamis nivea* *Aspergillus spp.* Grande rilevanza è data a *P. expansum*, isolata per la prima volta negli anni '40 del secolo scorso, la patulina (PAT) venne dapprima utilizzata come antibiotico, fino a quando casi di avvelenamento in animali da fattoria ai quali era stata somministrata ne evidenziarono gli effetti tossici.

Da un punto di vista chimico si tratta di un lattone eterociclico insaturo (4-hydroxy-4H-furo [3,2c] pyran-2[6H]-one) e l'atomo di carbonio di questo legame è un sito elettrofilo che reagisce facilmente con il gruppo tiolico delle proteine e permette, pertanto, una S-alchilazione.

La contaminazione è principalmente associata all'area del tessuto in decomposizione, ma può interessare approssimativamente anche il tessuto sano circostante, nell'arco di 1 cm (Taniwaki *et al*/1992). La rimozione del tessuto infetto e dell'area limitrofe prima del processo di lavorazione, permette di ridurre significativamente i livelli di patulina nei prodotti a base di succo di mela (Sydenham *et al* 1995). Solubile in acqua, etanolo, acetone, etilacetato, stabile a pH acidi (3.5- 5.5) e alle alte temperature (125°C), viene gradualmente distrutta durante la conservazione dalla presenza di solfiti, e di acido ascorbico (Harrison 1989). La sua elevata stabilità sembra essere legata al pH dei frutti normalmente compreso tra 3.8-4.6 (Kotzekidou-Rouka, 1993) e al basso contenuto in composti solfidrici (Scott e Somers, 1968).

Gli effetti clinici tossici si manifestano essenzialmente sul sistema nervoso centrale, agisce mediante l'inibizione della respirazione cellulare come conseguenza del blocco del trasporto terminale degli elettroni nella catena respiratoria. Inoltre se somministrata per via parenterale, ha un effetto mutageno, teratogeno e cancerogeno. Studi clinici hanno dimostrato che la principale specie colpita è quella bovina, La sintomatologia dell'intossicazione acuta è di natura nervosa (convulsioni, in coordinazione motoria con posture anomale, difficoltà di deambulazione, paresi e paralisi del treno posteriore). L'intossicazione cronica si manifesta solamente negli animali con una diminuzione dell'appetito e delle produzioni (latte).

Gli effetti principali della PAT nell'uomo consistono in irritazioni della mucosa dello stomaco con conseguenti nausea, mentre ancora più incerta è la capacità della micotossina di indurre processi tumorali. Si sospetta per l'uomo un effetto cancerogeno sulla base di un'inchiesta epidemiologica mostrante una più alta frequenza di cancro dell'esofago, nelle regioni della Francia dell'Ovest, in cui si consumano grandi quantità di mele e di sidro, alimenti facilmente contaminabili dalla patulina. La tossicità a livello umano non è stata ancora del tutto dimostrata, tuttavia molti paesi hanno regolato i limiti di patulina presenti nei prodotti a base di mela, soprattutto in ragione del fatto che i principali consumatori di succhi di mela e altri

derivati sono i bambini e gli effetti alla lunga esposizione alla patulina non sono ancora noti.

Il Regolamento CEE n. 1425/03 dell'11 agosto 2003 stabilisce i limiti europei della concentrazione di patulina negli alimenti: per i succhi di frutta e ingredienti di succhi di frutta presenti in altre bibite, compreso il nettare di frutta, bevande alcoliche, sidro e altre bevande fermentate derivate da mele o contenenti succhi di mela il limite massimo è di $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$; per i prodotti contenenti mele allo stato solido, compresi la composta di mele e il passato di mele destinate al consumo il limite massimo è di $25,0 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Mentre per il succo di mela e prodotti contenenti mele allo stato solido per lattanti e bambini nella prima infanzia, etichettati e venduti come tali, il limite massimo è di $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$.

1.12.1 Biosintesi

La sua biosintesi coinvolge una serie di reazioni di condensazione e riduzione, e molte, se non tutte, catalizzate da enzimi, in particolare 10 enzimi sono coinvolti in maniera diretta nel processo di biosintesi correlato poi in maniera indiretta all'attività di un'altra ventina di enzimi. Un ampio numero di studi biochimici ha permesso di chiarire il via biosintetica.

La sua sintesi inizia con 3 molecole di acetil coenzima A (AcCoA), e 1 unità di malonyl CoA reduttasi (Ciegler *et al*/1971; Turner 1976; Steyn 1992). L'Acetil CoA reduttasi e 3 malonyl-CoA vengono condensati in acido 6-metilsalicilico (6-MSA) attraverso la 6-metilsalicilico acido sintetasi (6-sintetasi MSA) (Gaucher 1975; Lynen *et al*/1978). Il gene che codifica per 6-MSA è stato clonato e caratterizzato da *P. patulum* e *P. urticae* (Beck *et al* 1990; Wang *et al* 1991).

L' inattivazione del 6-MSA sintetasi rappresenta il primo limite alla produzione di patulina (Neway e Gaucher 1981). La fase successiva comporta la conversione del 6-MSA in M-cresolo attraverso l'attività di 6-MSA decarbossilasi (Lam *et al*/1988) il quale viene quindi convertito in alcool M-idrossibenzilo dalla M-cresolo-2-idrossilasi. Il passo successivo non è ancora del tutto chiaro, due sono i meccanismi ipotizzati, entrambi concordano che l'alcol M-idrossibenzolo viene convertito in gentisaldeide (Forrester Gaucher 1972), tuttavia l'intermediario tra due questi composti non è ancora chiaramente identificato: si crede essere l'alcol gentisilico (Sekiguchi *et al*/1983; Iijima *et al*/1986) oppure in M-idrossibenzaldeide. Alcuni studi ritengono che M-idrossibenzaldeide non venga convertita in gentisaldeide, ma piuttosto in acido p-idrossibenzoico (Murphy e Lynen 1975), e la M-idrossibenzolo deidrogenasi lo converta in M-idrossibenzaldeide (Gaucher 1975; Murphy e Lynen 1975). Sia questo enzima, sia la M-cresol-2-idrossilasi, richiedono ossigeno e NADPH per svolgere la loro funzione (Murphy e Lynen 1975). Una volta che si è formata gentisaldeide, viene poi convertita in isoepossidone, poi in fillostine, quindi in neopatulina, e E-ascladiolo e infine in patulina (Sekiguchi e Gaucher 1977, 1978, 1979; Sekiguchi *et al*/1979, 1983).

La conversione da isoepossidone a fillostine, si realizza tramite isoepossidone deidrogenasi (settimo enzima coinvolto) (IDH) NADP-dipendente (Sekiguchi e di Gaucher 1979). Per la conversione della neopatulina a E-ascladiolo è necessaria la riduzione del NADPH. Il prodotto di questa reazione, E-ascladiolo, viene poi ossidato e trasformato nella suo isomero Z-ascladiolo (Sekiguchi *et al*/1983).

Il percorso delle formazione della patulina viene riassunto nella figura 21.

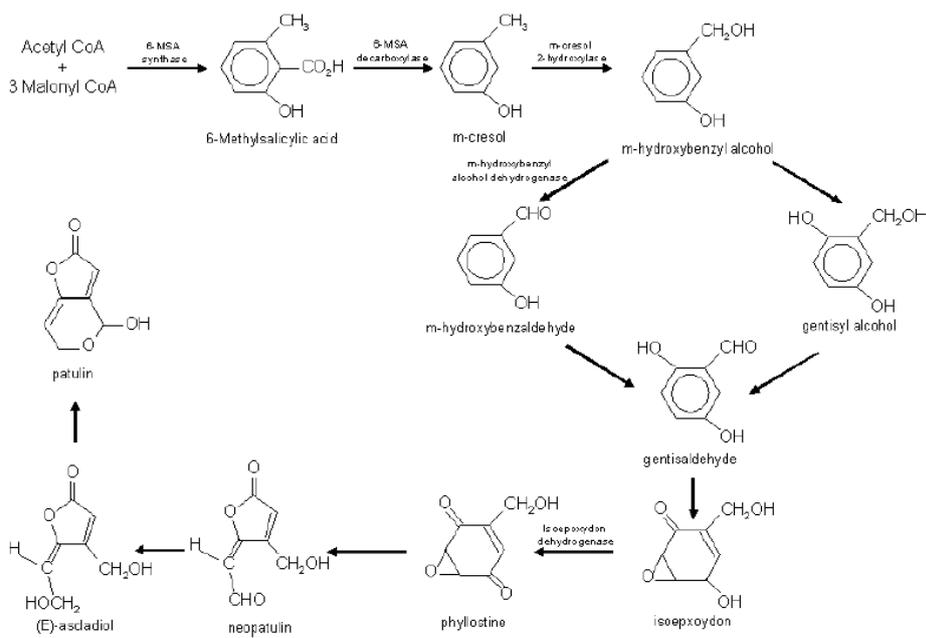


Figura 21 - Via biosintetica della patulina. (Gaucher 1975; Murphy e Lynen 1975; Sekiguchi e Gaucher 1979; Sekiguchi *et al* 1983; Iijma *et al* 1986; Priest e Light 1989)

2.1 SCOPO DELLA RICERCA

La presente ricerca si propone di caratterizzare ceppi di *Penicillium sp.* differenziando altresì il comportamento dei ceppi sensibili e resistenti al Tiabendazolo (TBZ) in relazione all'attività enzimatica legata alla fase iniziale del processo infettivo, e alla produzione di acidi organici da parte del patogeno.

Si cercherà di identificare i meccanismi attraverso i quali il patogeno modula il pH dell'ambiente e valutare come tali condizioni possano influire sul metabolismo secondario del patogeno con particolare riferimento alla tossinogenesi caratteristica di *Penicillium sp.*

MATERIALE E METODI

Prove in vitro

3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE

Gli isolati, sono stati ottenuti da pere con evidenti sintomi di muffa verde-azzurra e provenienti da diversi magazzini frigoriferi dell'Emilia-Romagna. In tutto sono stati ottenuti 120 isolati e successivamente da questi ne sono stati selezionati casualmente 19.

L'isolamento è avvenuto, dopo preventiva disinfezione della superficie del frutto (con alcool al 70%), dai tessuti sotto-epidermici, in corrispondenza delle tacche di marciume; prelevando delle porzioni di polpa e depositate su piastre contenenti malt extract agar (MEA; Oxoid; Basingstoke, UK). Le piastre sono state incubate a 20°C per 7 giorni; E' stato inoltre acquistato un ceppo di *P. expansum* CBS (N° 484.75) utilizzato come riferimento. Per ogni isolato è stata eseguita una coltura monoconidica, mediante la tecnica della diluizione in piastra e conservato a 4°C fino al momento dell'uso.

3.1.2 Caratterizzazione genotipica

La caratterizzazione genotipica gli isolati, è avvenuta mediante estrazione del DNA. A tal fine un'aliquota di 10 ml di acqua sterile è stata utilizzata per lavare i conidi di *Penicillium* presenti in piastre di MEA precedentemente inoculate. I conidi sono stati successivamente trasferiti in 50 ml di liquido colturale malt extract broth (MEB, Oxoid; Basingstoke, UK), e incubati per 72 ore a 20 ° C, dopo tale periodo il micelio è stato raccolto per filtrazione, congelato in azoto liquido e triturato con pestello in un mortaio. Aliquote di circa 50 mg di micelio sono state quindi estratte con il metodo di Marek *et al.* (2003): il metodo prevedeva le seguenti fasi: lavaggio con aggiunta di 500 µl di TE buffer (10 mM Tris e 1 mM EDTA) (pH 8) e

centrifugazione per 5' a 16.000 rpm. secondo lavaggio con TE tampone e seconda centrifugazione. Il surnatante è stato poi allontanato e il deposito risospeso in 500 μ l di tampone di estrazione:

- Tris-HCl pH 7,5 (200 mM) (Sigma-Aldrich)
- SDS 0,5% w/v (Fluka)
- EDTA (25 mM) (Sigma-Aldrich)
- NaCl 250 (mM) (Merck)
- Acetato di sodio 300 μ l (3 M) (Merck)

Al campione così estratto sono poi stati aggiunti 100 μ l di Zirconia/Silica Beads (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) e la miscela è stata agitata per 10 minuti ottenendo una soluzione lisata. La soluzione lisata è stata poi trattata con proteinasi K (2 mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubata a 37°C per 30 minuti in bagno termostato. Dopo l'incubazione sono stati aggiunti 100 μ l di NaCl (1.5 M) e dopo altri 5 minuti di incubazione alla stessa temperatura, la soluzione è stata centrifugata a 16.000 rpm, per allontanare i residui cellulari insolubili. Il surnatante è stato trasferito in un nuovo recipiente ed estratto due volte con una miscela in eguale volume di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (1:1:24) (Sigma Aldrich). Il DNA precipitato è stato sospeso in uguale volume di isopropanolo (Sigma Aldrich) e incubato a 20°C per 60 minuti. Successivamente è stato lavato con etanolo al 70%, essiccato e sospeso in 100 μ l di TE tampone.

3.1.3 PCR

I primer utilizzati per l'identificazione sono stati selezionati da sequenze interne del gene della poligalatturonasi pubblicate nella GenBank (Yao *et al*, 1998)

(Tab. 5). La PCR è stata effettuata, come descritto da Saiki *et al* (1988) utilizzando il kit GeneAmp PCR (Perkin-Elmer Balena, Norwalk, CT, Stati Uniti d'America).

Primer	Sequenze da 5' a 3'
PEF	ATC GGC TGC GGA TTG AAA G
PER	AGT CAC GGG TTT GGA GGG

Tabella 5 - Primer utilizzati per l'amplificazione attraverso la PCR

All'amplificato sono stati aggiunti 50 ml di Mastermix:

- 2.5 mM MgCl₂
- 200 µM di dNTPs
- 1 µM di entrambi i primers
- 1,25 U di Taq polimerasi

I campioni così preparati sono stati posti nel termostato a ciclo continuo per PCR per due ore. Il ciclo prevedeva i seguenti passaggi:

1. 92°C per 5 minuti (melting)
2. 55°C per 45 secondi (annealing)
3. 72°C per 45 secondi (extension)
4. 72 °C per 7 minuti (final extension)

I passaggi 1,2,3 sono stati ripetuti per 30 cicli. Le sequenze amplificate sono state poi analizzate attraverso separazione in elettroforesi su gel di agarosio (1.2%) colorato con etidio-bromuro (Sigma Aldrich), e osservato sotto luce ultravioletta per rilevare la presenza e la quantità di DNA amplificato.

3.2 SENSIBILITA' AL TBZ

Per ogni isolato sono state preparate sospensioni conidiche di 10^3 conidi ml^{-1} , aliquote di 100 μl di tali sospensioni sono state distribuite su piastre di MEA acidificato (MEAac) con acido lattico al 36% (Sigma Aldrich), addizionate con 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ di Tiabendazolo (Tecto '20S', Merck Sharp & Dohme, Italia). Il testimone era rappresentato da piastre di MEAac non addizionate con il p. a. Dopo un periodo di 96 ore di incubazione a 20°C al buio, è stata osservata la germinazione conidica, calcolando l'indice di efficacia (IE) del trattamento secondo la seguente formula:

$$\text{IE (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonie TEST} - \text{N}^\circ \text{ colonie TBZ}}{\text{N}^\circ \text{ colonie TEST}} \times 100$$

Ogni tesi era costituita da ripetizioni di 5 piastre (ripetizioni), e per ogni isolato è stata determinata l'ED₅₀ e l'ED₉₅ (dose letale per il 50 e 95 % della popolazione). A tale scopo sono state utilizzate concentrazioni decrescenti di p.a. e precisamente: 200 - 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Per la determinazione dell'ED₅₀ e l'ED₉₅ è stata usata l'analisi del probit-log, trasformando in probit i valori di inibizione della germinazione dei conidi e calcolando successivamente la retta di regressione tra probit e logaritmo della concentrazione di p.a..

3.2.1 Confronto TBZ commerciale - TBZ puro

Al fine di valutare l'effetto dei coformulati presenti nella formulazione commerciale del TBZ, sulla germinazione dei conidi nei aliquote di 100 μl di sospensione conidica (10^3 conidi ml^{-1}) sono stati distribuiti su piastre di MEAac addizionate con TBZ commerciale (400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) o con TBZ puro (Sigma Aldrich), in questo caso il p.a. è stato disciolto in dimetilsolfossido (DMSO, ProLabo). La stessa concentrazione di DMSO (1%) è stata aggiunta anche nel testimone. Per ogni isolato sono state inoculate 5 piastre (ripetizioni), messe poi in incubazione a 20°C per 5 giorni, al buio.

3.3 IMPIEGO DELLA FONTE CARBONIOSA

E' stata valutata la capacità di sfruttare alcuni zuccheri come unica fonte di carbonio (C) da parte degli isolati oggetto della sperimentazione..

A tale scopo la al centro di piastre contenenti un terreno minimo (MM) è stato posto un disco (ø 6mm) di micelio non sporificato precedentemente cresciuto su MEA per 48 ore al buio a 20°C.

Il terreno minimo (MM) prevedeva la seguente composizione:

MM agar (g⁻¹)

5 g di (NH₄)₂SO₄ (Carlo Erba)

1 g di KH₂PO₄ (Sigma Aldrich)

0.5 g MgSO₄ · 7H₂O (Merk)

15 g Agar tecnico n°13 (Oxoid)

2 g della singola fonte di carbonio

Sono stati utilizzati i seguenti zuccheri: glucosio, fruttosio, saccarosio, xilosio, e mannosio . Sono state utilizzate 5 piastre (ripetizioni) per ogni isolato saggiato.

Le piastre sono state incubate a 20°C per 8 giorni, al termine del periodo è stato misurato lo sviluppo della colonia inteso come diametro (mm), distinguendo lo sviluppo di classi di crescita in . <30; 31-36; 37-42; 42-46; >46 (mm).

Eliminato: .

La crescita è stata caratterizzata in relazione ai seguenti parametri:

- 0 = micelio non sviluppato
- -- = micelio appena visibile in trasparenza
- - = micelio visibile ma non sporificato
- -/+ = micelio ben sviluppato non sporificato
- + = micelio sviluppato e con un lieve sporificazione sparsa
- ++ = micelio sviluppato con media sporificazione

- 1 = micelio sviluppato con alta sporificazione che ricopre l'intera colonia

3.4 SCREENING DELLA CAPACITA' DI ACIDIFICAZIONE DEL SUBSTRATO

Per valutare la capacità di sviluppo e di produzione di metaboliti acidi i ceppi sono stato coltivati come descritto da Samson *et al* (2004).

Un disco di micelio (\varnothing 6mm) ottenuto da una coltura cresciuta per 7 giorno a 20°C al buio, è stato deposto su piastre contenenti due tipi di terreno: Czapek yeast autolysate agar (CYA), e creatine sucrose agar (CREA).

CYA agar (g l ⁻¹)	CREA agar (g l ⁻¹)
3 g NaNO ₃ (Sigma Aldrich)	3 g Creatina (Sigma Aldrich)
5 g Estratto di lievito (Oxoid)	30 g Saccarosio (Sigma Aldrich)
30 g Saccarosio (Sigma Aldrich)	1.6 g K ₃ PO ₄ · 7H ₂ O (Sigma Aldrich)
1.3 g K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O (Sigma Aldrich)	0.5 g MgSO ₄ · 7H ₂ O (Carlo Erba)
0.5 g MgSO ₄ · 7H ₂ O (Carlo Erba)	0,5 g KCl (Sigma Aldrich)
0,5 g KCl (Sigma Aldrich)	0,01 g FeSO ₄ · 5H ₂ O (Sigma Aldrich)
0.01 g FeSO ₄ · 5H ₂ O (Sigma Aldrich)	0.005 g CuSO ₄ · 5H ₂ O (Sigma Aldrich)
0.005 g CuSO ₄ · 5H ₂ O (Sigma Aldrich)	0.01 g ZnSO ₄ · 7H ₂ O (Fluka)
0.01 g ZnSO ₄ · 7H ₂ O (Fluka)	0,05 g Bromocresolo purple (Sigma)
15 g Agar tecnico n°13 (Oxoid)	15 g Agar tecnico n°13 (Oxoid)

Su CYA la crescita miceliare, intesa come diametro della colonia, è stata determinata dopo 7 a 20°C al buio. Su CREA (dopo 7 giorni) è stato valutato non solo

il diametro della colonia, ma anche le sue caratteristiche morfologiche rispetto a *CYA*, secondo le seguenti tre classi:

- ++ molto sviluppato
- + sviluppato
- - debolmente sviluppato

Sulle stesse piastre è stata determinata anche la capacità e l'intensità di acidificazione dei ceppi in relazione allo sviluppo di un alone attorno alla colonia secondo quanto riportato da (Samson *et al* , 2004). La presenza di un alone giallo è come indice di reazione positiva, viceversa l'assenza di cambiamento di colore di fondo (viola) è considerata come reazione negativa; inoltre sono state considerate le dimensioni dell'alone rispetto a quelle delle diametro della colonia. Dopo 21 giorni a 20°C sulle medesime piastre è stata valutata la produzione di metaboliti basici, rappresentata da un ritorno al colore originale del substrato (viola).

3.5 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA IN *P. EXPANSUM* SU PIASTRA AGARIZZATA

L'attività enzimatica può essere testata in modo semplice in funzione delle capacità di crescita su substrati specifici, l'aggiunta di alcune sostanze chimiche ai substrati di crescita in presenza di specifici indicatori, permette di testare un'ampia gamma di attività enzimatiche. La determinazione dell'attività enzimatica è stata ottenuta in accordo con Paterson e Bridge (1994).

3.5.1 Attività dell'esterasi degli acidi grassi

L'agar Tween80 viene utilizzato per testare l'attività dell'esterasi (Sierra, 1957).

TW80 agar (g l⁻¹)

10 g Peptone per micologia (Oxoid)

15 g Agar tecnico n°13 (Oxoid)

5 g NaCl (Merck)

0.1 g CaCl₂ · 2H₂O (Merck)

0.025 g Bromocresol purple (Sigma)

10 ml Tween80 soluzione 10% (v/v)

(Merck)

Il pH del substrato è stato portato al valore 5,4 con HCl (0,5 M), dopo sterilizzazione (10 minuti a 10 psi), la soluzione di Tween80 è stata aggiunta al substrato di base. Le piastre sono state inoculate con un disco di micelio (\varnothing 6mm) proveniente da culture cresciute su MEA per 96 ore a 20°C al buio. Una volta inoculate le piastre sono state messe in incubazione per 14 giorni a 20°C. La reazione positiva viene evidenziata da un cambiamento di colore del substrato da (giallo-marrone) a blu-violetta spesso accompagnata dalla formazione di un anello biancastro attorno alla colonia costituito da sali di calcio insolubili.

3.5.2 Attività delle lipasi

Per testare l'attività delle lipasi degli isolati di *P. expansum* è stato utilizzato un substrato di crescita contenete:

Lipasi agar ($g\ l^{-1}$)

5 g Peptone per micologia (Oxoid)

10 g Agar tecnico n°13 (Oxoid)

3 g Estratto di lievito (Oxoid)

1 ml Tributirina (Sigma Aldrich)

L'agar è stato sterilizzato in autoclave per 10 minuti a 10 psi, una volta raffreddato a 60°C è stata aggiunta la Tributirina sterilizzata e freddo. Il substrato è quindi stato inoculato come descritto per il TW80 agar e lasciato a 20°C per 7 giorni al buio. La reazione alla lipasi positiva viene segnalata dalla comparsa di un alone trasparente attorno alla colonia in contrasto con l'opacità del substrato.

3.5.3 Idrolisi della caseina (proteasi)

Proteasi agar ($g\ l^{-1}$)

- .1 g di KH_2PO_4 (Sigma Aldrich)
- 0,5 g KCl (Sigma Aldrich)
- 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Carlo Erba)
- 0.1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merk)
- 25 ml Skim Milk 15% (Oxoid)
- 10 g Glucosio (Sigma Aldrich)
- 12 g Agar tecnico n°13 (Oxoid)

Il pH del substrato viene aggiustato a 5,4 con HCl (0,5 M) e sterilizzato per 30 minuti a 5 psi. Anche in questo caso l'inoculo è stato eseguito con la stessa modalità vista in precedenza; le piastre sono state messe in incubazione per 7 giorni al buio a 20°C. L'idrolisi della caseina viene messa in evidenza dalla formazione di un alone trasparente attorno alla colonia.

3.5.4 Attività delle ureasi

Ureasi agar ($g\ l^{-1}$)

- 1 g $NH_4H_2PO_4$ (Merck)
- 0,2 g KCl (Sigma Aldrich)

0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Carlo Erba)
10 g Glucosio (Sigma Aldrich)
12 g Agar tecnico n°13 (Oxoid)
0.05 g Bromocresol purple
(Sigma)
20 ml Urea in soluzione (Sigma
Aldrich)

Il substrato base viene sterilizzato in autoclave a 10 psi per 10 minuti, la soluzione acquosa di urea viene sterilizzata a freddo e aggiunta al substrato per ottenere una concentrazione finale del 2%. Le piastre di controllo sono state preparate in maniera analoga, ma senza l'aggiunta della soluzione di urea, entrambi i substrati sono stati inoculati come descritto precedentemente, e incubati per 7 giorni al buio a 20°C. L'idrolisi dell'urea determina la liberazione di ammonio, che innalza i valori del pH del substrato modificando il suo colore da giallo a rosso-violetto, e ovviamente deve essere visibile solo nel substrato contenente urea e non in quello di controllo.

3.5.5 Attività delle pectinasi

Pectinasi agar ($g\ l^{-1}$)

0,9 g $NH_4H_2PO_4$ (Merck)
0,5 g KCl (Sigma Aldrich)
0.1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Carlo Erba)
0.2 g $(NH_4)_2HPO_4$ (Sigma Aldrich)
12 g Agar tecnico n°13 (Oxoid)
1 g Estratto di pectine da limone (Sigma
Aldrich)
0.15 g Ruthenium red (Fluka)

Il substrato è stato sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 5 psi e inoculato come visto in precedenza. A 7 giorni dall'incubazione a 20°C, dopo aver determinato il diametro della colonia, le piastre sono state bagnate con una soluzione acquosa di acido malico 0,1 M (Fluka) e lasciate per 1 ora a temperatura ambiente, dopodichè l'acido malico in eccesso è stato allontanato. Le piastre sono state lasciate a 4°C per 2 giorni e riportate a temperatura ambiente poi lavate con acqua. Nel caso di una reazione positiva, il substrato ha assunto una colorazione rosata evidenziata da un alone scuro attorno alla colonia, un ulteriore lavaggio con una soluzione al 0,1 % (w/v) di ammonio persolfato ha permesso di aumentarne il contrasto di colore.

3.6 ESTRAZIONE DEL COMPLESSO ENZIMATICO

Gli isolati di *P. expansum* sono stato coltivati inizialmente su un substrato liquido artificiale ricco di estratti di parete cellulare, ma povero in elementi nutritivi (Pratt's medium modificato), per facilitare l'estrazione del complesso enzimatico.

3.6.1 Estrazione della parete cellulare da pere cv Conference

L'estrazione della parete cellulare è stata ottenuta secondo il metodo di Rose *et al* (1998), McQueen-Mason *et al* (1995), e Brummell *et al* (1997) con modifiche.

L'estrazione della parete cellulare prevedeva i seguenti passaggi:

1. Omogeneizzare 50 g di tessuto del pericarpo con Ultra-Turrax T25 a 24000 rpm per 10 minuti;
2. Portare ad ebollizione in 100 ml di etanolo (95%, Carlo Erba) per 30-45 minuti;
3. Omogeneizzare nuovamente con Ultra-Turrax T25 a 24000 rpm per 5 minuti;
4. Filtrare con filtri Whatman GF/A;

Il materiale insolubile è stato poi "lavato" e filtrato in sequenza con:

5. 100 ml di etanolo (95%) in agitazione per 5 minuti;
6. 100 ml di una miscela cloroformio:metanolo (1:1, v/v) (Carlo Erba) in agitazione per 5 minuti;
7. 100 ml di acetone (Merck) in agitazione per 5 minuti;
8. Essiccazione in stufa a 30°C e conservazione essiccatore

3.6.2. Accrescimento del micelio su Pratt's Medium modificato

L'accrescimento miceliare è stato ottenuto in accordo con Zucker e Hankin (1970). Il substrato liquido artificiale, povero di elementi nutritivi, è stato scelto al fine di poter estrarre gli enzimi prodotti dal patogeno senza "interferenze" di sostanze che possono modificare le eventuali letture spettrofotometriche.

Il Pratt's Medium, modificato, era così composto:

Pratt's Medium (g l⁻¹)

13,6 g	KH ₂ PO ₄ (Sigma Aldrich)
4 g	NH ₄ NO ₃ (Merck)
1,25	MgSO ₄ · 7H ₂ O (Carlo Erba)
0,001 g	CuSO ₄ · 5H ₂ O (Sigma Aldrich)
0,002 g	ZnSO ₄ · 7H ₂ O (Fluka)
0,0013 g	(NH ₄) ₂ MoO ₄ (Carlo Erba)
0,016 g	MnSO ₄ · H ₂ O (Carlo Erba)
0,028 g	H ₃ BO ₃ (Sigma Aldrich)
0,02 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O (Sigma Aldrich)
1 g	Estratto di lievito (Oxoid)
3 g	Estratto di parete cellulare

Dopo aver aggiustato il pH del substrato a 4.5 con HCl (0,5 M) è stato autoclavato per 15 minuti a 15 psi. Aliquote da 10 ml di Pratt's medium contenute in tubi Falcon (15 ml) sono state inoculate con gli isolati di *Penicillium* (3 dischi di micelio da 6 mm di diametro per ogni tubo) e stateli tutto incubato per 7 giorni a 20°C.

3.6.3. Estrazione degli enzimi *prodotti in substrato liquido*

Dopo 7-10 giorni dall'inoculo, il micelio sviluppatosi nel substrato liquido ha rilasciato nel liquido di coltura il complesso enzimatico. L'estrazione degli enzimi è avvenuta separando gli stessi dal substrato di crescita, attraverso il processo di dialisi e successiva concentrazione

L'estrazione enzimatica prevedeva i seguenti passaggi:

1. Centrifugazione della sospensione di micelio e Pratt's medium a 13.000 rpm per 30 minuti;
2. Conservazione della fase liquida;
3. Aggiunta al "pellet" 1 ml di tampone : NaCl 0.5 M in 100mM acetato di sodio a pH 5
4. Centrifugazione nuovamente a 13.000 rpm per 30 minuti;
5. Unione delle due fasi liquide;
6. Filtrazione con filtri Millipore (0.30 μ) della fase liquida;

3.6.4 Dialisi e Concentrazione

La dialisi ha la funzione di eliminare i composti sodico-salini dal campione e si realizza immergendo una membrana (Spectrapor Membrane 6,000-8,000 MWCO)

contenente la soluzione campione, in una soluzione di acetato di sodio a pH 5 per 8 ore a 4°C in agitazione.

La concentrazione consiste nell'eliminare più acqua possibile dal campione e quindi nel concentrare le proteine presenti. Una volta finita la dialisi, la membrana, contenente il campione, viene ricoperta da Glicole Polietilenico (Sigma Wt 15000-20000) per 30-60 minuti a 4°C. Il campione dializzato e concentrato è conservato a 4°C.

3.7 CARATTERIZZAZIONE ENZIMATICA MEDIANTE "CUP PLATE"

Questa tecnica mette in evidenza l'attività di un enzima mediante la formazione di un alone su gel colorato. Gel e coloranti utilizzati sono differenti a seconda degli enzimi considerati.

3.7.1. Standard per le Cup Plate

Prima di testare gli enzimi sono state determinate le curve di taratura a cui fare riferire i dati ottenuti e quantificare gli enzimi. Gli standard utilizzati per gli enzimi pectolitici (PG e PGA), e le cellulasi sono stati acquistati presso la Sigma Aldrich.

3.7.2 Cup Plate - Pectinasi (PG) (EC 3.2.1.15 e 3.2.1.58)

Le pectinasi sono state determinate in accordo con Tamura, *et al* (2004) e Stotz *et al* (1993) con modifiche.

La tecnica prevedeva i seguenti passaggi:

Portare ad ebollizione per 2 minuti circa una soluzione contenente:

- ✓ 1 g Agarosio (Biorad)

- ✓ 10 mg Acido Poligalatturonico (Sigma Aldrich)
- ✓ 100 ml Acetato di Sodio 0.1 M (pH5) (Merck)

Distribuire il substrato gelatinoso su una piastra trasparente, con i bordi, (lo spessore del gel deve essere circa 1,5 mm) e lasciare solidificare a temperatura ambiente.

Praticare sulla superficie, con un foratappi del diam. di 4mm pozzetti equidistanti.

Riempire questi pozzetti con aliquote di 15µl di campioni da analizzare

Porre la piastra a 37°C per circa 16 ore.

Colorare il gel con Ruthenium Red (0.05% w/v) per 30 minuti,

Lavare con abbondante acqua distillata.

Gli eventuali enzimi pectolitici presenti nel campione si evidenziano con un alone trasparente su sfondo rossastro.

Per la curva di taratura è stata utilizzata pectinasi da *A. niger* (Sigma P2736, Ferment Depectinization Unit - FDU - 3.093 FDU/ml) come standard.

3.7.3 Cup Plate - Poligalatturonasi (PGA) (EC 3.2.1.15)

Per la determinazione della PGA è stato usato lo stesso procedimento adottato per gli enzimi pectolitici, differisce solo per la presenza di EDTA che rimuove l'attività della pectinasi.

Il substrato agarizzato conteneva:

- ✓ 1 g Agarosio (Biorad)
- ✓ 10 mg Acido Poligalatturonico (Sigma Aldrich)
- ✓ 0.372 g EDTA (Sigma Aldrich)
- ✓ 100 ml Acetato di Sodio 0.1M pH5 (Merck)

Lo standard utilizzato è stato, come per la PG, la Pectinasi da *A. niger*.

3.7.4 Cup Plate - Cellulasi (EC 3.2.1.4)

Anche in questo caso la procedura è la stessa precedentemente descritta, con alcune modifiche, il gel conteneva:

- ✓ 1 g Agarosio (Biorad)
- ✓ 0.1 g Carboxymethylcellulase (CMC) (Sigma Aldrich)
- ✓ 100 ml Fosfato di Sodio 0.1M pH 5.5 (Sigma Aldrich)

La colorazione del gel è avvenuta con Congo Red (0.1% w/v) (Carlo Erba) per 30 minuti, dopodichè la superficie è stata lavata con abbondante NaCl 1M (Merck) per 15 minuti per due volte. Per aumentare il contrasto la superficie è poi stata lavata con una soluzione di acido acetico (BDH) al 5% per 3 minuti.

La presenza di enzimi cellulolitici viene evidenziata da un alone trasparente su sfondo scuro. Lo standard utilizzato è stata la cellulasi da *Aspergillus sp.* (Sigma C2605).

3.8 ACCRESCIMENTO DEL MICELIO IN RELAZIONE AL pH

Al fine di valutare l'accrescimento del patogeno in relazione al pH e al tempo si è proceduto alla determinazione del peso del micelio secco, espresso in grammi e secondo quanto riportato da Prusky *et al* (2004) il substrato di crescita è stato filtrato su filtri di carta (Whatman n°1) i filtri precedentemente essiccati sono poi stati posti in stufa a 80°C, e pesati per più volte fino al raggiungimento del peso costante.

3.8.1 Influenza del pH iniziale

Aliquote di 50 ml di brodo colturale M₃S sono state inoculate con una sospensione conidica (10³ conidi ml⁻¹) ottenuta da colture sporificate di 7-10 giorni.

Il brodo colturale conteneva:

M₃S (g l⁻¹)

2,7 g KH₂PO₄ (Sigma Aldrich)

1 g Bacto peptone (Difco)

2,5 g MgSO₄ · 7H₂O (Carlo Erba)

1 g Estratto di lievito (Oxoid)

10 g Saccarosio (Sigma Aldrich)

Il pH del brodo di coltura era 5.5. Il brodo inoculato è stato mantenuto a 25°C per 2 giorni in agitazione a 150 rpm, emulsionato e messo nuovamente in incubazione per altre 24 ore. E' stato poi filtrato con filtri di carta (Whatman n°1) e il micelio così raccolto è stato lavato due volte sottovuoto con 50 ml di acqua distillata sterilizzata. Il micelio è quindi stato risospeso in 50 ml di brodo yeast sucrose medium (YSM).

YSM (g l⁻¹)

1 g KH₂PO₄ (Sigma Aldrich)

0,5 g MgSO₄ · 7H₂O (Carlo Erba)

4 g Estratto di lievito (Oxoid)

15 g Saccarosio (Sigma Aldrich)

Il pH del brodo è stato modificato utilizzando HCl 0,5 M (Fluka) e NaOH 0,5 N (Sigma Aldrich) per ottenere valori rispettivamente di : 3,0 - 5,0 e 7,0 .

Il pH è stato misurato tramite un pH-metro (Mettler Toledo SevenGo SG2) provvisto di un elettrodo a immersione (InLab 412). Le colture ottenute sono state in incubazione per altre 24 ore a 25 C° sempre in agitazione (150 rpm) e successivamente filtrate.

Il surnatante ottenuto è stato suddiviso in due aliquote: una per la determinazione del pH e l'altra per la determinazione degli acidi organici, mentre il micelio raccolto sui filtri è stato pesato per la determinazione del micelio secco.

3.8.2. Influenza tempo

Impiegando la metodica appena illustrata il patogeno è stato fatto crescere su substrato liquido (YSM) a pH 5,0 per tempi variabili: 24-48-72-96-168 ore , il micelio è stato sospeso in aliquote da 100 ml.

Trascorsi i suddetti giorni il substrato è stato filtrato ed è stato determinato il peso secco, mentre il surnatante è stato utilizzato per la determinazione degli del pH e degli acid organici.

3.9 DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI ORGANICI

La caratterizzazione degli acidi organici prodotti dagli isolati oggetto della sperimentazione è avvenuta utilizzando i campioni ottenuti nelle precedenti prov ed è avvenuta mediante analisi in cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). Si tratta di una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

3.9.1 Preparazione degli standards

Gli standards per l'acido L- ascorbico, malico, tannico, tartarico, galatturonico, glucoronico, lattico, ossalico, propionico, fumario, citrico sono stati acquistati presso Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, WI, USA). Gli standard esterni sono stati utilizzati per costruire le curve di calibrazione, ottenute utilizzando una serie di soluzioni standard a concentrazione nota.

Le soluzioni di riferimento sono state preparate diluendo i diversi acidi in acqua ultrafiltrata per HPLC (Fluka) e utilizzate immediatamente per la lettura della taratura, nelle medesime condizioni dei campioni.

3.9.2 Strumentazione e condizioni operative

Per l'analisi è stato utilizzato un sistema HPLC (HP-1100 Agilent, Waldbronn, Germany) equipaggiato con detector a rilevazione ultravioletta a diodi (DAD).

La separazione è stata ottenuta su colonna Zorbax SB-AQ (4.6x150mm; 3.5 μ m; Agilent). I campioni prima dell'analisi sono stati filtrati con filtri da 0,45 μ m (Millipore), ogni isolato era rappresentato da tre ripetizioni.

L'analisi è stata eseguita in condizioni isocratiche con eluente costituito da: tampone fosfato 20 mM (pH 2) e acetonitrile (99:1 v/v) (Merck); si è operato con un flusso di 1 ml al minuto iniettando un volume pari a 5 μ l. Per una ottimale rilevazione degli analiti, l'analisi è stata eseguita ad una lunghezza d'onda di 210 nm a temperature ambiente.

3.9.3 Identificazione

L'identificazione dei diversi acidi organici è stata ottenuta per confronto tra il tempo di ritenzione (t_R) del picco del campione e quello dello standard.

In particolare l'estratto è stato ripartito in 2 aliquote:

a) su un aliquota è stata effettuata direttamente la determinazione HPLC-UV ;

b) l'altra è stata addizionata con un volume trascurabile di soluzione standard di ogni acido in modo tale da ottenere una concentrazione finale nell'estratto pari a circa il doppio della concentrazione che si riteneva presente nell'estratto in esame;

L'identificazione del picco nella seconda aliquota (b) è basata sulla presenza di un picco, la cui area incrementa, rispetto all'area del picco dell'estratto non addizionato (a) in modo proporzionale alla quantità di analita addizionato.

La larghezza del picco (b), misurata a metà altezza, deve essere 90-110 % della larghezza ottenuta per il picco dell'estratto non addizionato (a) ed il tempo di ritenzione deve coincidere con quello del picco ottenuto per l'estratto non addizionato.

3.9.4 Determinazione

La determinazione quantitativa è stata realizzata mediante interpolazione dell'area del picco dell'acido rilevato nell'estratto campione sulla curva di taratura. Nel caso di campioni ad elevate concentrazioni di analita si è proceduto alla diluizioni dell'estratto prima della determinazione cromatografica, al fine di ottenere una concentrazione compresa nell'intervallo di linearità verificato.

3.9.5 Espressione dei risultati

La concentrazione (C) di acido è calcolata secondo la seguente equazione:

$$C = [(y-b)/a] \cdot 100 / [(V/m) \times D]$$

dove:

y = Area del picco dell'analita presente nell'estratto campione

b = Intercetta della curva sull'asse delle y

a = Coefficiente angolare della curva di taratura

V = Volume finale dell'estratto

m = Massa in ml dell'aliquota di campione

D = Fattore di diluizione (se è stata operata una diluizione dell'estratto)

3.10 VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' MICOTOSSIGENA

3.10.1 Estrazione

Per la preparazione dei campioni è stata utilizzata una versione modificata del metodo di micro-estrazione di Smedsgaard (1997): sono stati prelevati 5 dischi (\varnothing 6 mm) di micelio cresciuto su MEAac per 7 e 15 giorni a 20°C, e messi in contenitori (vials) da 2 ml a cui è stato aggiunto 1 ml di miscela estraente: etil-acetato e acido formico (200:1 v/v) (Merck). I campioni sono stati immersi in un bagno ad ultrasuoni (Falc, Italia) per 60 minuti. L'estratto è poi stato trasferito in ampolle pulite ed essiccato al buio con evaporatore rotante (Rotavapor R, Büchi, Svizzera). Il residuo secco è stato risospeso in 500 μ l di metanolo (Merck), sonicato per 30 minuti e filtrato con filtri Millipore (0.45 μ m) e conservato a -18°C sino al momento dell'analisi.

Ogni isolato era rappresentato da 3 ripetizioni

3.10.2 Analisi HPLC

Per l'analisi è stato utilizzato un sistema HPLC (HP-1100 Agilent, Waldbronn, Germany) equipaggiato con detector a rilevazione ultravioletta a diodi (DAD). La

separazione è stata ottenuta su colonna Hypersil BDS-C18 (125 x 2 mm i.d., 3 µm). (Agilent, Palo Alto, CA) con pre-colonna Superspher 100 RP-18 (10 x 2 mm i.d.) (Agilent). L'analisi è stata eseguita in gradiente binario di eluizione con acqua (A) e acetonitrile (B), entrambi i solventi contenevano 50 µl l⁻¹ di acido trifluoroacetico. Tutti i prodotti chimici utilizzati sono stati acquistati da Merck Analytical Grade, e l'acqua utilizzata era ultrafiltrata per HPLC (Fluka). Lo sviluppo del gradiente è avvenuto secondo il seguente schema :

Tempo (min)	Flusso (ml/min)	A (%)	B (%)
0	0,3	85	15
40	0,3	0	100
45	0,3	0	100
53	0,3	85	15
58	0,3	85	15

Sono stati iniettati 5 µl per campione, e il sistema ha lavorato ad una temperatura di 40°C. Con gli standard: patulina, citrinina, penitrem A, ocratossina A e B acquistati presso Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, WI, USA) sono state costruite le curve di calibrazione, utilizzando una serie di soluzioni a concentrazione nota. Le soluzioni di riferimento sono state preparate diluendo gli diversi standard in metanolo (Merck) e utilizzate immediatamente per la determinazione della curva di taratura, nelle medesime condizioni dei campioni.

Per l'identificazione dei picchi e la loro quantificazione si rimanda a ciò che è stato scritto nei paragrafi 3.9.3, 3.9.4, 3.9.5.

Prove in vivo

3.11 ACCRESCIMENTO DEL PATOGENO SU SUBSTRATO NATURALE

Per saggiare la patogenicità degli isolati di *P. expansum* oggetto della sperimentazione sono state utilizzate pere 'Conference'. I frutti sono stati raccolti ad uno stadio di maturazione commerciale e conservati a -1°C sino al momento del loro utilizzo. Una volta selezionati per calibro e assenza di ferite, sono stati disinfettati superficialmente con etanolo al 70% e feriti artificialmente con lama tagliente, in modo da creare una lesione di dimensioni 3x3x3 mm nella zona equatoriale del frutto. All'interno della ferita è stata introdotta un'aliquota di 20 µl di sospensione conidica ad una concentrazione di 1×10^3 conidi ml^{-1} , i frutti sono stati poi conservati a 20°C in condizioni di elevata umidità per un periodo di 7 giorni. Al termine di tale periodo è stata valutata l'incidenza del marciume rilevando il diametro delle lesioni (mm) e la percentuale di ferite infette (%).

Ogni isolato era rappresentato da 3 ripetizioni di 20 frutti ciascuna.

3.12 MONITORAGGIO DELLA VARIAZIONE TEMPORALE DEL pH NEL FRUTTO INFETTO

In una prova analoga a quella descritta nel paragrafo 3.10, si è inteso verificare la variazione del pH in corrispondenza del punto di inoculo e nella zona limitrofa. I rilievi sono stati eseguiti dopo 7,10,15 giorni dall'inoculo e di conservazione a 20°C, lo sviluppo diametrico della lesione (mm).

3.12.1 Misurazione del pH

Il pH è stato misurato per mezzo di un pHmetro (Mettler Toledo SevenGo SG2, Switzerland) provvisto di elettrodo per substrato solido (InLab 427). Anche in questo caso la misurazione ha riguardato sia il punto di inoculo, sia la zona sana circostante la ferita ad una distanza di circa 1 cm. Ogni isolato era rappresentato da 3 ripetizioni di 10 frutti ciascuna

3.12.2 Preparazione dei campioni per la quantificazione degli acidi organici in HPLC

Per la preparazione dei campioni al fine della determinazione degli acidi organici è stato utilizzato il metodo di Straten e Claessens (2004).

Dopo 7 giorni da 3 ripetizioni di 10 frutti ciascuna, provenienti dalla conservazione a 20°C è stata prelevata tutta la porzione di tessuto infetto, omogeneizzata e pesata. L'omogenato è stato filtrato con filtri di carta per analisi qualitativa (Albet) e analizzato tale quale. Per la procedura di identificazione e quantificazione vedere il paragrafo 3.9.

3.12.3 Influenza del tempo

L'influenza del patogeno sul pH è stata determinata su frutti inoculati come nelle prove viste in precedenza (3.10) e incubati per periodo variabile di tempo da 1 a

7 giorni a 20°C. Ogni 24 ore sui frutti inoculati si è proceduto alla determinazione del pH, alla misurazione del diametro della lesione e alla preparazione e analisi degli acidi organici.

3.13 VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' MICOTOSSIGENA NEI FRUTTI

Parallelamente alla prova descritta nel paragrafo 3.12, sono stati preparati campioni di polpa da sottoporre ad analisi di alcuni metaboliti secondari (patulina, citrinina, penitrem A, acido benzoico, ocratossina A e B.). I prelievi hanno riguardato sia il tessuto infetto che quello sano circostante la ferita, e sono stati eseguiti dopo 7 e 15 giorni a 20°C in condizioni di alta umidità relativa e al buio. Inoltre secondo quanto previsto nel paragrafo 3.12.3 per valutare la produzione giornaliera di metaboliti secondari da parte degli isolati di *Penicillium*, le analisi sono state eseguite ogni giorno, dal primo dopo l'inoculo fino al settimo.

3.13.1 Estrazione

La preparazione dei campioni è avvenuta seguendo il metodo di micro-estrazione di Smedsgaard (1997) modificato: sono stati prelevati 2 g di polpa e sono stati messi in vials da 10 ml a cui sono stati aggiunti 6 ml di una miscela estraente: etil-acetato e acido formico (100:1 v/v) (Merck).

I campioni sono stati immersi in un bagno ad ultrasuoni (Falc, Italia) per 60 minuti. L'estratto è poi stato filtrato con filtri di carta per analisi qualitativa (Albet) per allontanare la polpa esausta. L'estratto è stato trasferito in ampolle pulite, i campioni sono stati essiccati al buio con evaporatore rotante (Rotavapor R, Büchi, Svizzera). Il residuo secco è stato risospeso in 1000 µl di metanolo (Merck), posto in sonicatore per 30 minuti, filtrato con filtri Millipore (0.45 µm) e conservato a -18°C sino al momento dell'analisi. Per l'equipaggiamento, l'analisi,

l'identificazione dei picchi e la loro quantificazione si rimanda a ciò che è stato descritto per le analisi *in vitro* nel paragrafo 3.10.2.

Eliminato: 9
9

3.14 ELABORAZIONE STATISTICA

Tutti i dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza, utilizzando il programma statistico (Statsoft7). Come test di separazione delle medie è stato utilizzato il test di Fisher (Fisher's LSD) con P 0.05),

4.1 RISULTATI PROVE

IN VITRO

4.1 IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE

Dalla comparazione della banda amplificata dai primers PER e PEF utilizzati nella PCR, tutti e 19 i ceppi di *Penicillium* isolati sono risultati appartenere alla specie *expansum*, secondo quanto riportato da Marek *et al* 2003.

4.2 VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AL TBZ

La caratterizzazione dei ceppi è stata fatta in funzione delle percentuali di inibizione della germinazione conidica: a tale proposito sono stati considerati sensibili (S) i ceppi che su substrato addizionato con TBZ (400 µg/kg) dopo 4 gg di incubazione a 20°C non evidenziavano la germinazione dei conidi, mentre resistenti (R) quelli che presentavano una percentuale di germinazione pari o superiore al testimone (senza aggiunta di TBZ). Nell'ambito dei ceppi R, gli isolati i cui conidi germinavano con una percentuale significativamente ($P < 0.05$) superiore al testimone sono stati considerati come altamente resistenti (RR).

Dei 20 ceppi testati soltanto 7 sono risultati sensibili al TBZ, tra i 13 rimanenti, 10 sono stati valutati di tipo R e 4 RR. Per questi isolati il fungicida ha stimolato la germinazione e in particolare tre isolati (P4, Euf p3, Isci 6) hanno mostrato una percentuale di germinazione oltre il 20% rispetto al testimone non trattata (Tab.6). ED₅₀ e ED₉₅ degli isolati sensibili sono inferiori a 6 µg ml⁻¹ e 25 µg ml⁻¹

rispettivamente. Mentre ED₅₀ degli isolati resistenti sono 100 volte più alte, variando da 555 µg ml⁻¹ (Isci 1a-R) sino a 2469 µg ml⁻¹ (Isci 11-R)

CEPPO	TBZ sensibilità	Inibizione della germinazione (%)	ED ₅₀ (mg ml ⁻¹)	ED ₉₅ (mg ml ⁻¹)
CBS 484.75	S	100	4,6	15,3
Cadrp28	RR	-9,6	835	1771
Euf p3	RR	-22,3	1250	2395
Emfp6	S	100	5,6	24,2
Eufp11	R	0,3	2323	3409
Isci 1a	R	31,8	555	1054
Isci 1b	R	13,3	1350	3870
Isci 2	S	100	4,7	20,1
Isci 4	R	22	1068	2477
Isci 6	RR	-23,4	2348	3493
Isci9	R	1,6	962	2557
Isci 11	R	6,6	2469	3393
Isci 12	S	100	4,65	11,6
Isci 13	S	100	4,65	11,6
Lb 8/99	S	100	4,1	12,4
P4	RR	-27,5	1235	1903
P6	R	13,1	2360	3480
P7	S	100	4,65	11,6
P32	R	7,8	2352	3381
P37	R	0,9	2287	3424

Tabella 6 - Effetto del TBZ sulla germinazione conidica degli isolati di *P. expansum* e valori ED₅₀, ED₉₅. La sensibilità al TBZ è stata calcolata valutando la germinazione conidica su piastre di MEA ammendate con 400 mg ml⁻¹ e confrontando la germinazione su piastre non avvelenate. Tutti i valori derivano dalla media di 5 repliche.

4.2.1 Confronto di efficacia tra TBZ commerciale e principio attivo puro

La prova ha confermato l'efficacia del trattamento solo per 7 ceppi di *P. expansum*, tra i ceppi resistenti i risultati mostrano una situazione più eterogenea. Nei ceppi di tipo R è presente una certa variabilità nell'efficacia del trattamento, in alcuni casi è evidente una maggiore efficacia del trattamento commerciale rispetto al p.a. puro e in altri si assiste al fenomeno opposto.

I risultati confermano la caratterizzazione degli isolati di tipo RR, ma anche il prodotto commerciale presentava un IE superiore solo nel 50 % degli isolati.

		IE (%) TBZ puro	IE (%) TBZ comm.
CBS	S	100	100
Cadrp28	RR	-2,02	-2,77
Euf p3	RR	-12,02	-13,7
Emfp6	S	100	100
Eufp11	R	-61,07	1,07
Isci 1a	R	17,4	17,96
Isci 1b	R	-1,21	9,05
Isci 2	S	100	100
Isci 4	R	0,33	2,22
Isci 6	RR	-24,31	-21,68
Isci9	R	7,79	7,7
Isci 11	R	6,79	6,08
Isci 12	S	100	100
Isci 13	S	100	100
Lb 8/99	S	100	100
P4	RR	-7,43	-19,08
P6	R	-3,31	23,81
P7	S	100	100
P32	R	-8,36	10,34
P37	R	1,25	4,22

Tabella 7 - Influenza del tiabendazolo usato come prodotto commerciale (Mertec) o come prodotto puro (Sigma) sulla germinazione dei conidi degli isolati oggetto della prova

4.3 UTILIZZO DELLE FONTI DI CARBONIO

La capacità di diversi isolati di *P. expansum* di utilizzare solo alcuni componenti (zuccheri) come unica fonte di carbonio (C) è stata valutata sullo sviluppo diametrico delle colonie e la quantità di spore prodotte.

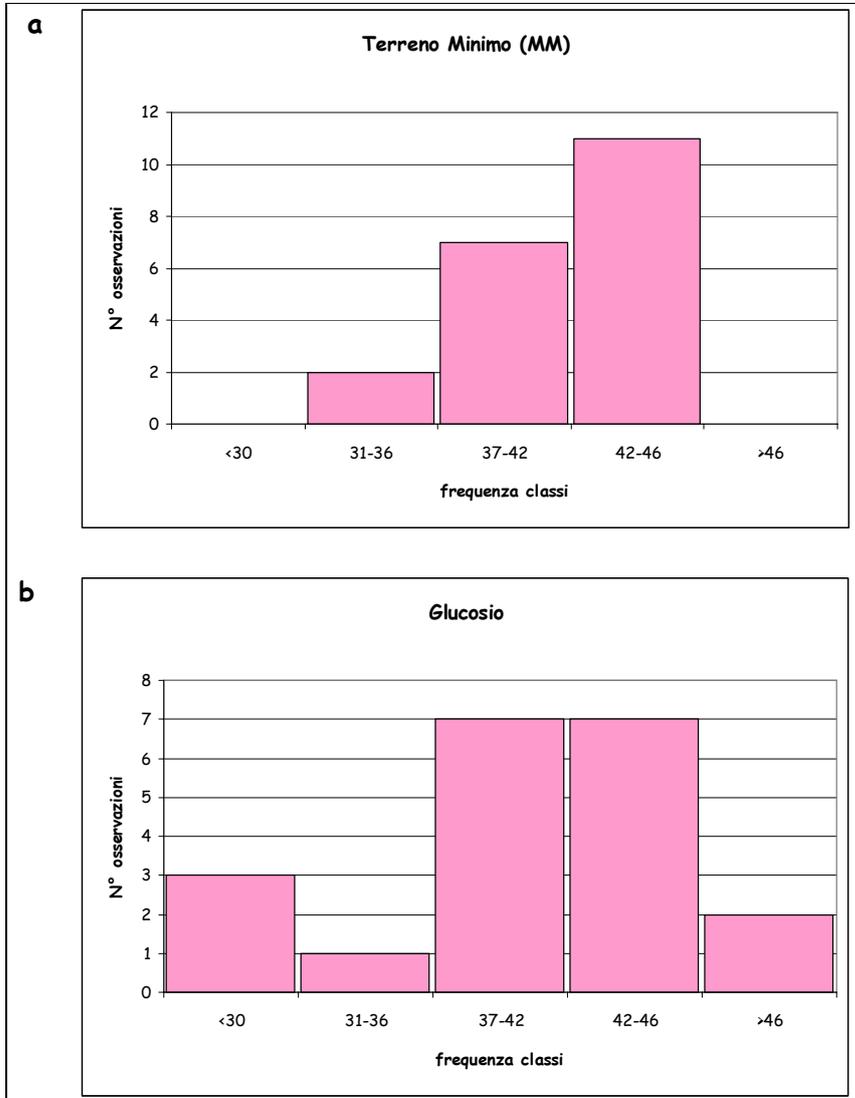
Gli isolati saggiati mostrano un buon grado di accrescimento su tutti gli zuccheri saggiati, sul substrato minimo le classi di maggior sviluppo sono rispettivamente 37-42 con il 35% delle osservazioni, e 42-46 con oltre il 50%. (Graf.1a)

In presenza di glucosio si nota una distribuzione meno omogenea nelle diverse classi di crescita, il 70% rientra nelle 2 classi viste per MM, il 10% supera i 46 mm di diametro, anche se il 15% ha sviluppato un diametro inferiore ai 30 mm (Graf.1b). Nel caso del saccarosio e del mannosio circa il 70% degli isolati rientra nella classe intermedia di sviluppo (37-42 mm), e il 15% ha avuto uno sviluppo inferiore ai 30 mm (Graf.1c-1e).

Xilosio è lo zucchero in cui è stato registrato il minor sviluppo diametrico, il 90% degli isolati non supera la classe 31-36 mm (Graf.1d)

In presenza di fruttosio (Graf.1f) la distribuzione è stata simile a quella evidenziata quando il patogeno si trova in presenza di solo glucosio, 85% degli isolati rientra nelle due classi intermedie, mentre il restante 15% nell'ultima classe (<30 mm).

Grafico 1(a,b) - Distribuzione nelle diverse classi di crescita dei ceppi di *Penicillium expansum* allevati su terreno minimo (MM) o glucosio



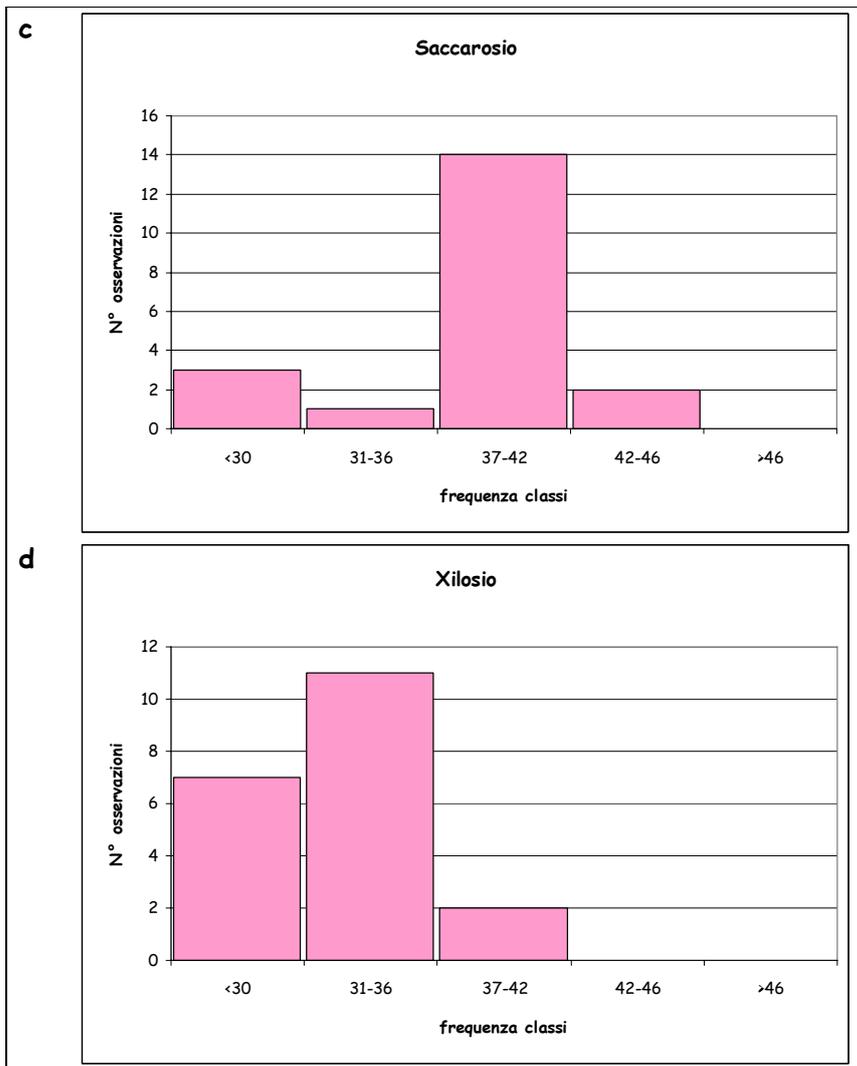


Grafico 1(c,d) - Distribuzione nelle diverse classi di crescita dei ceppi di *Penicillium expansum* allevati su saccarosio o xilosio

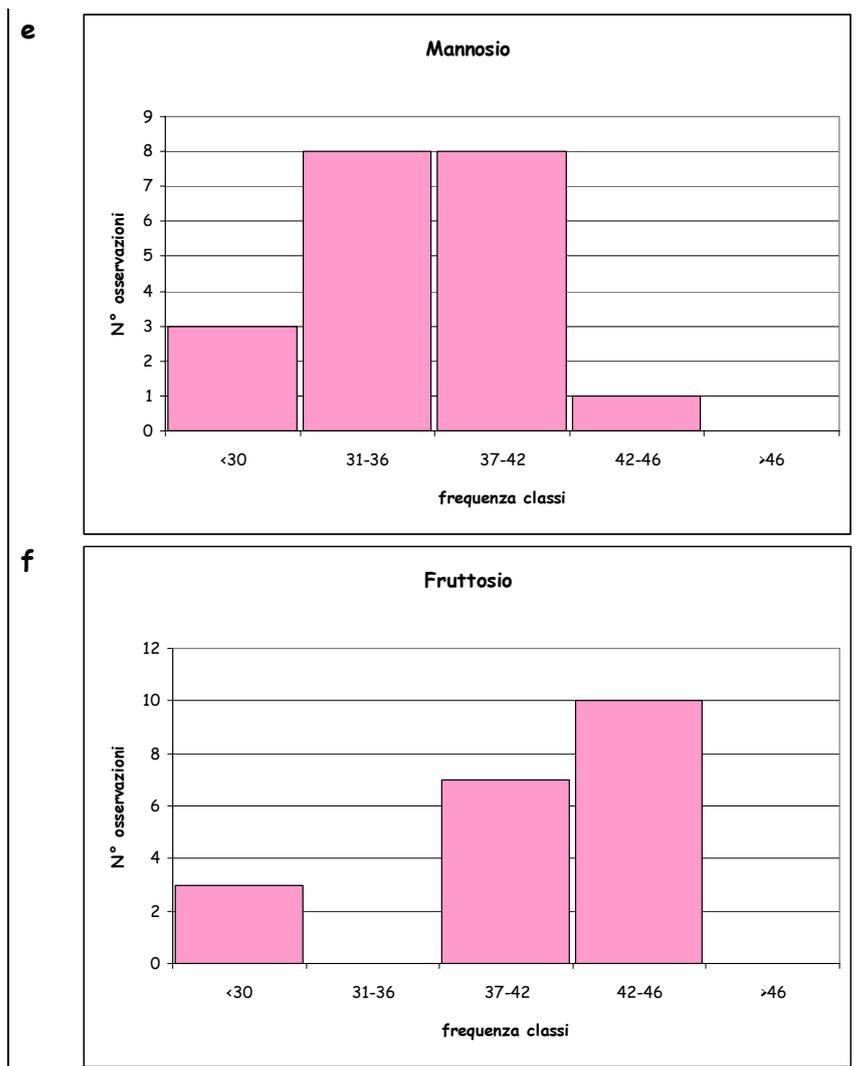


Grafico 1(e,f) - Distribuzione nelle diverse classi di crescita dei ceppi di *Penicillium expansum* allevati su mannosio o fruttosio

Per quello che riguarda invece il grado di sporificazione e la morfologia della colonia (Graf.2), in generale rispetto al substrato minimo l'addizione di una singola fonte carboniosa permette di sviluppare un micelio di aspetto più compatto e con un buon grado di sporificazione. In presenza di saccarosio, e mannosio più del 50% degli isolati si trova nella categoria di valutazione più alta (1) e la restante parte rimane concentrata nella categoria precedente comunque caratterizzata da un buon grado di

sporificazione. Anche in presenza del solo glucosio il grado di sporificazione è risultato abbondante, mentre in presenza di fruttosio, la categoria più alta (1) non è stata raggiunta da nessun isolato e la maggior parte (60%) di essi ha evidenziato un grado di sporificazione più contenuto rispetto alle altre fonti zuccherine solo il 35% degli isolati rientra nella classe (++) caratterizzata da una media sporificazione, mentre il 60% presentava un lieve livello di sporificazione. Nel caso dello xilosio pur evidenziando un minor accrescimento diametrale, il micelio si presentava di aspetto compatto e con una buona sporificazione per l'85% degli isolati.

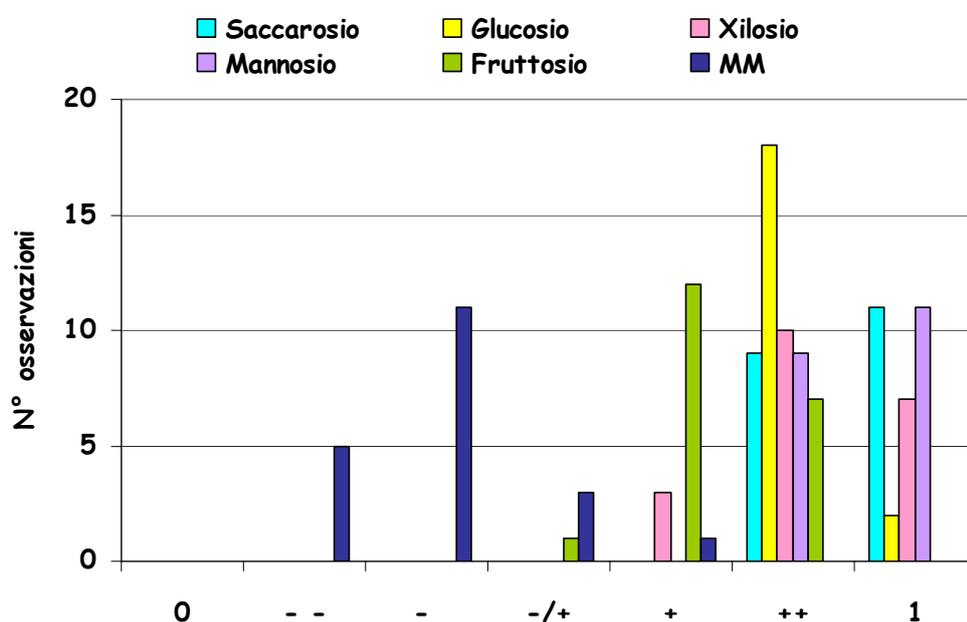


Grafico 2- Classi di frequenza basate sull'aspetto e sul gradi di sporificazione dei ceppi di *P. expansum* cresciuti su substrato minimo addizionato con diverse fonti di carbonio

4.4 CAPACITA' DI ACIDIFICAZIONE DEL SUBSTRATO DA PARTE DI ISOLATI DI *P. EXPANSUM* SU CREATINE SUCROSE AGAR

Gli isolati hanno mostrato una crescita, nella maggior parte dei casi, inferiore al substrato di riferimento (CYA) solamente LB8/99 ha avuto uno sviluppo simile, mentre Euf p11 e Isci 1a leggermente inferiore.

Appena il 15% degli isolati ha evidenziato una scarsa produzione di acidi *in vitro*, mentre circa l'85% presenta una buona capacità di acidificazione del substrato.

La produzione di metaboliti basici (dopo 21 giorni) risulta invece meno omogenea: in generale gli isolati sensibili hanno mostrato un cambiamento di colore più accentuato rispetto agli isolati resistenti (R e RR) (Tab.8).

CREA				
		Crescita	Produzione di acidi	Produzione di basi
CBS	S	-	++	+
Cadrp28	RR	-	++	+
Euf p3	RR	-	++	+++
Emfp6	S	-	++	-
Eufp11	R	+	+	++
Isci 1a	R	+	-	+++
Isci 1b	R	-	++	++
Isci 2	S	-	++	+++
Isci 4	R	-	++	++
Isci 6	RR	-	++	+
Isci9	R	-	++	+
Isci 11	R	-	+	+
Isci 12	S	-	++	+++
Isci 13	S	-	++	+
Lb 8/99	S	++	++	++
P4	RR	-	+	+++
P6	R	-	-	+++
P7	S	+	-	+++
P32	R	-	++	+++
P37	R	-	++	-/+

Tabella 8 - Influenza del substrati di crescita (CREA e CYA) sullo sviluppo delle colonie di *Penicillium expansum* e produzione *in vitro* di acidi e basi

Crescita: (++) uguale a CYA
(+) un po' meno di CYA
(-) meno di CYA

Acidi: (++) abbondante alone (> 10cm oltre la colonia),
(+) alone medio (1-10 cm oltre colonia), (-) sotto la colonia

Basi: (+++) viola scuro,
(++) viola medio scuro,
(+) viola chiaro,
(-/+) giallo chiaro con qualche venatura viola,
(-) giallo

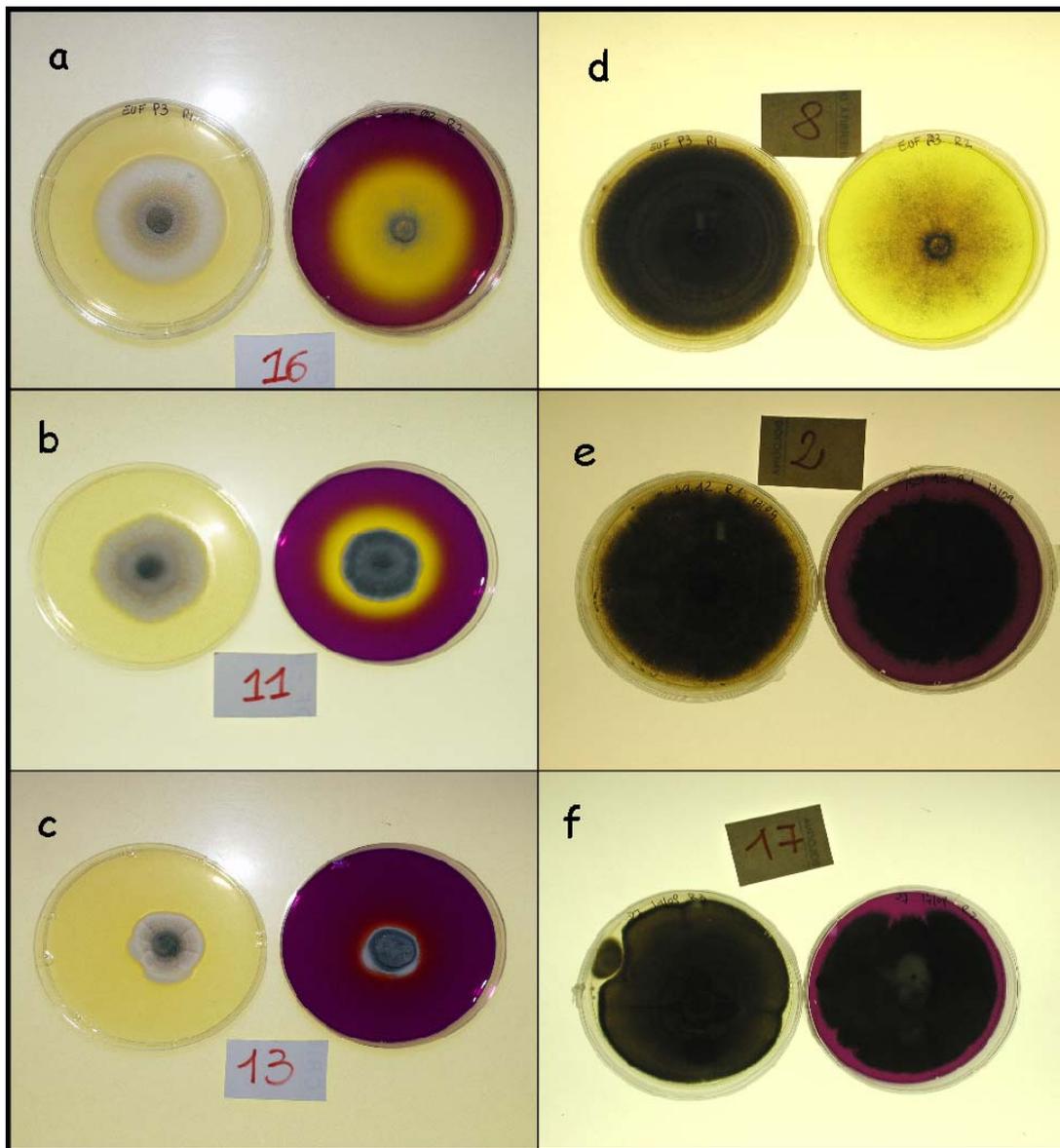
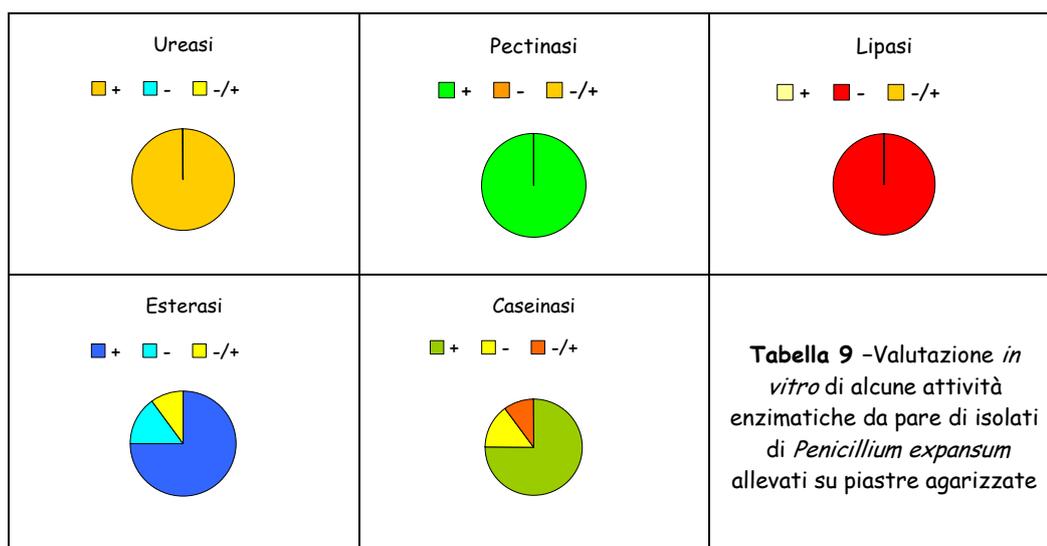


Figura 21 - Alcuni esempi della capacità di modificare il pH del substrato CREA da parte di isolati di *Penicillium expansum*
 a, b, c : dopo 7 giorni a 20°C (Euf p3, Isci 12, P7)
 d, e, f : dopo 21 giorni a 20°C (Euf p3, Isci 12, P7)

4.5 ATTIVITA' ENZIMATICHE IN *P. EXPANSUM* SU PIASTRA AGARIZZATA

In un saggio preliminare sono state studiate le attività enzimatiche dei ceppi di *P. expansum*. Dai dati emerge la capacità di tutti gli isoaltri produrre ureasi e pectinasi, viceversa non è stata evidenziata la presenza di lipasi. Maggiore eterogeneità nei risultati relativi all'attività dell' esterasi e caseinasi. Nel primo caso il 50 % degli isolati di tipo R o RR e il 68% degli isolati di tipo S ha sviluppato una attività esterasica , evidenziando una reazione marcatamente positiva, Solo due isolati (Euf p3-RR e P32-R) hanno mostrato un alone ridotto. Mentre per gli isolati S (Emf p6, Isci 12, Lb 8/99) le prove hanno dato una risposta negativa. I risultati relativi all'idrolisi della caseina sono ancor meno uniformi, infatti il ceppo di *P. expansum* di riferimento CBS ha evidenziato una reazione "debolmente" positiva, per gli altri isolati il 40% dei R e RR ha reagito positivamente mentre tra gli isolati sensibili la metà ha mostrato una reazione positiva e contrariamente l'altra metà, negativa.



4.6 CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO ENZIMATICO DI *P. EXPANSUM* MEDIANTE METODO CUP-PLATE

4.6.1. Determinazione delle curve di taratura tramite il metodo 'Cup Plate'

Le curve di taratura per pectinasi, poligalatturonasi, cellulasi sono state determinate utilizzando diverse concentrazioni enzimatiche, in prove preliminari. Dai dati riportati in tabella 10, le curve ottenute hanno evidenziato indici di correlazione significativi e superiori allo 0.99

Pectinasi (PG) $r^2 = 0,9957$										
Conc. FDU μl^{-1}	[0,0006]	[0,0012]	[0,0018]	[0,0024]	[0,0032]	[0,0038]	[0,0044]	[0,0050]	[0,0056]	[0,0062]
Alone (\varnothing mm)	23,4	24,2	25,0	25,9	27,0	27,8	28,6	29,2	29,8	30,5
Poligalatturonasi (PGA) $r^2 = 0,9901$										
Conc. FDU μl^{-1}	[0,0006]	[0,0012]	[0,0018]	[0,0024]	[0,0032]	[0,0038]	[0,0044]	[0,0050]	[0,0056]	[0,0062]
Alone (\varnothing mm)	26,9	27,6	28,4	29,4	30,6	31,3	32,1	32,9	33,3	34,0
Cellulasi $r^2 = 0,9981$										
Conc. U μl^{-1}	[0,2]	[0,4]	[0,6]	[0,8]	[1,0]	[1,2]	[1,4]	[1,6]	[1,8]	[2,0]
Alone (\varnothing mm)	26,8	27,3	27,7	28,0	28,5	28,9	29,3	29,8	30,3	30,7

Tabella 10 - Determinazione del diametro degli aloni in relazione alla concentrazione enzimatica

4.6.2 Determinazione delle attività di pectinasi, poligalatturonasi e cellulasi negli isolati di *Penicillium expansum* tramite il metodo 'Cup Plate'

	PG		PGA		Cellulasi	
	mm	FDU μl^{-1}	mm	FDU μl^{-1}	mm	U μl^{-1}
CBS-S	22,9	0,24	18,4	0,29	26,7	0,66
Cadrp28-RR	23,7	1,24	20,2	1,18	26,9	1,26
Euf p3-RR	22,8	0,11	21,0	1,58	26,9	1,24
Emf p6-S	22,9	0,17	17,5	0,16	26,7	0,77
Eufp11-R	23,2	0,61	19,0	0,58	26,8	1,01
Isci 1a-R	0,0	nd	0,0	-	26,6	0,54
Isci 1b-R	23,6	1,11	20,4	1,28	26,8	1,08
Isci 2-S	22,9	0,24	18,0	0,09	0,0	-
Isci 4-R	23,0	0,30	18,9	0,53	26,8	1,01
Isci 6-RR	24,1	1,73	21,0	1,58	26,8	1,03
Isci 9-R	23,3	0,67	19,0	0,58	26,8	1,05
Isci 11-R	24,2	1,80	22,3	2,23	26,9	1,12
Isci 12-S	22,9	0,24	18,5	0,34	0,0	-
Isci 13-S	23,8	1,30	20,7	1,43	26,5	0,31
Lb 8/99-S	23,5	0,99	19,7	0,93	0,0	-
P4-RR	22,9	0,24	17,5	0,16	26,8	0,89
P6-R	23,2	0,61	18,7	0,43	26,9	1,15
P7-S	12,0	-	11,7	nq	0,0	-
P32-R	24,5	2,23	22,0	2,08	26,9	1,12
P37-R	24,3	1,98	21,7	1,93	26,9	1,19

Tabella 11 - Corrispondenza tra diametro dell'alone e concentrazione enzimatica *in vitro*

Nella tabella 10 si possono osservare i valori dei diametri degli aloni misurati e le relative concentrazioni enzimatiche (determinate tramite le curve di taratura, tabella 10) relative agli isolati di *P. expansum* allevati in brodo colturale.

I dati riportati evidenziano la presenza di attività enzimatica, per quanto riguarda sia le PGs, che le PGAs, fatta eccezione per Isci 1a-R e P7-S.

Per quanto riguarda l'attività delle cellulasi, nel 20% degli isolati saggati non è stata rilevata alcuna attività enzimatica.

4.7 INFLUENZA DEL PH DEL SUBTRATTO LIQUIDO SULL'ACCRESIMENTO DEL MICELIO

4.7.1 Influenza del pH iniziale

Il maggiore abbassamento di pH è stato registrato quando gli isolati sono stati allevati a pH 7,0, in tali condizioni ad eccezione di 4 isolati (Lb 8/99-S, Emf p6-S, Isci 9-R, P6-R) che hanno mantenuto il livello di pH costante, gli altri hanno prodotto un abbassamento significativo rispetto al pH iniziale, con una variazione media (Δ pH) di 2,34 punti di pH (Graf.3).

Quando gli isolati sono stati allevati in substrato liquido a pH 5,0 (considerato ottimale per lo sviluppo del fungo) è stato comunque registrato un abbassamento dei valori ma di minore intensità (0,46 punti) e inoltre per 2 ceppi non è stata registrata nessuna variazione (Emf p6-S, P6-R) (Graf.4)

In substrato liquido a pH 3,1 il fungo tendenzialmente non modifica più il il pH le variazioni evidenziate per alcuni isolati non sono risultate significative (Graf.5).

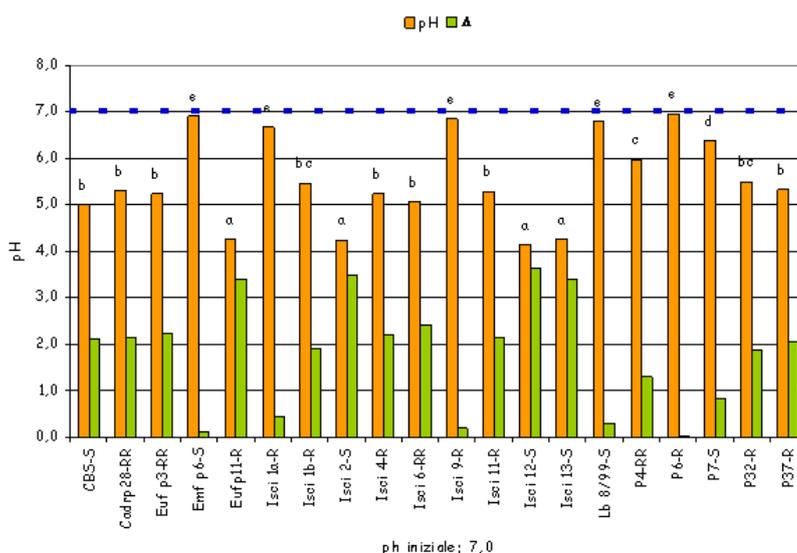


Grafico 3 - Variazione del pH del substrato liquido (YSM) di crescita da parte di isolati di *Penicillium expansum* (pH iniziale 7,0)

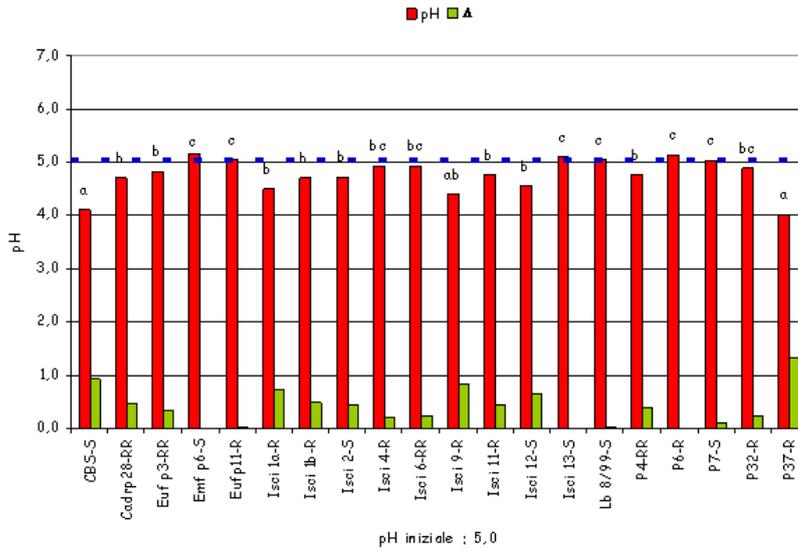


Grafico 4 - Variazione del pH del substrato liquido (YSM) di crescita da parte di isolati di *Penicillium expansum* (pH iniziale 5,0)

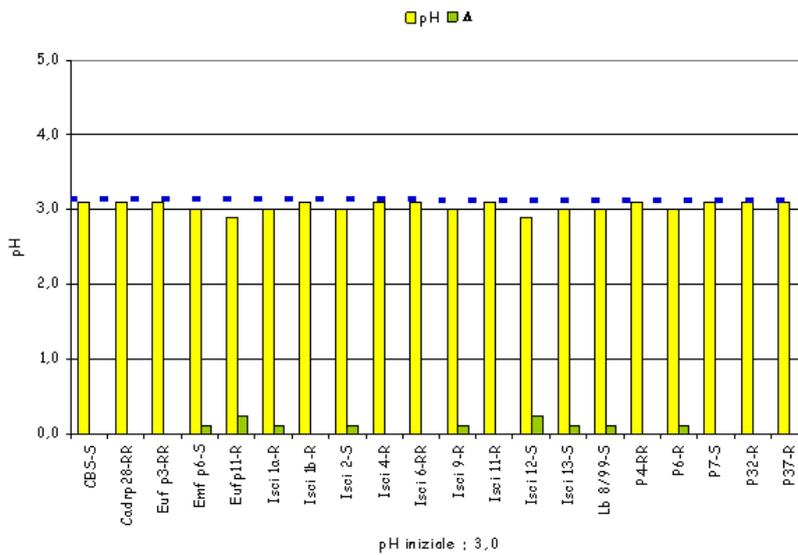


Grafico 5 - Variazione del pH del substrato liquido (YSM) di crescita da parte di isolati di *Penicillium expansum* (pH iniziale 3,0)

Il peso secco prodotto dagli isolati oggetto della sperimentazione è risultato maggiore quando il pH del substrato di crescita era pari a 5.0, seppur con una notevole variabilità tra i diversi isolati. Il peso secco minimo di 31 mg è stato ottenuto dall'isolato CBS-S, mentre il peso maggiore 266 mg dall'isolato Isci 12-S, nella maggior parte degli isolati il peso secco del micelio prodotto variava tra i 150 e 200 mg (Graf.6b).

Il fungo mostra maggiore difficoltà di crescita a pH 3,1, i valori del peso secco del micelio erano compresi tra i 27,5 mg (CBS-S) e i 175,7mg (Isci 1a-R) mentre le classi di frequenza di maggior peso sono quelle comprese tra gli 80 e i 100 mg (Graf.6c).

Una condizione intermedia è rappresentata a pH 7,0, in questo caso il range di sviluppo va dai 28,2 mg (CBS-S) sino a 204,9 mg (Isci 1a-R), le classi di maggiore rilevanza sono state quelle comprese tra i 120 -160 mg (Graf.6a).

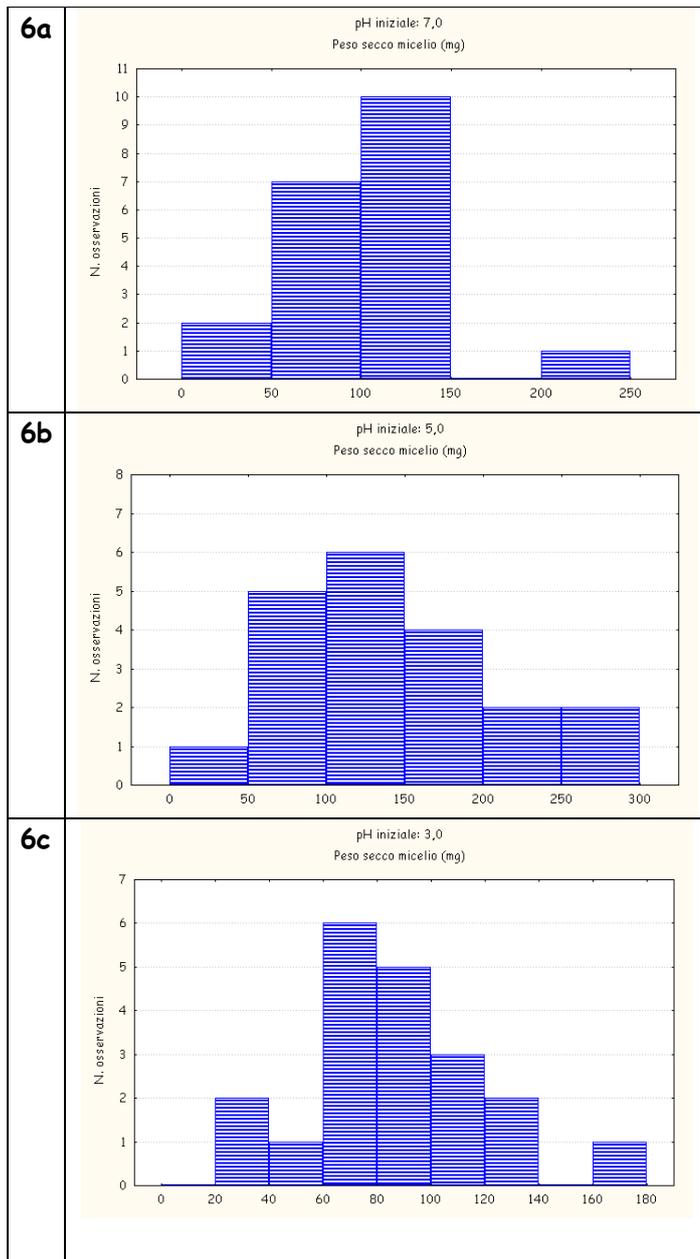
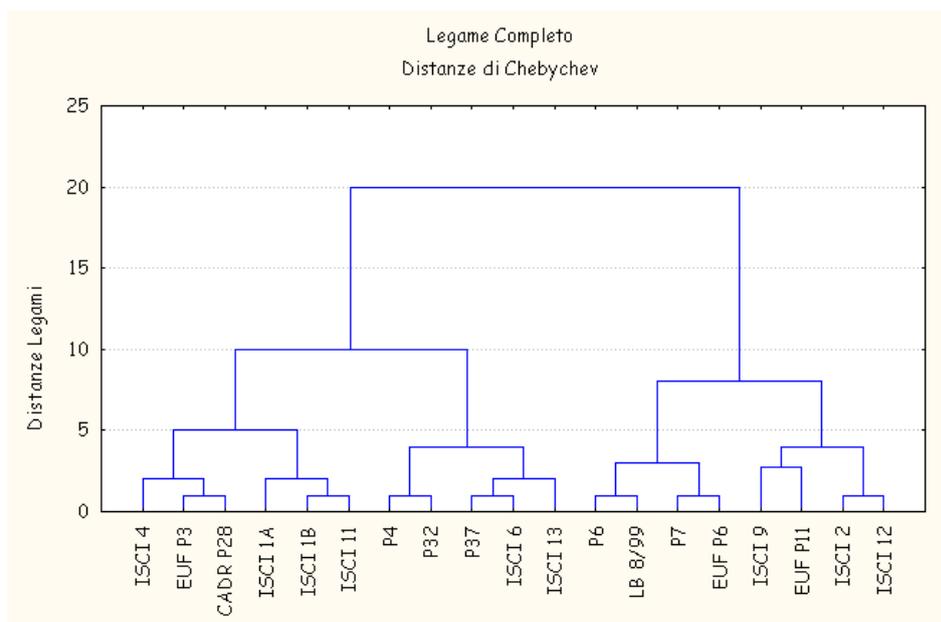


Grafico 6 (a,b,c) - Distribuzione nelle diverse classi di accrescimento (mg) dei ceppi allevati su substrato YSM a diversi tenori di pH iniziale

Dall'elaborazione statistica dei dati relativi sia all'accrescimento del micelio sia della modulazione del pH del liquido colturale, è stato ottenuto un dendrogramma che permette di individuare due distinti gruppi, mettendo in evidenza i ceppi di tipo S si trovano tutti raggruppati (ad eccezione di Isci 13-S) all'interno del medesimo gruppo (Graf.7)



4.7.2 Influenza del tempo sulla modulazione del pH

Il comportamento dei ceppi è stato analogo alla prova precedente, risulta evidente come l'abbassamento sia più accentuato nelle prime 48-72 ore, tendenzialmente il processo di acidificazione si prolunga tra il IV e il VIII giorno, seppur in misura più limitata (Graf.8)

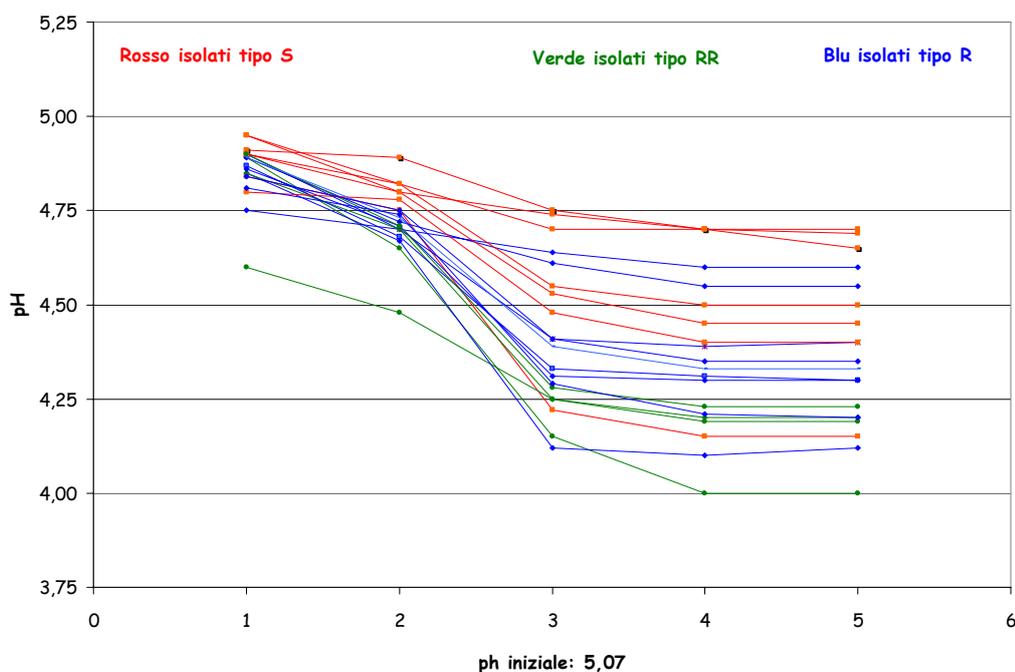


Grafico 8 - Andamento del pH nel tempo su substrato liquido YSM a 20°C

Anche la fase di accrescimento mostra un andamento generale simile a quello evidenziato dalla prova precedente, si rimarcano le differenze tra i ceppi, e generalizzando è possibile notare come la crescita più consistente sia concentrata attorno il II e III giorno (Tab.12).

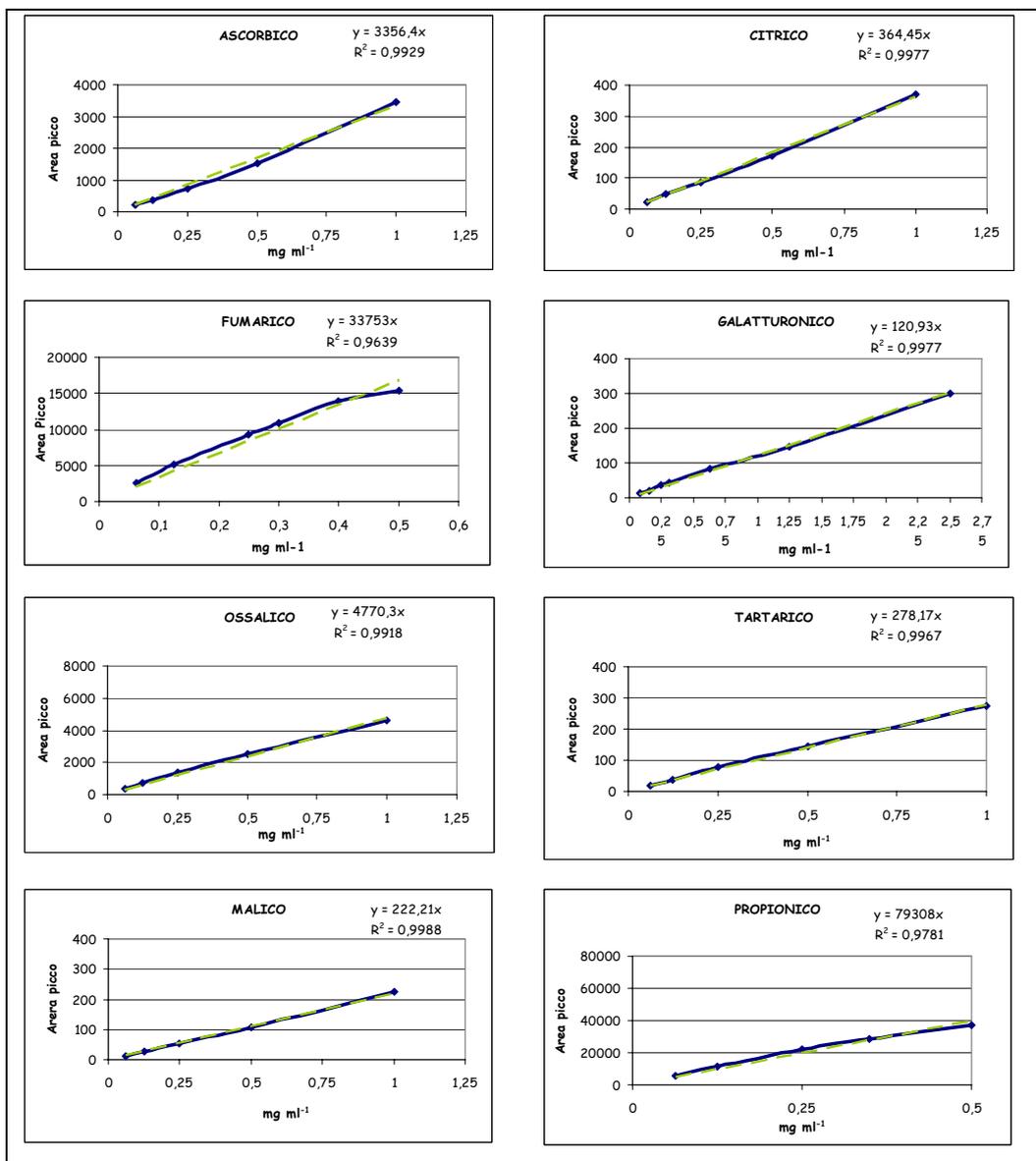
	24h	48h	72h	96h	168h
CBS-S	2,21	3,94	8	10,99	12,45
Cadrp28-RR	2,36	4	8,19	11	13,69
Euf p3-RR	2,57	3,93	7,9	12,77	13,37
Emf p6-S	2,35	2,99	7,65	10,26	12
Eufp11-R	2,28	3,05	7,41	10,2	12,04
Isci 1a-R	3,25	3,14	8,06	9,36	11,36
Isci 1b-R	3,04	3,15	8	10,58	12,58
Isci 2-S	3,51	4,02	8,15	10,59	11,25
Isci 4-R	2,89	3,18	7,14	11,02	12,98
Isci 6-RR	2,47	3,69	7,85	11,58	12,89
Isci 9-R	3,65	4,03	8,9	12,06	13,45
Isci 11-R	2,36	3,00	8,1	11,45	13,45
Isci 12-S	2,47	3,05	8	11	12,08
Isci 13-S	2,59	3,14	6,11	10,14	11,18
Lb 8/99-S	2,83	4	8,1	9,1	11,17
P4-RR	2,08	3,00	6	12,03	13,25
P6-R	2,07	3,07	8,1	12	13
P7-S	3,5	3,2	6,6	8,4	13,57
P32-R	2,39	3,25	6,4	12,48	13,78
P37-R	2,25	5,15	7,07	10,4	13,73

Tabella 12 - Accrescimento giornaliero (mg di peso secco) su substrato YSM a 20°C

4.8 DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI ORGANICI PRODOTTI SU SUBSTRATO YSM

La determinazione degli acidi organici è stata eseguita per HPLC-DAD,

4.8.1 Curve di taratura degli acidi organici utilizzati



4.8.2 Produzione di acidi organici in relazione al pH iniziale

I ceppi testati a diverse condizioni di pH iniziale (7,0, 5,0, 3,0), hanno mostrato una produzione variabile generalizzata di: acido malico, citrico e succinico, in alcuni casi è stata rilevata anche la presenza seppur in tracce di acido ossalico e fumario e propionico.

Si nota una variazione della concentrazione di acidi organici in funzione del pH del substrato, infatti mentre a pH 7,0 si evidenzia una più intensa produzione di acido malico e succinico e in minor misura di acido citrico (Graf.9), in condizioni di pH 5,0, la produzione di succinico è stata molto limitata e non presente in tutti i ceppi, mentre la concentrazione di acidi malico e citrico tende ad aumentare, non si rilevano tracce di acido ossalico e propionico (Graf.10).

La terza condizione di pH iniziale a 3,0 presenta un profilo cromatografico più semplificato con una produzione di acido citrico simile a quella a pH 5,0, superiore per il malico, ma inferiore per quanto riguarda succinico (Graf. 11).

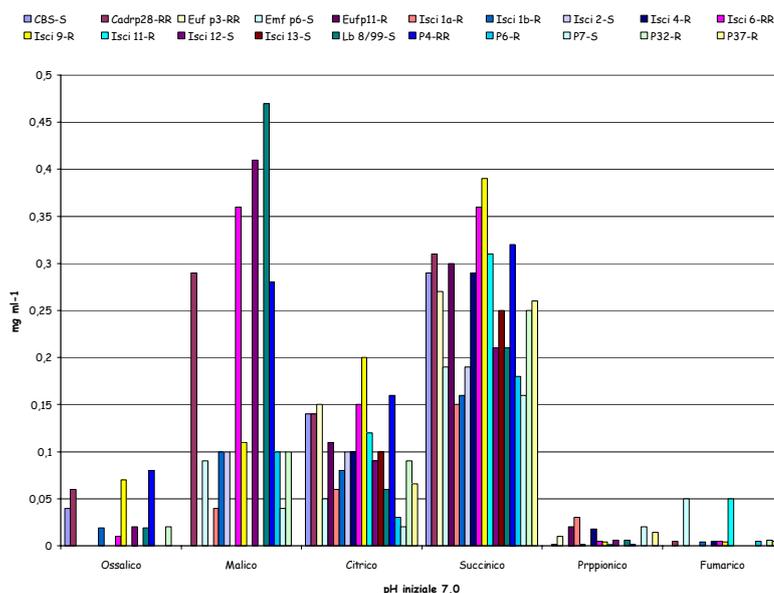


Grafico 9 - Produzione di acidi organici a pH 7,0

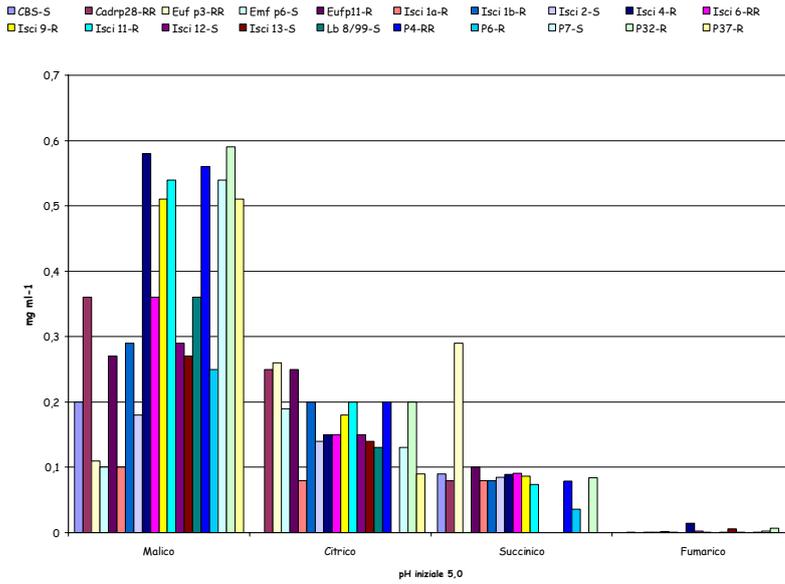


Grafico 10 - Produzione di acid organici a pH 5,0

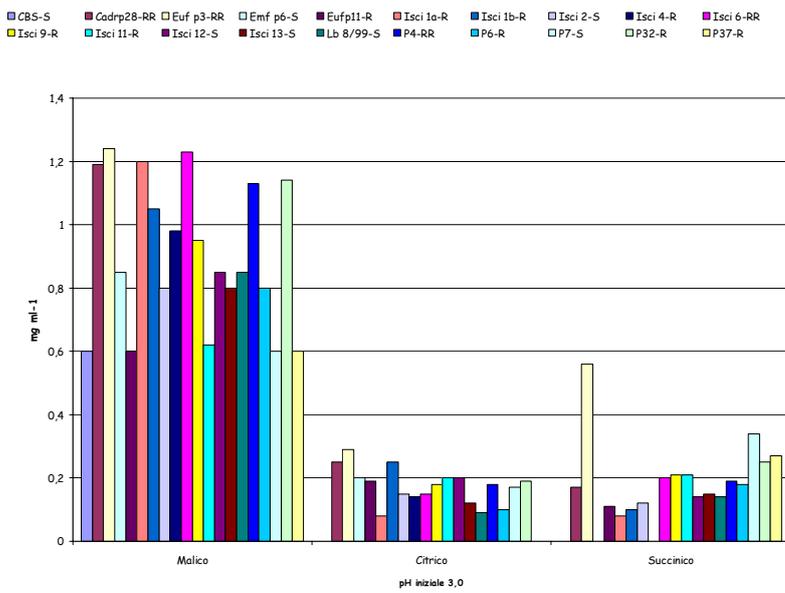
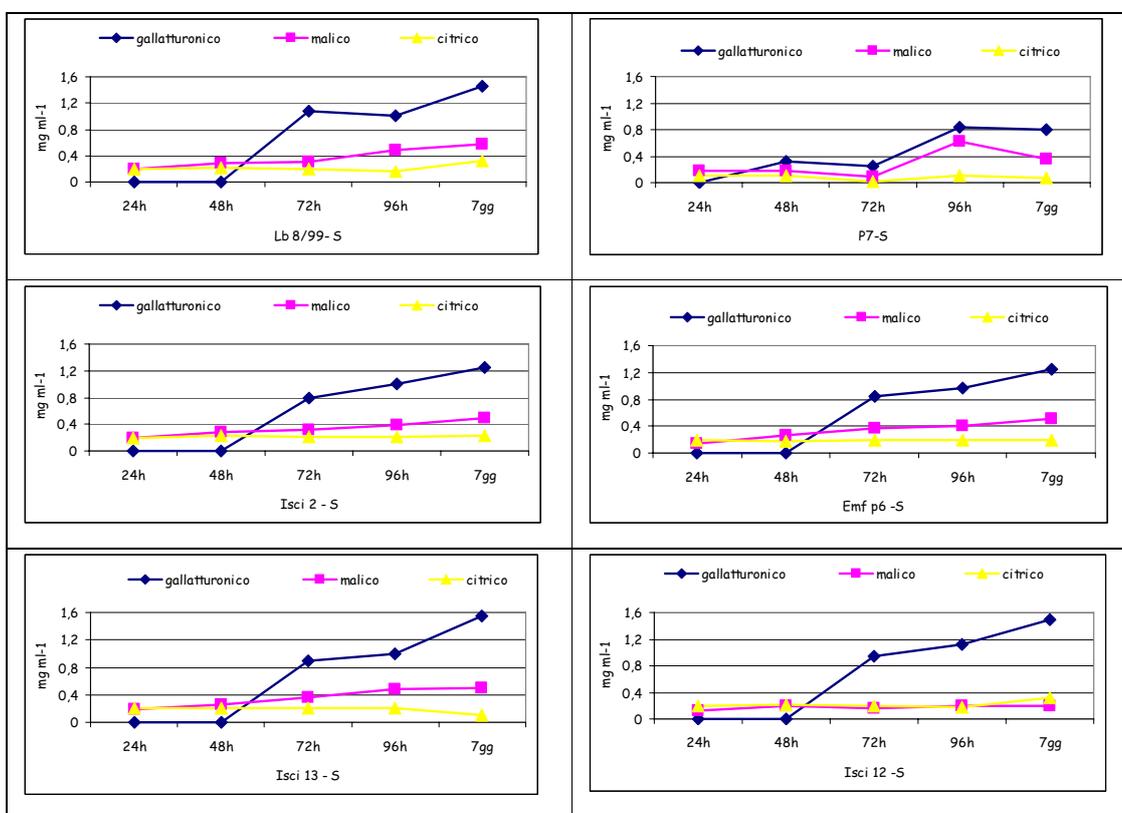


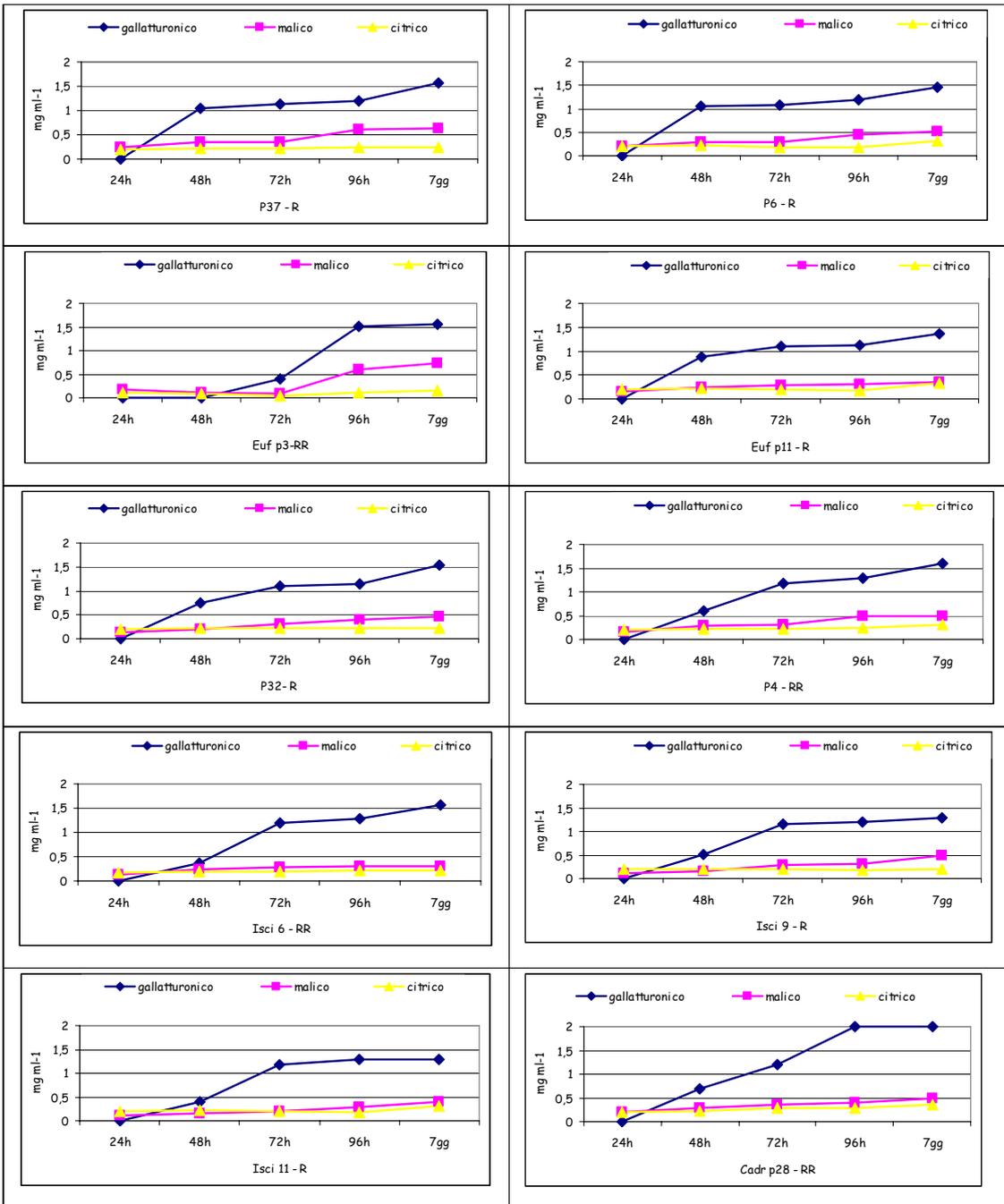
Grafico 11 - Produzione di acidi organici a pH 3,0

4.8.3 Produzione di acidi organici nel tempo

Il fattore tempo determina un notevole mutamento del profilo cromatografico, dopo le prime 24 ore, soprattutto si assiste ad una riduzione della concentrazione di acido succinico e tra le 48-72 ore ad un incremento repentino della presenza di acido galatturonico, ma anche di acido malico, mentre l'acido citrico rimane più o meno costante o in alcuni casi a subire un lieve incremento. Tendenzialmente i ceppi di tipo S sembrano presentare un lieve ritardo nella fase iniziale di accumulo di acido galatturonico (Tab.13).

Tabella 43 - Produzione di acido organici degli isolati di *P. expansum* nel tempo





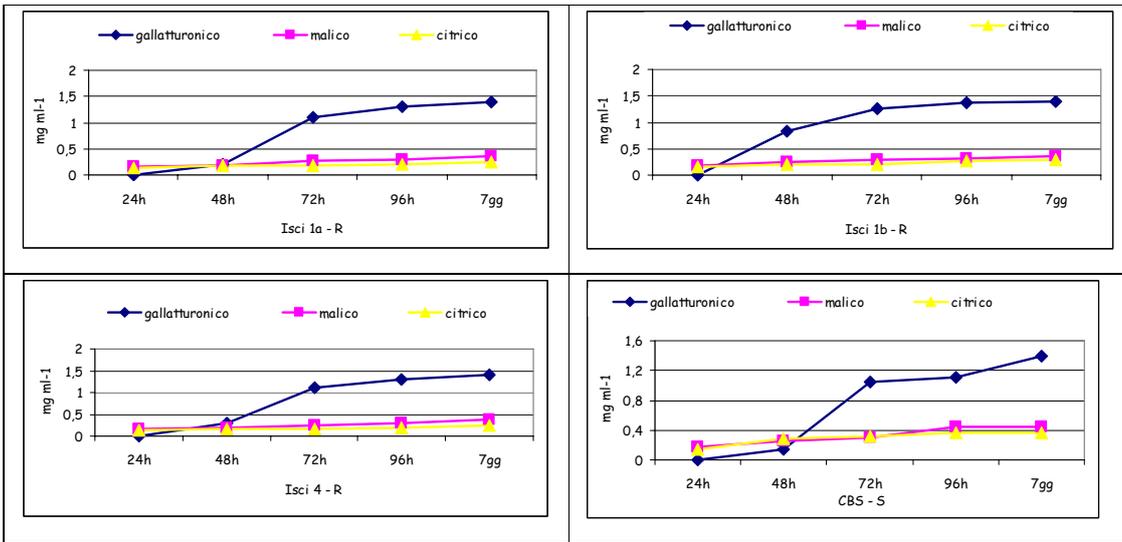
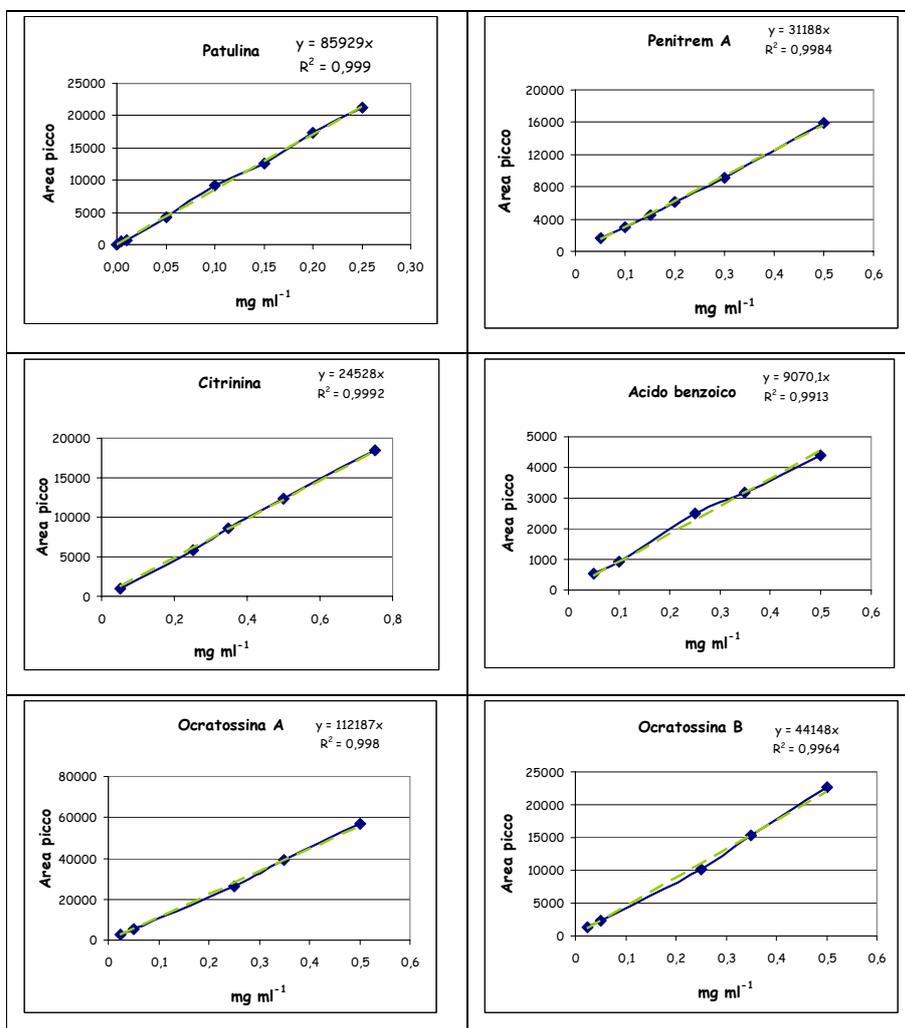


Tabella 53 - Produzione di acido organici degli isolati di *P. expansum* nel tempo

4.9 Valutazione delle capacità tossigene dei ceppi di *P. expansum*

4.9.1 Curve di taratura degli standards



4.9.2 Metaboliti presenti nell'estratto di colture pure di *P. expansum*

Le analisi cromatografiche degli estratti di colture pure dei ceppi di *P. expansum* hanno rilevato la presenza di patulina e penitrem A, viceversa non sono stati individuati picchi con tempi di ritenzione (t_r) corrispondenti agli altri metaboliti ricercati (Ocratossina A eB, Citrinina, Ac. Benzoico).

Anche se con una certa variabilità tutti gli isolati si sono dimostrati in grado di produrre patulina (Graf. 12). Nonostante la presenza di isolati come P7-S, CBS-S, Isci 1a-R, caratterizzati da una scarsa produzione (2,4-7,4-8,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ rispettivamente), la concentrazione di patulina è risultata sempre piuttosto consistente, con quantitativi medi attorno ai 316 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

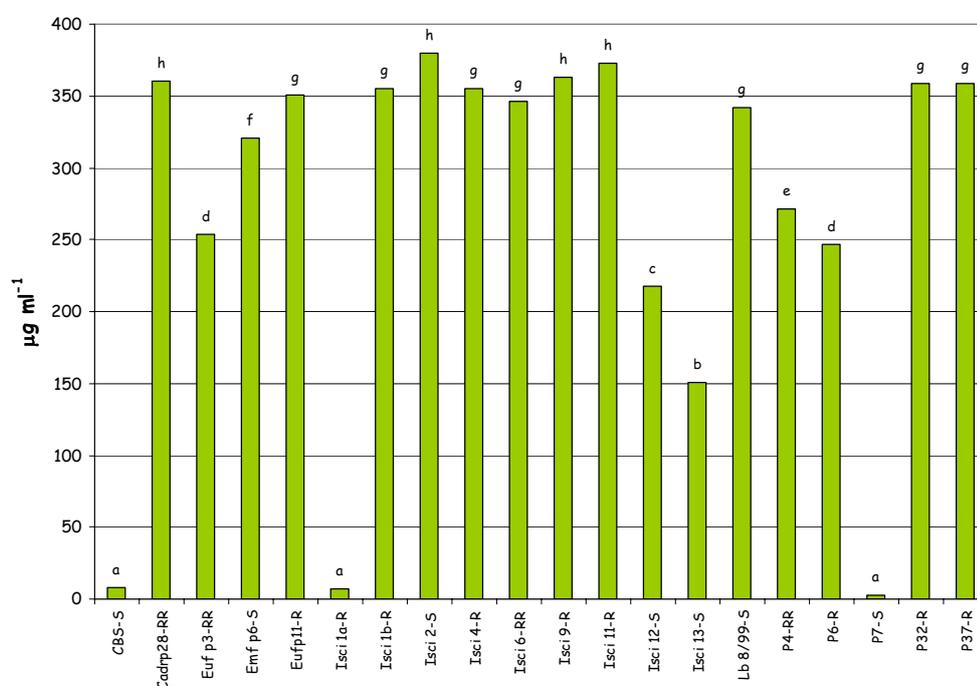


Grafico 12 - Produzione di patulina dei ceppi di *P. expansum* allevati su MEA a 20°C

Oltre la produzione di patulina è stata rilevata anche la presenza di penitrem A, in questo caso il metabolita non è presente in tutti i campioni analizzati nel 25% dei casi non è stata rilevata la sua presenza (Graf.13). Quando presente la concentrazione risulta comunque piuttosto contenuta e relativamente variabile, nel caso dei ceppi di tipo S come Lb 8/99, Emf p6 e Isci 12 è stata evidenziata una maggiore concentrazione. Inoltre non è stata rilevata nessun tipo di correlazione tra il contenuto di patulina e penitrem A.

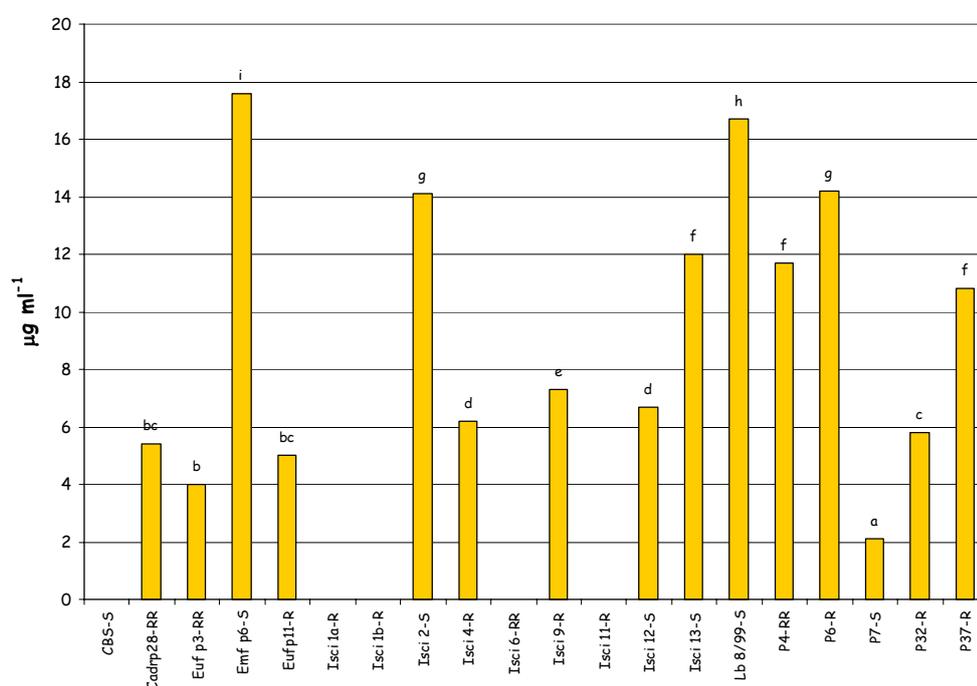


Grafico 13 - Produzione di Penitrem A dei ceppi di *P. expansum* allevati su MEA a 20°C

4.10 RISULTATI PROVE

IN VIVO

4.10 SVILUPPO DEL PATOGENO SU PERE CV "CONFERENCE"

Tutti gli isolati testati su frutti di pera, presentano elevate percentuali di infezioni, con valori compresi tra il 62,3% (P6-R) sino al 100% (P32-R, Isci 1b-R, Isci 13-S) (Graf.14). La severità della malattia espressa come diametro della lesione risulta essere piuttosto variabile con valori compresi tra 13,8 mm dell'isolato P7-S sino ai 34,4 mm per Isci 1b-R (Graf. 15).

Dall'analisi statistica dei risultati ottenuti non è stata evidenziata nessuna correlazione tra l'incidenza della malattia (% di frutti infetti) e il tipo di isolato (S, R, RR), mentre analizzando la loro aggressività, intesa come estensione della lesione (mm), R e RR sono generalmente caratterizzati da una da lesioni di maggiori dimensioni, comprese tra 36 mm (Isci4) e 29 mm (Isci 9) mentre negli isolati di tipo S lo sviluppo diametrico varia dai 14 mm (P7) ai 25 mm (Lb8/99).

I due parametri di valutazione non risultano però correlati fra di loro, infatti isolati come P6-R che ha dato la minor % di frutti infetti (62,3%) ha uno sviluppo diametrico significativamente superiore (30 mm) rispetto a isolati come Emfp6-S che presenta un'incidenza della malattia del 92 % ma con una lesione di soli 20 mm.

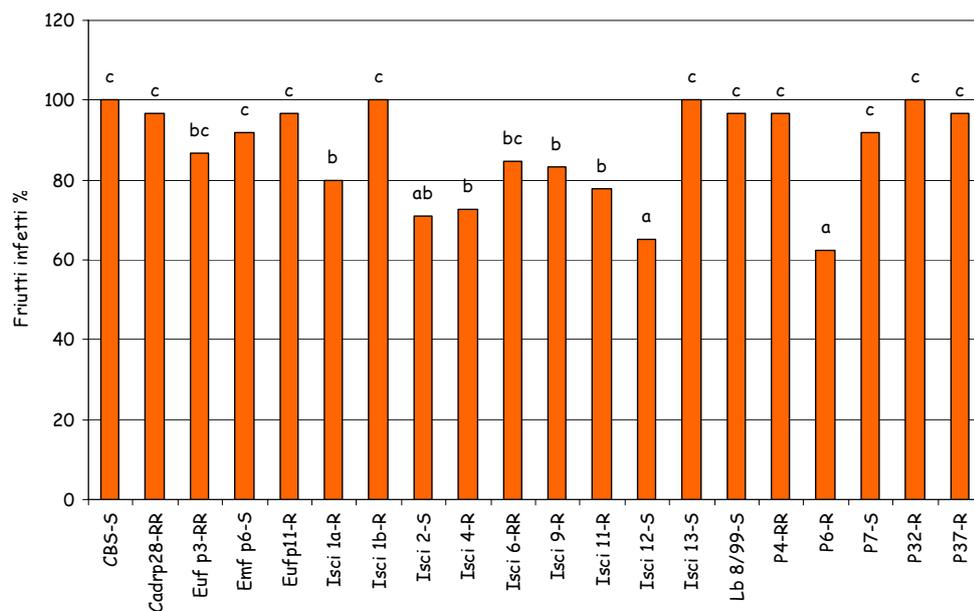


Grafico 14 - Incidenza della malattia (%) su frutti inoculati artificialmente dopo 7 giorni a 20°C

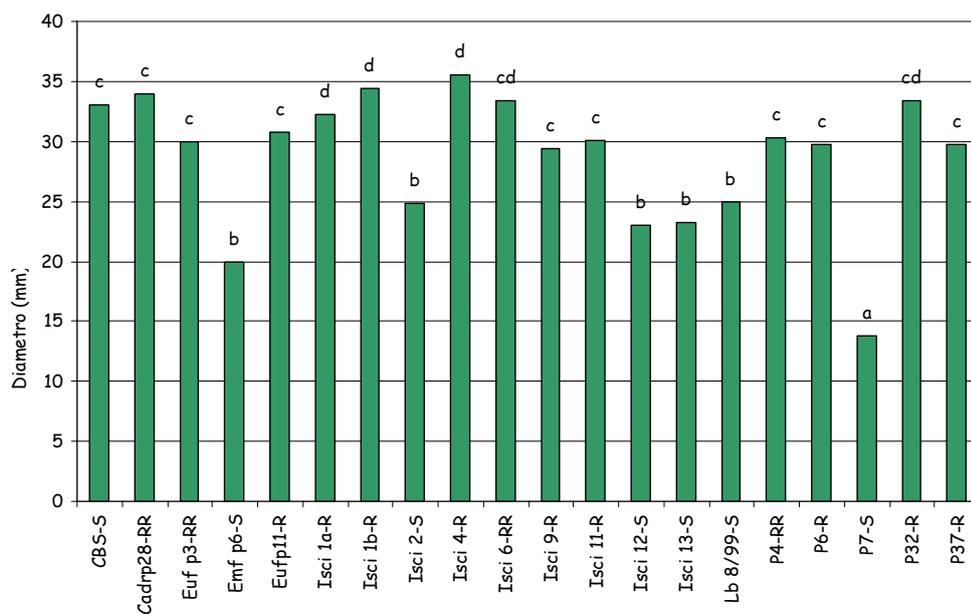


Grafico 15 - Severità della lesione causata dai ceppi di *P. expansum* a 20°C dopo 7 giorni

4.11 MODULAZIONE DEL PH NEL FRUTTO INFETTO

4.11.1 Cambiamento temporale del pH nel tessuto infetto e nel tessuto sano

Per verificare la variazione di pH nel frutto, sono stati inoculati frutti di pera feriti artificialmente, e messi in conservazione per 7-15 giorni a 20°C. La misurazione del pH è stata fatta frutto per frutto direttamente nel punto di ferita (Tab.14), e nel tessuto sano limitrofo alla lesione. L'abbassamento di pH interessa sia il punto centrale di sviluppo della lesione, ma gradualmente nel tempo anche il tessuto sano circostante la ferita.

	0 giorni	7 giorni		10 giorni		15 giorni	
	<i>Frutto sano</i>	<i>Tessuto infetto</i>	<i>Tessuto sano</i>	<i>Tessuto infetto</i>	<i>Tessuto sano</i>	<i>Tessuto infetto</i>	<i>Tessuto sano</i>
CBS-S	5,25	4,11	4,72	4,1	4,62	4,09	4,26
Cadrp28-RR	5,25	3,93	4,78	3,93	4,69	3,83	4,60
Euf p3-RR	5,25	3,84	4,87	3,82	4,82	3,82	4,65
Emf p6-S	5,25	3,84	4,76	3,85	4,76	3,95	4,71
Eufp11-R	5,25	3,77	4,95	3,8	4,84	3,93	4,79
Isci 1a-R	5,25	4,41	4,9	4,41	4,8	4,43	4,74
Isci 1b-R	5,25	3,92	4,81	3,92	4,75	3,81	4,58
Isci 2-S	5,25	3,97	4,73	3,96	4,72	3,94	4,71
Isci 4-R	5,25	3,77	4,95	3,8	4,61	3,86	4,54
Isci 6-RR	5,25	4,04	4,9	4,03	4,89	4,00	4,85
Isci 9-R	5,25	4,02	4,89	4	4,85	3,94	4,74
Isci 11-R	5,25	3,93	4,97	3,93	4,68	3,97	4,64
Isci 12-S	5,25	3,91	4,76	3,91	4,8	3,97	4,94
Isci 13-S	5,25	3,97	4,78	3,95	4,78	3,92	4,99
Lb 8/99-S	5,25	3,86	4,58	3,84	4,6	3,82	4,68
P4-RR	5,25	3,99	4,87	3,95	4,82	3,95	4,70
P6-R	5,25	4,07	4,98	4,06	4,85	4,05	4,67
P7-S	5,25	3,97	4,72	3,96	4,72	3,95	4,71
P32-R	5,25	3,78	4,75	3,8	4,79	3,93	4,90
P37-R	5,25	3,84	4,9	3,84	4,688	3,85	4,5728

Tabella 14 - Misurazione del pH su frutti di pera cv "Conference" i inoculati e conservati a 20°C per 7,10,15 giorni

Inoltre nel tessuto infetto l'abbassamento risulta concentrato prevalentemente nei primi 7 giorni dal momento di inoculo, e nel periodo successivo il pH tende ad assestarsi o a subire una lieve variazione (Graf.16a)

Al contrario nel tessuto sano l'abbassamento risulta molto più graduale nel tempo(Graf.16b)

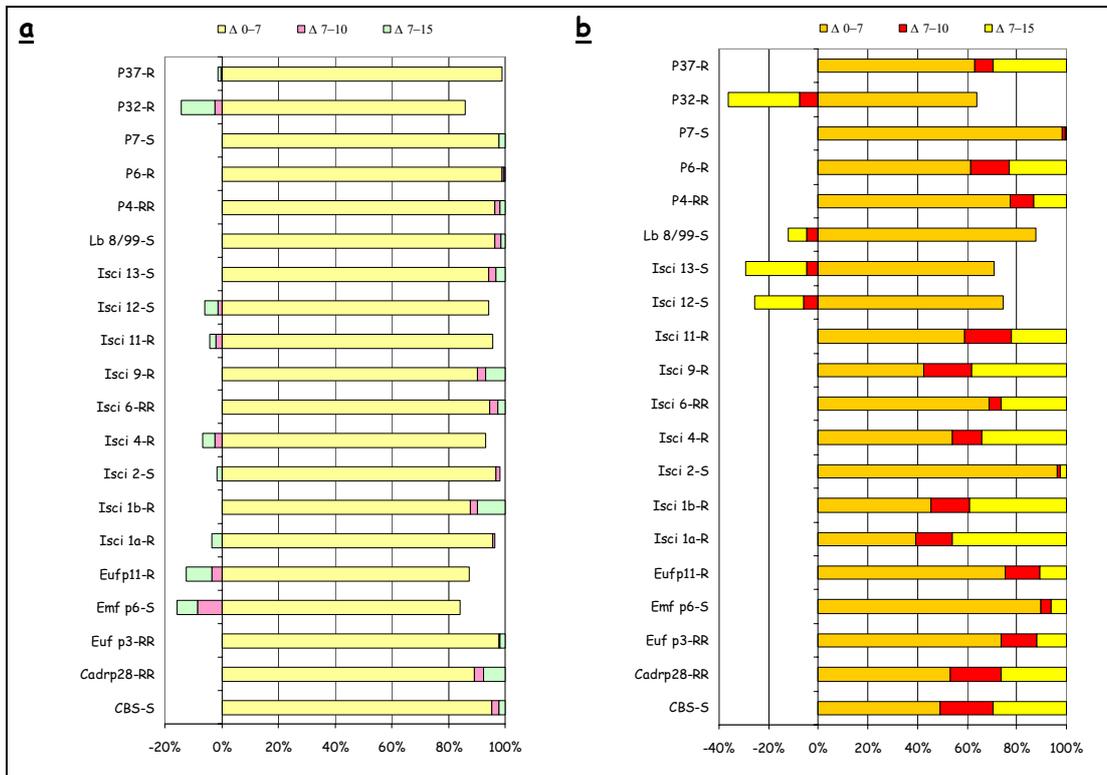


Grafico 16 (a,b) - Contributo % del fattore tempo sulla modulazione del pH del frutto nel tessuto infetto (a) e nel tessuto sano (b)

4.11.2 Accrescimento del patogeno

Parallelamente alla determinazione del pH è stato valutato il relativo sviluppo del patogeno. Dai dati riportati nel grafico 17 si conferma nel primo controllo a 7 giorni un minor sviluppo della lesione tra gli isolati di tipo S fatta eccezione per il ceppo CBS, mentre per R e RR i valori tendono ad essere più uniformi. Nel periodo

successivo dopo 10 il risultati sono simili, mentre al terzo controllo dopo 15 giorni, questa differenza generalizzata di crescita tra S e R tende ad attenuarsi.

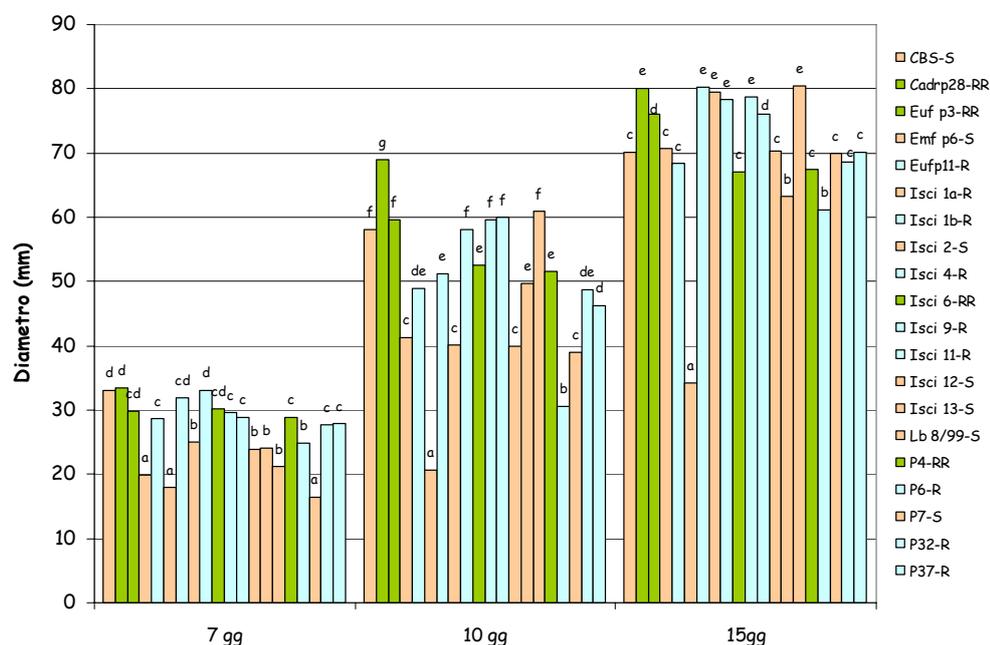


Grafico 17 - Sviluppo diametrico della lesioni su frutti di pera cv "Conference" nel corso della conservazione a 20°C

4.11.3 Determinazione degli acidi organici prodotti dal patogeno su substrato naturale

Il profilo cromatografico degli acidi organici presenti nei campioni ottenuti da frutti di pera conservati per 7 giorni a 20°C risulta notevolmente variegato (Graf. 18), data le caratteristiche del substrato inoculato, ricco per sua natura di acidi organici, il profilo cromatografico appare normalmente più complesso e di minor comprensione rispetto al profilo ottenuto su substrato artificiale (MEA). Ciò che emerge rispetto alle condizioni in vitro è da un lato l'assenza di acido succinico, dall'altro la presenza di acidi tartarico. Inoltre si evidenzia la presenza in tracce di

acido fumarico ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) presente in maniera omogenea in tutti gli isolati (dati non mostrati).

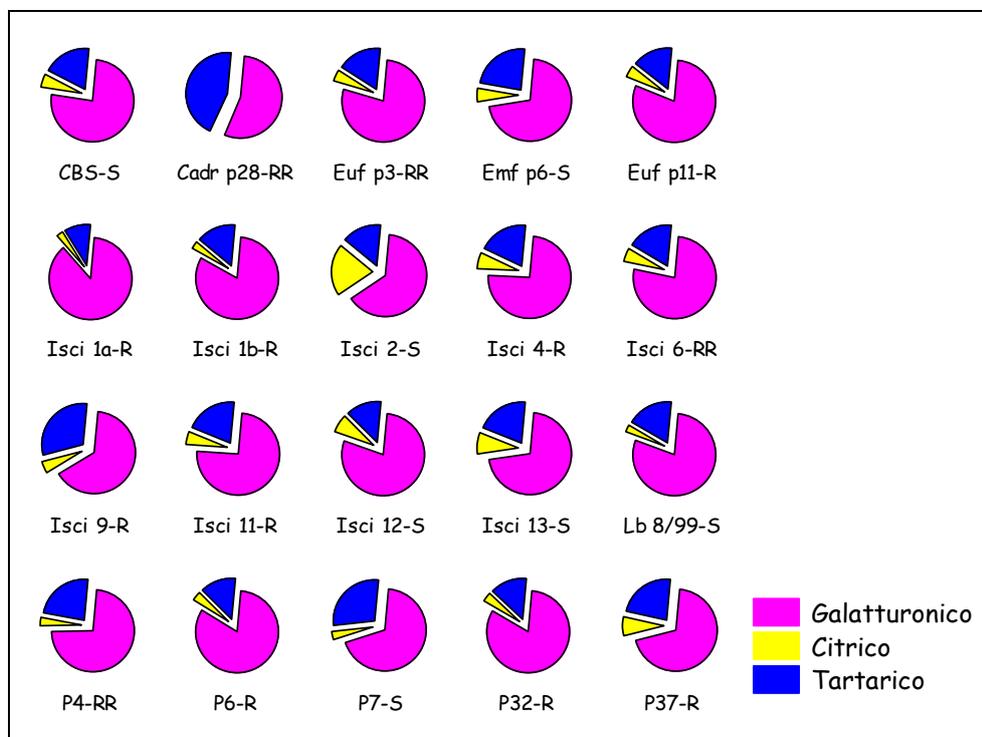


Grafico 18 - Acidi organici prodotti da *P. expansum* su frutti di pera "Conference" dopo 7 giorni a 20°C

Inoltre i dati ottenuti mostrano un calo piuttosto consistente della concentrazione di acido malico rispetto allo standard eseguito con la polpa omogenata non inoculata (Graf.19).

4.11.4 Produzione di acidi organici in relazione al fattore tempo

Anche sui frutti, l'abbassamento prevalente di pH è compreso tra le 48 e le 72 ore dal momento di inoculo, in corrispondenza dell'aumento della concentrazione di acido galatturonico, tartarico e citrico e della presenza seppur in tracce di acido fumarico.

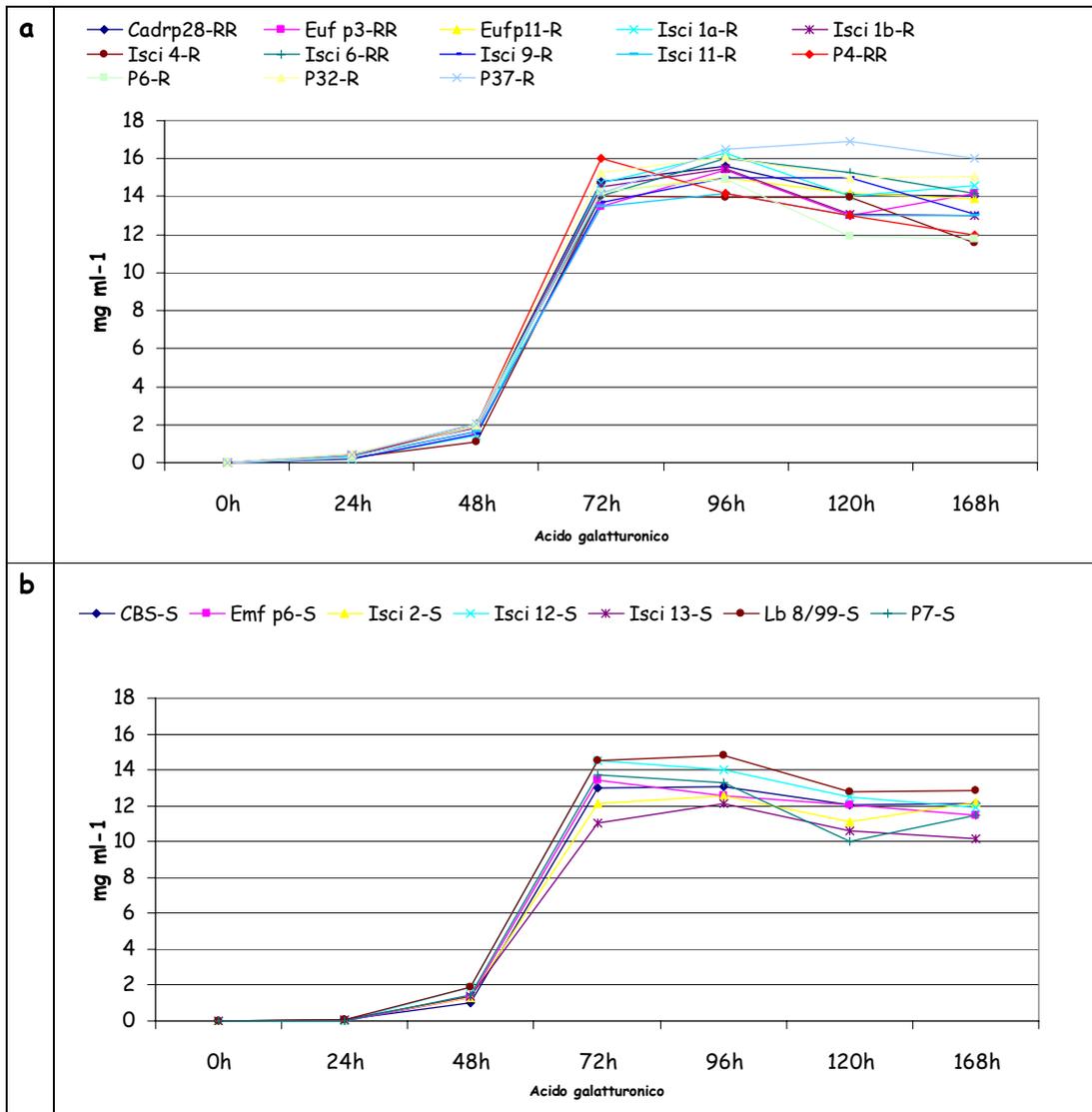


Grafico 19 (a,b) – Andamento della produzione di acido galatturonico nei frutti di pera inoculati con gli isolati di *P. expansum*

Negli isolati di tipo R e RR e sono state rilevate tracce di acido galatturonico già nelle prime 24 ore (media 0,35 mg ml⁻¹), che tra le 48 e le 72 incrementa in misura esponenziale (media 14,36 mg ml⁻¹), l'incremento continua sino alle 96 (media 15,28 mg ml⁻¹), per poi cominciare a calare.

Mentre negli isolati di tipo S sino alle 24 ore solo per alcuni sono state rilevate tracce di acido galatturonico (0,04 mg ml⁻¹), imputabili alla presenza del patogeno, la sua produzione inizia solo nelle 48 ore successive (13,17 mg ml⁻¹), e a differenza di quanto accade per gli isolati di tipo R o RR tra le 72 e le 96 ore la concentrazione tende a rimanere invariata attorno a valori medi di 13,21 mg ml⁻¹, per poi calare nelle ore successive.

Oltre alla presenza di acido galatturonico, sono stati rilevati quantitativi significativi sia di acido citrico, sia tartarico.

La formazione di acido citrico inizia attorno alle 24 ore e si protrae sino alle 96 ore, sono stati rilevati per gli isolati tipo R e RR livelli significativamente superiori rispetto ai tipo S: 0,30 mg ml⁻¹ contro 0,15 mg ml⁻¹. Nelle ore successive tale differenza viene a scomparire (Graf. 20 a,b).

La concentrazione di acido tartarico comincia ad essere significativamente rilevabile dopo le 48 ore solo per gli isolati di tipo S anche se solo in tracce (Graf. 21 a,b). Un certo incremento produttivo viene rilevato nelle ore tra le 48-72 ore senza significative differenze tra i diversi isolati (media 1,32 mg ml⁻¹). Tra le 96 e le 120 ore si raggiunge una fase stazionaria che nel caso degli isolati S si protrae nelle ore successive, mentre per R e RR dopo le 120 ore è stato rilevato un ulteriore incremento di concentrazione (media 1,85 mg ml⁻¹).

Da evidenziare inoltre come la produzione d'acido malico risulti limitata alle prime 24 ore per gli isolati R e RR e sino a 48 ore per gli isolati S, successivamente subisce un drastico calo con consumo non solo di ciò che era stato prodotto dal fungo, ma anche di quello presente nel frutto (Graf.22 a,b).

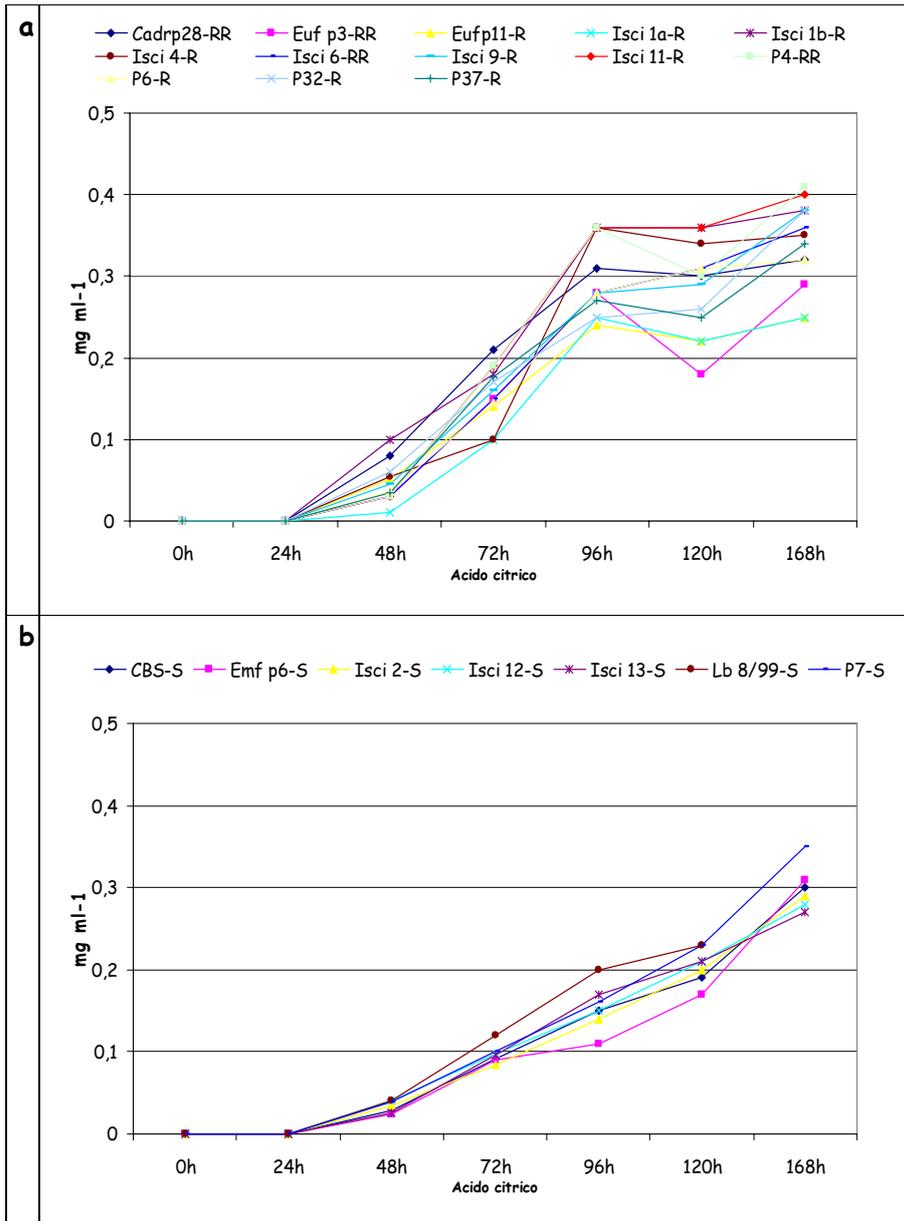


Grafico 20 (a,b) - Andamento della produzione di acido citrico nei frutti di pera inoculati con gli isolati di *P. expansum*

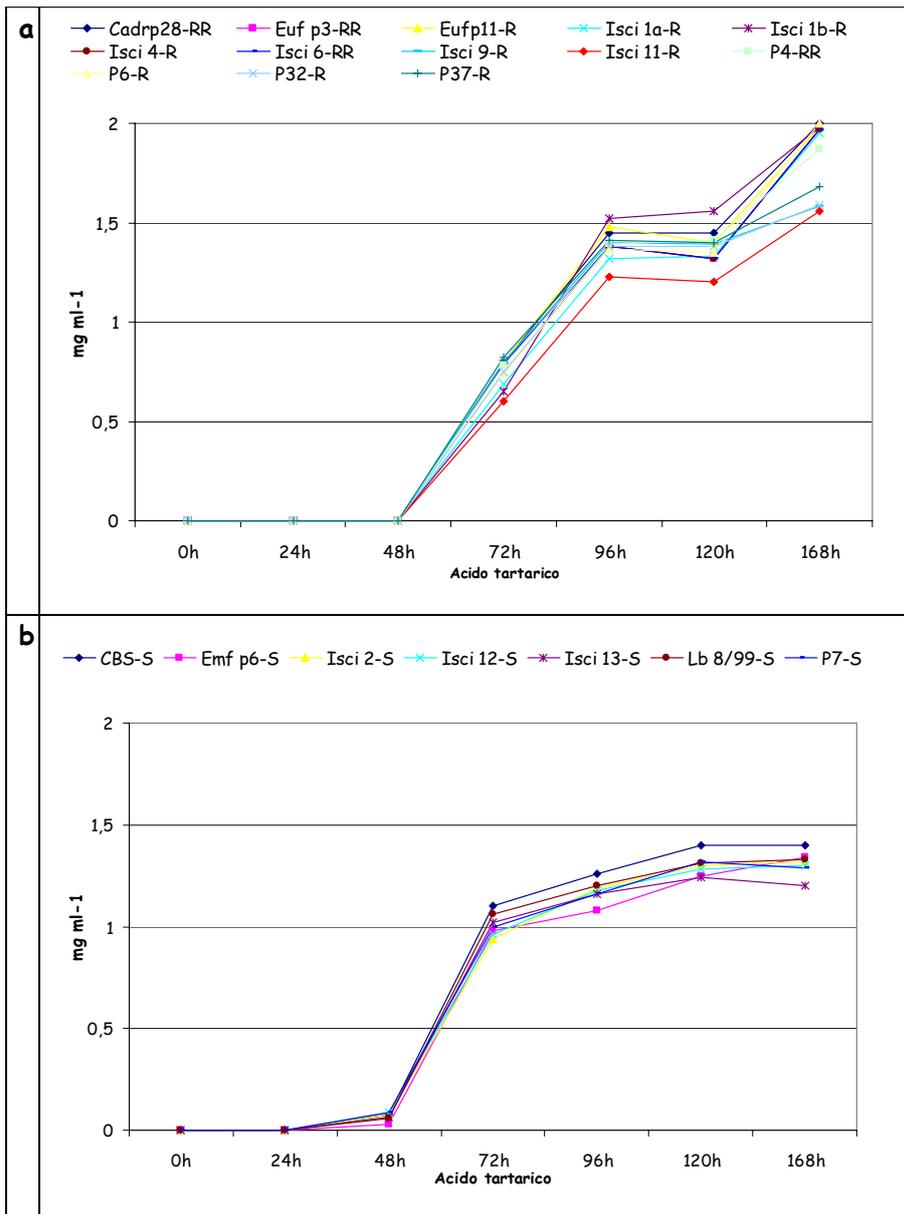


Grafico 21 (a,b) - Andamento della produzione di acido tartarico nei frutti di pera inoculati con gli isolati di *P. expansum*

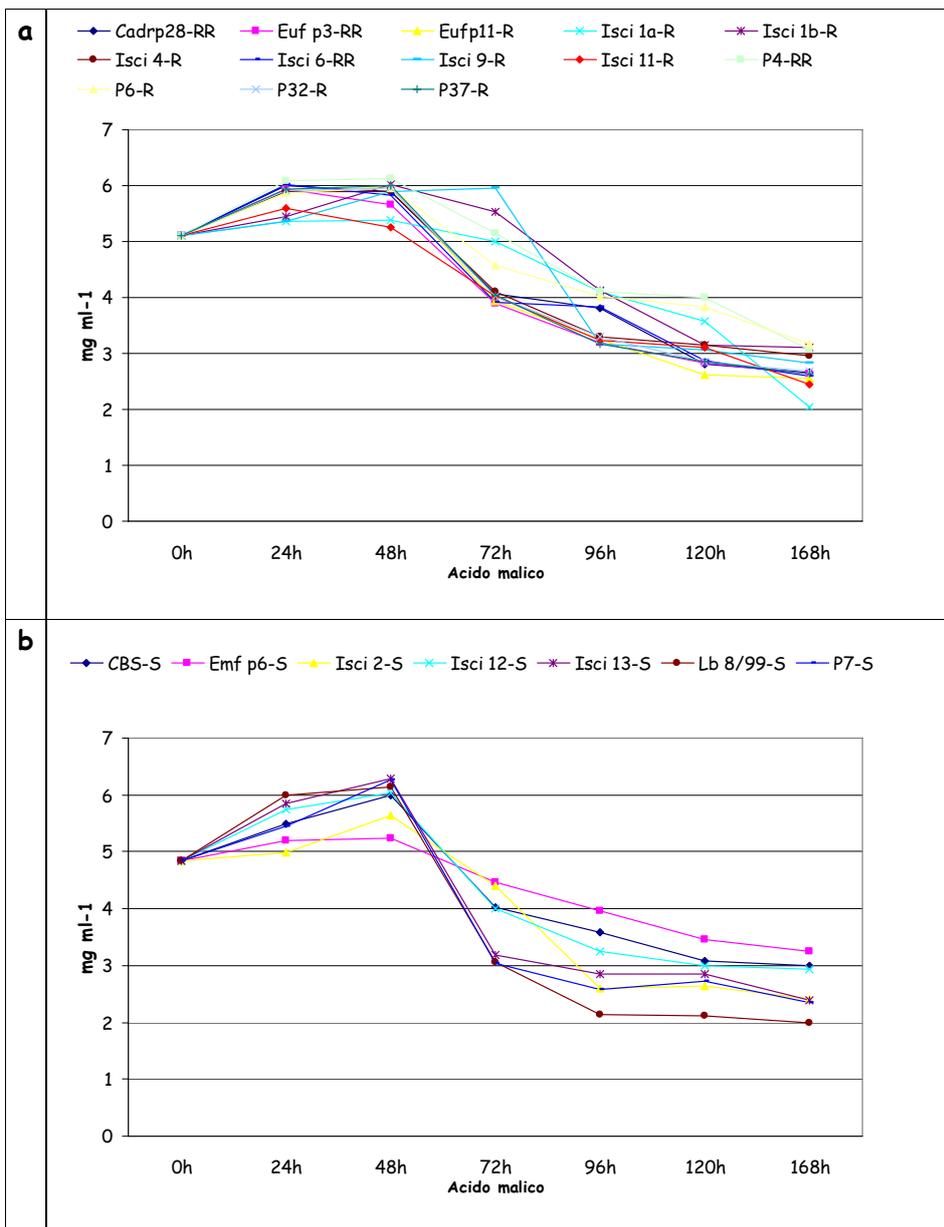


Grafico 22(a,b) - Andamento della produzione di acido malico nei frutti di pera inoculati con gli isolati di *P. expansum*

4.12 PRODUZIONE DI METABOLITI SECONDARI NEL FRUTTO

I risultati delle analisi cromatografiche relative alla presenza di metaboliti secondari nei frutti di pera infetti, sono esposti nella Tabella 15. Come già evidenziato dai profili cromatografici delle colture pure degli isolati, non sono presenti picchi con tempi di ritenzione (t_r) confrontabili con quelli degli standards per la citrinina, e le ocratossine A e B.

4.12.1 Patulina

La presenza di patulina è stata riscontrata in tutti i campioni analizzati anche se con differenze significative tra i diversi isolati, ma con valori medi 10 volte inferiori a quelli rilevati dall'analisi delle colture pure degli isolati.

Dopo 7 giorni di incubazione a 20°C la maggior concentrazione è stata riscontrata nel per l'isolato Euf p3-RR (19,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$), viceversa il minor contenuto in patulina è stato riscontrato nell'isolato P4-RR (1,21 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Nel tessuto sano circostante la ferita non è stata rilevata la presenza della tossina in nessun campione.

Nel periodo successivo, si è riscontrato un incremento delle concentrazioni, l'isolato P4-RR mantiene livelli minori di patulina rispetto a tutti gli altri isolati (2,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$), tra gli isolati più attivi nella produzione della tossina rimane Euf p3-RR, anche se il maggior contenuto nel tessuto infetto dopo 15 giorni è stato ritrovato nei frutti inoculati con Isci 2-S (29,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

A differenza del primo controllo inoltre è stata verificata la diffusione di patulina anche nel tessuto sano, ad eccezione degli isolati Isci 1a-R, Emf p6-S e P7-S. In questo caso però i livelli di concentrazione sono piuttosto contenuti e compresi tra 0,34 a 2,06 $\mu\text{g ml}^{-1}$ per Isci 1b-R e Isci 9-R rispettivamente.

	Patulina ($\mu\text{g/ml}$)						
	7 giorni			15 giorni			
	Tessuto infetto	Tessuto sano	-	Tessuto infetto	Tessuto sano	-	
CBS-S	8,05	de	-	12,3	bc	2	d
Cadrp28-RR	3,52	bc	-	11,20	bc	1,67	cd
Euf p3-RR	19,10	g	-	25,40	ef	1,83	d
Emf p6-S	5,24	cd	-	23,20	ef	0	a
Eufp11-R	6,73	d	-	26,80	fg	1,21	bc
Isci 1a-R	3,62	ab	-	12,80	c	0	a
Isci 1b-R	15,23	ef	-	21,30	e	0,34	a
Isci 2-S	16,41	f	-	29,50	g	1,04	bc
Isci 4-R	10,77	e	-	13,50	c	1,74	d
Isci 6-RR	9,36	e	-	13,80	c	1,61	cd
Isci 9-R	9,12	e	-	10,30	bc	2,06	d
Isci 11-R	8,23	de	-	21,40	e	1,87	d
Isci 12-S	2,94	ab	-	3,60	a	0,88	bc
Isci 13-S	8,52	de	-	11,10	bc	1,22	cd
Lb 8/99-S	5,24	e	-	4,70	a	0,66	ab
P4-RR	1,21	a	-	2,00	a	1,14	bc
P6-R	1,47	ab	-	8,40	b	1,03	bc
P7-S	6,45	d	-	13,60	c	0	a
P32-R	6,79	de	-	17,90	d	1,04	bc
P37-R	15,32	f	-	12,30	bc	1,65	cd

Tabella 15 – Concentrazione di patulina nel tessuto infetto e sano di frutti di pera inoculati con gli isolati di *P. expansum* e conservati a 20°C per 7 e 15 giorni

4.12.3 Penitrem A

Come mostrato dalle prove in vitro, gli isolati producono penitrem A in quantitativi paragonabili a quelli rilevati nelle colture pure.

Dopo 7 giorni di conservazione il tessuto sano non è interessato dalla diffusione dell'analita presente invece nel tessuto infetto con valori compresi tra i 2,4 dell'isolato Emf p6-S e i 32,36 $\mu\text{g ml}^{-1}$ per Isci 9-R. Al termine dei 15 giorni il metabolita compare anche nel tessuto sano, eccetto che per gli isolati Euf p11-RR,

Isci 1a-R, e per CBS-S. Nel tessuto infetto rispetto al controllo precedente si nota una certa eterogeneità nei valori, nel 50% degli isolati si osserva un calo medi della concentrazione di patulina il 50%. Viceversa per il restante 50% degli isolati l'aumento risulta in alcuni casi considerevole come per Cadr p28-RR con un incremento percentuale del 35% circa, per P6-R dove l'incremento è stato del 18% circa, ma in generale risulta più contenuto al 3,5% circa.

Penitrem A ($\mu\text{g/ml}$)							
	7 giorni		15 giorni				
	Tessuto infetto	Tessuto sano	Tessuto infetto	Tessuto sano			
CBS-S	7,87	b	-	7,01	bc	0	
Cadrp28-RR	12,54	c	-	47,70	f	7,17	cd
Euf p3-RR	17,32	d	-	8,58	c	10,10	e
Emf p6-S	2,40	a	-	3,04	a	5,56	c
Eufp11-R	7,74	b	-	4,21	ab	0	
Isci 1a-R	21,70	d	-	2,90	a	0	
Isci 1b-R	25,32	e	-	6,14	b	16,08	f
Isci 2-S	16,40	cd	-	8,89	c	3,03	b
Isci 4-R	16,63	cd	-	22,86	e	8,17	d
Isci 6-RR	19,08	d	-	14,80	d	8,71	d
Isci 9-R	32,36	f	-	16,07	d	13,58	f
Isci 11-R	4,04	ab	-	13,23	d	10,94	e
Isci 12-S	7,92	b	-	6,36	b	13,48	f
Isci 13-S	2,98	a	-	5,76	b	4,32	b
Lb 8/99-S	6,15	ab	-	8,15	c	4,35	b
P4-RR	19,66	d	-	22,28	e	6,14	c
P6-R	2,82	a	-	21,78	e	4,43	b
P7-S	3,32	a	-	6,35	b	1,95	a
P32-R	31,59	f	-	6,12	b	3,70	b
P37-R	13,92	c	-	14,69	d	3,77	b

Tabella 16 - Concentrazione di penitrem A nel tessuto infetto e sano di frutti di pera inoculati con gli isolati di *P. expansum* e conservati a 20°C per 7 e 15 giorni

4.13 Produzione di patulina in relazione al tempo

Su alcuni isolati, è stata valutata la produzione di patulina in funzione del tempo, dello sviluppo della lesione e in relazione alla variazione di pH nella tacca di marciume.

L'iniziale produzione di patulina è stata rilevata a partire dal 3° giorno nel caso degli isolati Cadr p28-RR (Graf.23b) e Lb 8/99-S (Graf.25a) seppur in quantitativi limitati, per gli altri isolati comincia attorno al 5 giorno. L'abbassamento di pH appare graduale e distribuito le periodo considerato.

Lo sviluppo della lesione diventa evidente a partire dal 3°giorno ad eccezione di P32-R (Graf.24a), il quale pur mostrando uno sviluppo iniziale più lento della lesione, recupera nel periodo successivo e raggiunge dimensioni del tutto simili agli altri ceppi. Da evidenziare anche in questo caso il minor sviluppo finale dei due isolati di tipo S analizzati.

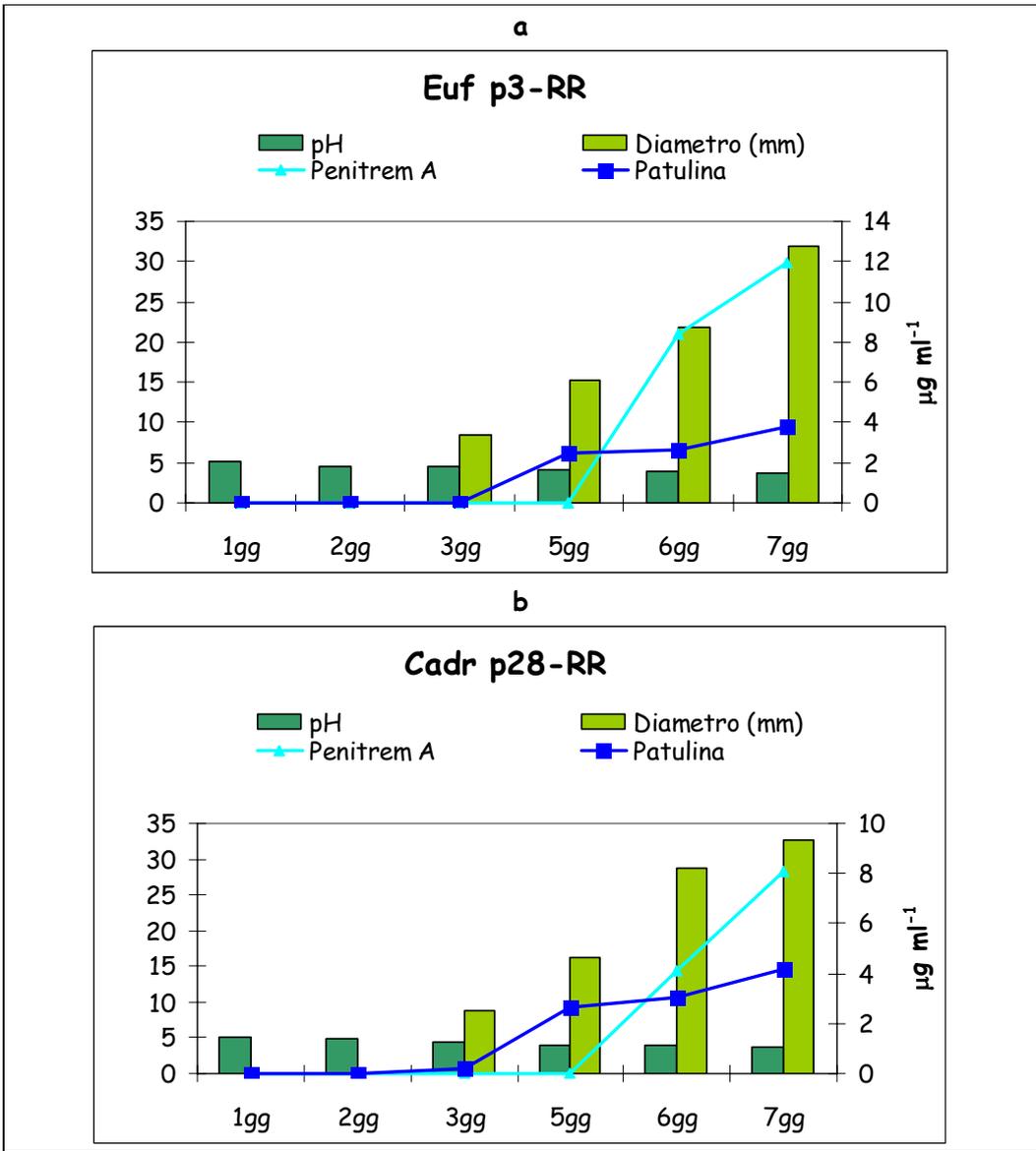


Grafico 23(a,b) - Produzione di patulina e penitrem A di alcuni isolati RR in funzione del tempo, dell'abbassamento del pH e dello sviluppo della lesione su frutti di pera cv "Conference" (pH iniziale del frutto 5,19))

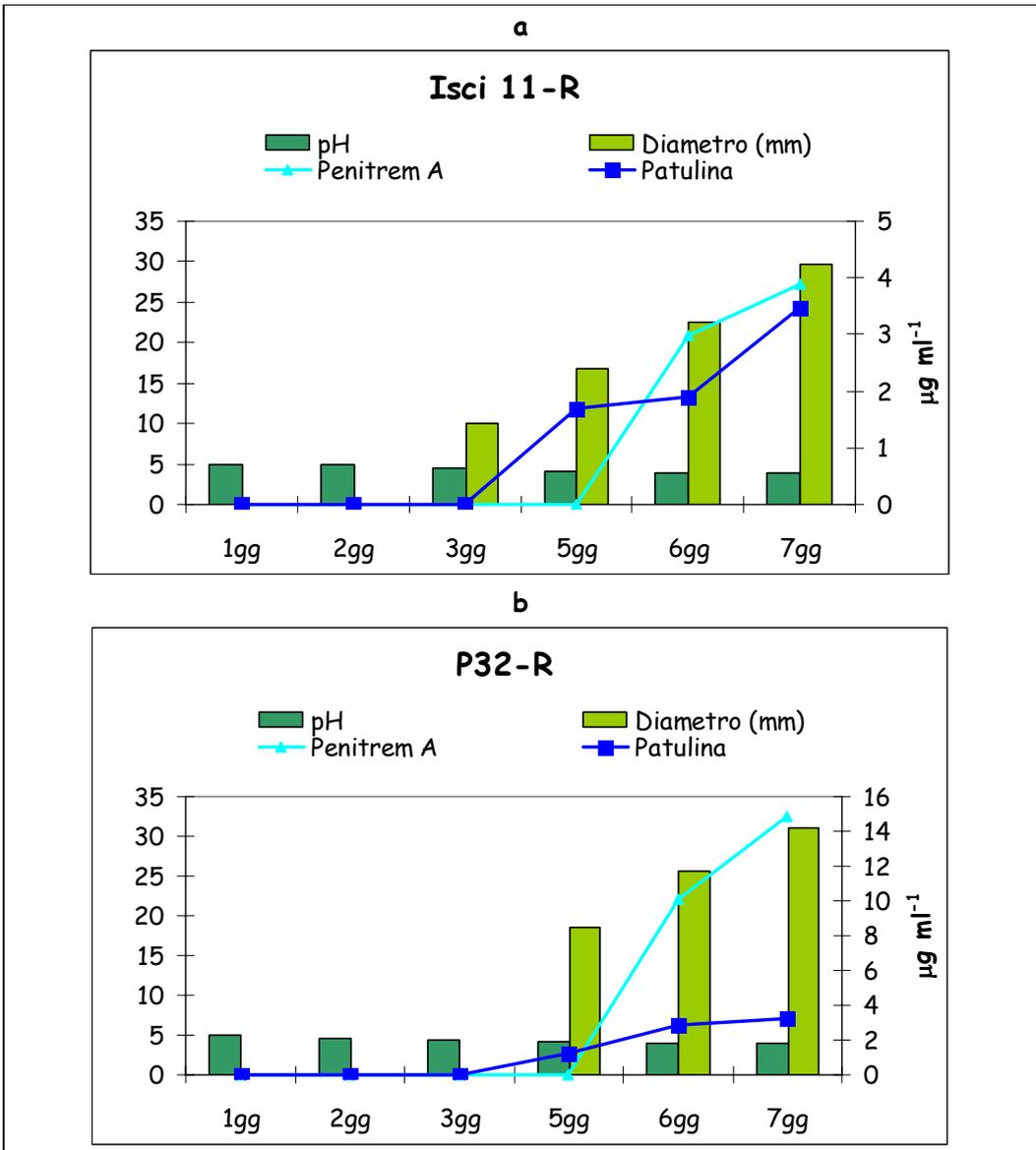


Grafico 24 (a,b) - Produzione di patulina e penitrem A di alcuni isolati R in funzione del tempo, dell'abbassamento del pH e dello sviluppo della lesione su frutti di pera cv "Conference" (pH iniziale del frutto 5,19)

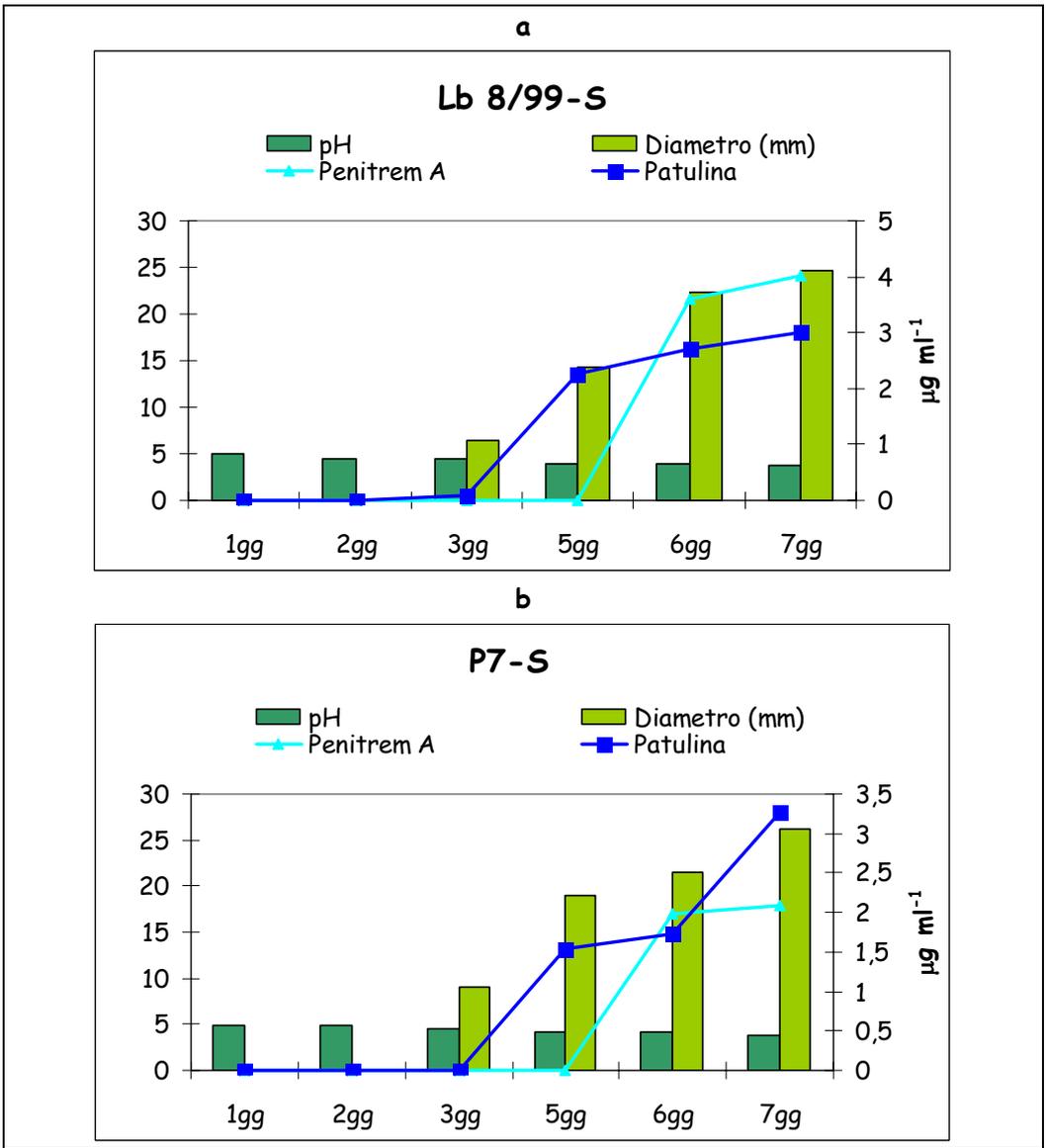


Grafico 25 (a,b) - Produzione di patulina di alcuni isolati S in funzione del tempo, dell'abbassamento del pH e dello sviluppo della lesione su frutti di pera cv "Conference" (pH iniziale del frutto 5,19)

5.1 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le ricerche condotte permettono di integrare le informazioni relative al processo di patogenesi con particolare riferimento alla caratterizzazione biochimica, di *Penicillium expansum*.

I risultati qui descritti confermano che gli isolati di *P. expansum* ottenuti da frutti di pera provenienti dai magazzini di conservazione, manifestino alti livelli di resistenza al Tiabendazolo (TBZ), rendendo potenzialmente inefficacie l'unica possibilità di intervento nei confronti del patogeno in fase di conservazione. Questo a conferma delle conclusioni raggiunte in precedenza da diversi autori (Wild, 1983; Lee, 1985; Rosenberger *et al.*, 1991).

Fra gli isolati resistenti emerge il comportamento di alcuni definiti di tipo RR, per i quali è stato evidenziato un effetto stimolante del trattamento, rappresentato da un incremento della germinazione conidica rispetto al controllo non trattato. Ciò determina quello che normalmente viene definito come effetto iatrogeno, già documentato precedentemente sia per TBZ nei confronti di *P. expansum* (Baraldi *et al.*, 2003), sia per altri fungicidi, come nel caso del Metalaxyl sulla crescita vegetativa di *Phytophthora infestans* (Zhang *et al.*, 1997).

Perciò i trattamenti con TBZ non solo possono risultare inefficaci nei confronti di *P. expansum*, ma il loro uso può aumentare la gravità della malattia. Esempi di tale fenomeno sono abbastanza comuni, mentre le informazioni a riguardo si limitano alla semplice osservazione del fenomeno. Il prodotto chimico può aggravare una malattia biotica, ma risulta difficile spiegarne il motivo, si ipotizza ad esempio lo sfruttamento da parte del agente infettivo del p.a. e dei co-formulanti come substrato di crescita (Smith, 1970).

Le prove condotte per evidenziare l'eventuale effetto dei co-formulati hanno messo in evidenza che l'effetto iatrogeno negli isolati RR è presente non solo nel prodotto commerciale, ma anche nel caso del principio attivo puro; inoltre alcuni isolati R hanno evidenziato sul prodotto puro un effetto stimolante come per quelli RR. Ciò

Eliminato: ¶

indicherebbe la non rilevanza della co-formulazione rispetto al fenomeno. In assenza del fungicida si assiste ad una differenziazione degli isolati in relazione alla gravità dell' infezione, per cui R e RR sono caratterizzati da lesioni sui frutti di dimensioni maggiori rispetto agli isolati S. Esistono esperienze basate su mutanti resistenti indotti in laboratorio per i quali è dimostrata una correlazione tra la resistenza al TBZ e la gravità delle infezioni (Baraldi *et al*, 2003).

Lo screening enzimatico portato avanti secondo quanto riportato da Paterson e Bridge (1994), ha dato reazioni positive in tutti gli isolati, per quello che riguarda la presenza di ureasi, esterasi e pectinasi. Inoltre il patogeno è in grado di sintetizzare un complesso enzimatico atto a degradare i principali componenti della parete cellulare soprattutto pectine e cellulosa. Isolati sensibili e resistenti sono caratterizzati da una buona attività delle pectinasi, in particolar modo dalle poligalatturonasi, che come riportato già da diversi studi (Walton, 1994; D'hallewin *et al*, 2004; Prusky *et al*, 2004), sono alla base del processo degradativo della parete cellulare, dato che la depolimerizzazione della componente pectinica aumenta la porosità della parete cellulare e facilitando il processo di invasione e colonizzazione del tessuto da parte del patogeno (Miedes e Lorences, 2006). Inoltre seppur in minor misura è stata evidenziata anche una certa attività delle cellulasi, ma seppur nota la produzione nell'ambito del genere *Penicillium* di cellulasi ed emicellulasi, nel caso di *P. expansum* non sono stati fatti studi mirati e non sono reperibili informazioni di altra fonte al riguardo.

Saggiando la capacità di sfruttamento di alcune fonti carboniose, non é emerso, al contrario di quanto ci si potesse aspettare, un utilizzo preferenziale degli singoli zuccheri addizionati al substrato minimo (MM), ciò che si può segnalare è la differente capacità di sporificazione tra i diversi isolati, quelli dotati di una maggiore aggressività hanno raggiunto la fase di sporificazione, seppur lieve, anche su substrato minimo, ad indicare probabilmente una migliore capacità di adattamento a condizioni non ottimali di crescita.

Secondo quanto riportato da Frisvad (1985), un aspetto tipico della fisiologia del patogeno, si basa sulla sua abilità di sviluppo su un terreno a base di creatina come unica fonte azotata, questo substrato viene impiegato a livello tassonomico per la caratterizzazione biochimica del subgenere *Penicillium* e consente di osservare le produzioni del metabolismo acido o basico del fungo. La produzione di metaboliti acidi, con viraggio del colore verso il giallo, indica l'utilizzo come fonte di carbonio, del saccarosio presente, viceversa la variazione di colore in senso basico (violetto) è legata all'utilizzazione della creatina per deaminazione dell'aminoacido, con liberazione di ammoni, e utilizzo della stessa come fonte di carbonio (Pitt e Hocking, 1999). Un buon livello di acidificazione è stato raggiunto negli isolati relativamente ai primi 7 giorni di sviluppo, in seguito si assiste una variazione del metabolismo registrata come ritorno al colore violetto del substrato, più intesa nel caso degli isolati S, ad indicare un diverso comportamento fisiologico e biochimico.

L'influenza del pH ambientale, come ci si poteva aspettare, svolge un ruolo importante sullo sviluppo del fungo. Quando il patogeno si trova in un ambiente dotato di un pH al di fuori dell'intervallo ottimale di crescita (4,5-5), varia il suo comportamento in funzione delle condizioni esterne, in un ambiente alcalino il patogeno intensifica il metabolismo acido con estrusione nel substrato di svariati acidi organici come malico, succinico, e in minor misura di acido citrico, ossalico, fumarico e propionico che contribuiscono localmente ad abbassare il pH a valori più consoni al suo sviluppo, che risulta in ogni caso meno inteso rispetto alla condizione ottimale di pH. Quando il patogeno si trova in condizioni eccessivamente acide (pH 3,0), si riscontra un calo di produzione di acido succinico e citrico, mentre rimane piuttosto rilevante la presenza di acido malico, ciò potrebbe indicare che tale acido non ha una grande influenza nella modulazione del pH, inoltre in tali condizioni lo sviluppo del fungo risulta comunque più limitato. Dalla correlazione tra i risultati relativi all'accrescimento in peso del fungo con quelli relativi alla modificazione del pH nelle tre situazioni studiate, si è riusciti ad evidenziare la diversità di

comportamento degli isolati R e RR, che in generale risultano più duttili, perciò anche in un ambiente non del tutto favorevole mostrano un accrescimento in peso superiore.

Altro aspetto da tenere in considerazione è il fattore tempo, l'acidificazione è sì piuttosto intensa nelle prime ore del processo infettivo, ma in realtà si protrae per diversi giorni. Inoltre il tempo influisce anche sulla qualità degli acidi prodotti, *in vitro* ad esempio con il passare delle ore cala la concentrazione di acido succinico e aumenta gradualmente la presenza di acido galatturonico.

Probabilmente questo fenomeno è legato alle modificazioni biochimiche a cui va incontro il substrato con il passare del tempo, perciò la secrezione di intermediari del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) continua per tutta la fase di crescita del fungo, ma con il passare delle ore modificandosi il rapporto C/N si modifica quello che è stato definito come "overflow metabolism" (McCullough *et al*, 1986), e contemporaneamente cominciano ad accumularsi i prodotti di degradazione della parte cellulare. Il meccanismo di modulazione del pH è regolato inoltre dal substrato di partenza, infatti secondo quanto riportato da diversi autori (Eshel *et al*, 2002; Manteau *et al*, 2003; Prusky *et al*, 2001, 2003; Rollins e Dickman, 2001), la misura della modifica del pH nel tessuto vegetale dipende dalla capacità patogenetica del fungo in relazione ai diversi ospiti, perciò non ci si stupisce del cambiamento del profilo degli acidi organici nel passaggio dal substrato artificiale al frutto. L'acidificazione ambientale non interessa solo come fattore di attivazione di specifiche vie enzimatiche, ma è stato suggerito che alcuni di questi acidi agiscano, a diversi livelli, direttamente come fattori di virulenza (Godoy *et al*, 1990; Batemen e Beer 1965; Cunningham e Kuiack 1992).

Nei frutti di pera, l'abbassamento del pH dapprima interessa esclusivamente il tessuto infetto, ma con il passare del tempo e con il progredire dello sviluppo della lesione viene ad essere coinvolta anche la porzione di tessuto sano circostante la

tacca di marciume, seppur più gradualmente e in misura notevolmente inferiore rispetto al tessuto marcescente.

Il profilo cromatografico degli acidi organici risulta notevolmente variegato, date le caratteristiche del substrato di infezione ricco per sua natura di acidi organici. Il profilo appare normalmente più complesso rispetto a quello ottenuto su substrato artificiale (MEA), con la comparsa di analiti incogniti a i quali non è stato possibile al momento, dare un'identità.

Ad una prima analisi emerge rispetto alle condizioni *in vitro*, l'assenza di acido succinico, la presenza di acido citrico, tartarico e fumarico, ma soprattutto di acido galatturonico. Generalizzando si può affermare che la fase esponenziale di accumulo di acidi organici si concentra nelle prime 48-72 ore, ma esistono alcune differenze che vanno rilevate.

La produzione di acido galatturonico è piuttosto consistente, e prolungata nel tempo, e probabilmente legata attività degradativa a carico delle componenti pectiniche della parete cellulare. Da evidenziare lo sfasamento temporale riscontrato nell'accumulo di tale acido, in particolare tra gli isolati R e RR si ha un anticipo della fase iniziale di accumulo, e un prolungamento sino alle 96 ore della fase esponenziale. Anche per quanto riguarda l'accumulo di acido citrico sembra esistere anticipo di produzione per gli isolati R e RR ma limitatamente alle prime 24 ore, successivamente le differenze si annullano.

Infine da rilevare il comportamento dell'acido malico, la cui produzione si concentra nelle prime 24 ore (isolati R e RR) e sino alle 48 (isolati S), e poi viene rapidamente consumato come già riportato in altri studi (Duarte *et al*, 2006), e probabilmente sfruttato dal patogeno durante la fase di crescita come intermediario del ciclo degli acidi tricarbossilici (Romano *et al*/1967).

Un altro aspetto caratteristico del patogeno è legato alla sua abilità nell'accumulo di micotossine su matrici vegetali diverse. Nello specifico in coltura pura *P. expansum* è

in grado di produrre circa 50 metaboliti secondari diversi come: patulina, citrinina, ocratossina A e B, penitrem A, roquefortina C.

Le indagini cromatografiche non hanno rilevato la presenza di citrinina e ocratossina A e B in nessuno degli isolati. In tutti i campioni è stata rilevata la presenza di patulina, e di penitrem A.

Oltre a registrate una significativa riduzione dei quantitativi rilevati nei campioni provenienti dai frutti, rispetto alle colture pure degli isolati, non è stata trovata una correlazione tra la concentrazione di patulina e l'incidenza della malattia, ma gli isolati caratterizzati da un severità inferiore delle lesioni mostrano quantitativi medi più contenuti di patulina. Così come dimostrato da Russell e Paterson (2007) esiste una relazione tra il diametro della lesione e la produzione di patulina, Inoltre con il progredire della lesione, la patulina è stata rilevata, anche se in quantitativi piuttosto contenuti, anche nel tessuto sano, probabilmente ciò è dovuto al da un lato al basso livello di patulina rilevato nei frutti, e dall'altro alle ridotte dimensioni delle zona infetta iniziale (Laidou *et al*/2001; Martin *et al*, 2006).

La sintesi delle micotossine è fortemente condizionata dall'ambiente di sviluppo, in particolare sia la formazione di patulina e sia la sua elevata stabilità sembrano essere legate al pH dei frutti normalmente compreso tra 3.8-4.6 (Kotzekidou-Rouka, 1993). Non è stata trovata correlazione la produzione di metaboliti acidi e il contenuto in patulina, ma di fatto sino quando il pH del frutto non raggiunge livelli adeguati, dopo circa a 3-5 giorni in relazione all'isolato, non si rilevano tracce di patulina.

Bibliografia

- Adams T.H., Yu J.H.** (1998). Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:674-77
- Albetini C., Gredt M., Leroux P.** (1971). Mutations of the β -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance and *Tapesia acuformis*, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64:17-31
- Andersen A., Smedsgaard J., Frisvad J.C.** (2004) *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2421-28
- Bailey J.A., O'Connell R.J., Pring R.J., Nash C.** (1992). Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. In: J.A. Bailey and M.J. Jeger. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International
- Baraldi E., Mari M., Chierici E., Pondrelli M., Bertolini P. Pratella G.C.** (2003). Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology* 52: 362-70
- Barkai-Golan R.**, (1974). Specie of *Penicillium causicum* decay of stored fruits and vegetables in Israel. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 54: 14145
- Bateman D.F., Beer S.V.** (1965) Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 58: 204-211
- Beck J., Ripka S., Siegner A., Schiltz E., Schweizer E.** (1990) The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. *Eur. J. Biochem* 192:487-98
- Bercovitz A., Peleg Y., Battat E., Rokem J.S., Goldberg I.** (1990) Localization of pyruvate carboxylase in organic acid producing *Aspergillus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1594-97
- Bertolini P, e Folchi A.**, (1993). Protezione post-raccolta, conservazione e qualità delle pere. *Proceedings "La coltura del pero per la produzione integrata"* Verona 173-79
- Bird B.A., Remaley A.T., Campbell I.M.** (1981). Brevianamides A and B are formed only after conidiation has begun in solid cultures of *Penicillium brevicompactum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:521-25
- Bolay A., Crettenand J., Gnaegi F., Schopfer J.F.** (1974). The control of grey rot of grapes. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture* 6, 91-97
- Bowen K.J., Templeton D.M., Sharrock R.K., Crowhurst N.R., Rikkerink A.H.E.** (1995) Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*: three strategies for the disruption of the pectin lyase gene pnlA. *Mol. General Genet.* 246: 196-205
- Brandao R.L., Castro I.M., Passos J.B., Nicoli J.R., Thevelein J.M.** (1992) Glucose-induced activation of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Microbiol.* 138; 1579-86
- Branzanti E.C. e Sansavini S.**, (1964). Importanza e diffusione delle cultivar di melo e di pero in Italia. *Ed L'informatore Agrario*, 113
- Brummell D.A., Bird C.R., Schuch W., Bennett A.B.** (1997). An endo-1,4- β -glucanase expressed at high levels in rapidly expanding tissues. *Plant Molecular Biology*, 33:87-95
- Brummell D.A., Labavitch J.M.** (1997). Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiol.*, 115: 717-725
- Bryk H.** (1997). Appearance and stability of *Pezizula alba* Gunth. resistant to benzimidazole fungicides. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 5: 77-87
- Burow G. B., Nesbitt T.C., Dunlap J., Keller N.P.** (1997). Seed lipoxygenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:380-87
- Calvo A. M., Gardner H.W., Keller N.P.** (2001). Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 276:20766-74

- Caracuel Z., Roncero M.I.G., Espeso E.A., Gonzales-Verdej, C.I., Garcia-Maceira F.I., Di Pietro A.** (2003) The pH signaling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* 48: 765-79
- Carta F.S., Soccol C.R., Ramos L.P., Fontana J.D.** (1999) Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from *Cassava bagasse*. *Bioresource Technol* 68:23-28
- Champe S.P., El-Zayat A.A.E.** (1989). Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 171:3982-3988
- Chilosi G., Caruso C., Caporale C., Leonardi L., Bertini L., Buzi A., Nobile M., Magro P., Buonocore V.** (2000). Antifungal Activity of a Bowman-Birk-type Trypsin Inhibitor from Wheat Kernel. *J. Phytopathology*, 148:477-481
- Ciegler A., Beckwith A.C., Jackson L.K.** (1976) Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl Environ Microbiol* 31:664-7
- Claessens J., Lith Y.V., Laverman A., Cappellen P.V.** (2006). Acid-base activity of microorganisms. *Journal of Geochemical Exploration*, 88:181-85
- Clemons G.P., Sisler H.D.** (1971). Localization of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1:32-43
- Collmer A., Ried J.L., Mount M.S.** (1988). Assay methods for pectin enzymes. In: S.P. Colowick and N.O. Kaplan *Methods in enzymology*. Academic Press, Inc
- Cook R.J.** (1981) Unexpected effects of fungicides on cereal yields. *EPPO Bull.* 11: 277
- Cooper R.M.** (1983) The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. In: J.A. Callow *Biochemical Plant Pathology*. John Wiley & Sons Ltd
- Corte-Real M., Leao C.** (1990) Transport of malic acid and other carboxylic acids in the yeast *Hansenula anomala*. *Appl Environ Microbiol* 56:1109-1113
- Coulthard C.E., Michaelis R., Short W.F., Sykes G., Skrimshire G.E.H., Standfast A.F.B., Birkinshaw J.H., Raistrick H.** (1945). Notatin: An anti-bacterial glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling and *Penicillium resticulosum* sp. *Biochem. J.* 39: 24-36
- Cox R.S., Hayslip N.C.** (1957) Progress in the control of grey mold of tomato in South Florida. *Plant Dis. Reprtr.* 40: 718-29
- Cunningham J.E., Kuiack, C.** (1992) Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1451-58
- Currie J.N.** (1917). Citric acid fermentation. *J. Biol. Chem.* 31, 15-37
- D'hallewin G., Schirra M., Powell A.L.T., Greve L.C., Labavitch J.M.** (2004). Properties of a polygalacturonase-inhibiting protein isolated from 'Oroblanco' grapefruit. *Physiologia Plantarum*, 120:395-404
- Davidse L.C., Ishii H.** (1995). Biochemical and molecular aspects of N-phelycarbamates and N-phelyformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi, in " *Modern Selective Fungicides*" (H. Lyr, Ed.) Gustav Fisher, Jena, Stuttgart, New York: 305-22
- Davis D.** (1969) Fusaric acid in selective pathogenicity of *Fusarium oxysporum*.
- Donald V., Voet J.G. Pratt C.W.**, (2001) *Fondamenti di biochimica*, Bologna, Zanichelli
- Duarte I.F., Deldadillo I., Gil A.G.** (2006) Study of natural mango juice spoilage and microbial contamination with *Penicillium expansum* by high resolution H-MNR spectroscopy. *Food Chemistry* 96: 313-24
- Dutton M.V., Evans C.S.** (1996) Oxalate production by fungi: Its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.* 42: 881-895
- Eshel D., Lichter A., Dinoor A., Prusky D.** (2002) Characterization of *Alternaria alternata* glucanase genes expressed during infection of resistant and susceptible persimmon fruits. *Mol. Plant Pathol.* 3: 347-58
- Fajola A.O.**, (1979). The post-harvest fruit rot of tomato (*Lycopersicum esculentum*) in Nigeria. *Nahrung* 23:105-09

- Fijimura M., Kamakura T., Inoue H., Yamagushi I. (1992). Sensitivity of *Neurospora crassa* to benzimidazoles and N-phelycarbamates: Effect of amino acid substitutions at position 198 in α -tubulin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 44:165
- Fokkema M.J., van del Laar J.A.J., Neli-Blomerg A.L., Schippers B. (1975) The buffering capacity of the natural flora of rye leaves to infection by *Cochliobolus sativus* and its susceptibility to benomyl. *Neth. J. Plant Pathol.* 81: 176
- Forrester P.I., Gaucher G.M. (1972) Conversion of 6-methyl salicylic acid into patulin by *Penicillium urticae*. *Biochem* 11:1108-14
- Foster J.W., Waksman S.A. (1938) The production of fumaric acid by molds belonging to the genus *Rhizopus*. *J Am Chem Soc* 61:127-131
- Frisvad J.C., Filtenborg O. (1989). Terverticillate Penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, 81: 837-61
- Frisvad J.C., Thrane U. (2002). Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O., eds. *Introduction to food- and airborne fungi*, 6th edn. Utrecht, The Netherlands: 321-30
- Gallmetzer M., Meraner J., Burgstaller W. (2002) Succinate synthesis and excretion by *Penicillium simplicissimum* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 210: 221-225
- Gaucher G.M. (1975) m-Hydroxybenzyl alcohol dehydrogenase. *Methods Enzymol* 43:540-8
- Gaucher G.M. (1979) Mycotoxins - Their biosynthesis in fungi: patulin and related carcinogenic lactones. *J Food Prot* 42:810-4
- Gibson Q.H., Swoboda B.E.P., Massey V. (1964) Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 239: 3927-34
- Godoy G., Steadman J.R., Dickman M.B., Dam, R. (1990) Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37: 179-191
- Gomathi V., Gnanamanickam S.S. (2004). Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence. *Current Science*, 87(9): 1211-17
- Gregori R., Mari M., Bertolini P., Pratella G.C. (2003). Isolation and characterization of serin-protease from *Phialophora malorum*. *Journal of Plant Pathology*, 85 (4):275-320
- Griffiths E. (1981). Iatrogenic plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 82: 69-82
- Guzman-de-Pen˜a D., Aguirre J., Ruiz-Herrera J. (1998). Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie Leeuwenhoek* 73:199-205
- Hadley G., Harrold C.E. (1958). The sporulation of *Penicillium notatum* westling in submerged liquid cultures. *J. Exp. Bot.* 9:418-28
- Ham K.S., Wu S.C., Darvill A.G., Albersheim P. (1997). Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo- α -1,3-glucanases. *The Plant Journal*, 11:2:169-179
- Harrison M.A. (1989) Presence and stability of patulin in apple products: A review. *J. Food Safety* 9: 147-153
- Hastie A.C., Georgopoulos S.G. (1971). Mutational resistance to fungitoxic derivative in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 67: 371-73
- Hayaishi O., Shimazono H., Katagiri M., Saito, Y. (1956) Enzymatic formation of oxalate and acetate from oxaloacetate. *J. Am. Chem. Soc.* 78. 5126-27
- Hedstrom L. (2002). Introduction: Proteases. *Chemical Review*, 102:12
- Hesse S.J.A., Ruijter G.J.G., Dijkema C.O.R., Visser J. (2002) Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* 269: 3485-94

- Hilslop E.C.** (1976) Some effects of fungicides and other agrochemicals in the microbiology of the aerial surfaces of plants, in *Microbiology of aerial plant surfaces*, Dickinson, C.H. and Preece, T.F., Eds, Academic Press, New York
- Hocking A.D., Pitt J.I.** (1979). Water relations of some *Penicillium* species at 25°C. *Trans Br. Mycol. Soc.* 73:141-45
- Horsfall J.G.** (1972). Selective chemicals for plant disease control. In: *Pest control: Strategies for the Future*. Washington DC: NAS
- Horsfall J.G., Dimond A.G.** (1957). Interaction of tissue sugar, growth substances and disease susceptibility. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenpathol. Pflanzenschutz* 64: 415-21
- Iijimia H., Ebizuka Y., Sankawa U.** (1986) Biosynthesis of patulin, in vitro conversion of gentisyl alcohol into patulin by microsomal enzyme(s) and retention of one of the carbinol protons in this reaction. *Chem Pharm Bull* 34(8):3534-37
- Johnson G.I., Sangchote S., Cooke A.W.**, (1990). Control of stem and rot (*Dothiorella dominicana*) and other postharvest diseases of mangoes (cv. Kensington Pride) during short and long-term storage. *Trop. Agric.* 67:183-87
- Jones A.L., Aldawinckle H.S.**, (1991). Compendium of apples and pear diseases. APS Press, 53-55
- Kawamura C., Tsujimoto T., Tsuge T.** (1999). Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:59-63
- Kelley R.L., Reddy C.A.** (1988) Glucose oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Meth. Enzymol.* 161: 307-316
- Kotzekidou-Rouka P.** (1993) Food Microbiology. Aristotelian University of Thessaloniki Press, Thessaloniki (in Greek)
- Kubicek C.P., Röhr M.** (1986) Citric acid fermentation. *Crit. Rev. Biotechnol.* 3: 331-74
- Kubicek C.P., Schrefel-Kunar G., Wöhrer W., Röhr M.** (1988) Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 633-37
- Kusai K., Sekuzu I., Hagihara B., Okunuki K., Yamauchi S., Nakai M.** (1960) Crystallization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Biochim. Biophys. Acta* 40: 555-57
- Laidou J.A., Thanassouloupoulos C.C., Liakopoulou-Kyriakides M.** (2001) Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four postharvest pathogens. *J. Phytopathology* 149 : 457-61
- Lam K.S., Neway J.O., Gaucher M.G.** (1988) In vitro stabilization of 6-methylsalicylic acid synthetase from *Penicillium urticae*. *Can J Microbiol* 34:30-7
- Landers K.E., Davis N.D., Diener U.L.** (1967). Influence of atmospheric gases on the aflatoxins production by *Aspergillus flavus* in peanuts. *Phytopath.* 57:1086-1090
- Lee C.U.** (1985). Tolerance of apple blue mould (*Penicillium expansum*) to various fungicides. *Korean Journal of Plant Pathology* 1, 128-35
- Legiša M., Grdadolnik, S.G.** (2002) Influence of dissolved oxygen concentration on intracellular pH and consequently on growth rate of *Aspergillus niger*. *Food Technol. Biotechnol.* 40: 27-32
- Lenz H., Wunderwald P., Eggerer H.** (1976) Partial purification and some properties of oxalacetase from *Aspergillus niger*. *Euro. J. Biochem.* 65: 225-236
- Li W., Mitchell A.P.** (1997) Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics*, 145: 63-73
- Locci R.** (1999). La micologia degli alimenti alle soglie del 2000. *Informatore Fitopatologico*, 12:24-32
- Lodish H., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E.** (1995) Molecular Cell Biology - Scientific American Books Inc., New York
- Lorenz D.H., Eichhorn K.W.**, (1985). Mögliche Einflüsse von Schaderregern und Pflanzenschutzmitteln auf die Gärung und das Geschmacksbild des Weines. I. Vom Gesundheitszustand des Lesegutes ausgehende Beeinflussungen. *Weinwirtsch. Tech.* 121: 180-83
- Lynen F.H., Engeser J., Freidrich W., Schindlbeck R., Seyffert J., Wieland F.** (1978) Fatty acid synthetase of yeast and 6-Methylsalicylate synthetase of *Penicillium patulum* : Two multi-

enzyme complexes. In: Srere PA, Estabrook RW, editors. Microenvironments and metabolic compartmentalization. New York Academic Press: 283-303

Maccheroni W., Araujo W.L., Azevedo J.L. (2004). Ambient pH- regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates on fungal *Colletotrichum*. *Sci. Agric.*, 61(3): 298-302

McQueen-Mason S.J., Cosgrove D.J. (1995). Expansin mode of action on cell walls. *Plant Physiol.*, 107: 87-100.

Magnuson J.K., Lasure L.L. (2003) *Organic Acid Production by Filamentous Fungi - A review of Organic Acid Production by Filamentous Fungi* published as a chapter in *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine* by Kluwer Academic/Plenum Publishers

Magro P., Marciano P., Di Lenna P. (1984) Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 24: 9-12

Manteau S., Abouna S., Lambert B., Legendre L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology*, 43:359-366

Marciano P., Di Lenna P., Magro, P. (1983) Oxalic acid, cell wall degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol. Plant Pathol.* 22: 339-345

Marek P., Annamalai T., Venkitanarayanan K. (2003) Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 139- 144

Mattey M. (1992) The production of organic acids. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 87-132

McKinlay J.B., Vieille C., Zeikus J.G. (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 727-40

Miedes E., Lorences E.P. (2006) Changes in cell wall pectin and pectinase activity in apple and tomato fruits during *Penicillium expansum* infection. *J. Sci. Food Agric.* 86: 1359-64

Mingot J.M., Tilburn J., Diez E., Bignell E., Orejas M., Widdick D.A., Sarkar S., Brown C.V., Caddick M.X., Espeso E.A., Arst, H.N. Peñalva M.A. (1999) Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site and processing occurs in yeast if pH signaling is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1390-1400

Miotto G., (2005). Riflessioni sul futuro delle sericoltura italiana. *Rivista di Frutticoltura*, 10:18-20

Mislivec P.B., Tuite J. (1970 a). Species of *Penicillium* occurring freshly-harvested and in stored dent corn kernels. *Mycologia* 62: 67-74

Mislivec P.B., Tuite J. (1970 b). Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dent corn kernels *Mycologia* 62: 75-88

Moore D. (1998) *Fungal morphogenesis - Developmental and cell biology series*. Cambridge University Press

Morales M.A, Berger S.H., Luza Z.J., (1979). Identification of fungi causing spoilage of cold-stored avocados of the cv. Fuerte and Negra la Cruz. *Invest. Agric. (Santiago)* 5:1-4

Movahedi S., Heale J.B. (1990) Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 289-302

Mueller H.M. (1975) Oxalate accumulation from citrate by *Aspergillus niger*. I. Biosynthesis of oxalate from its ultimate precursor. *Arch. Microbiol.* 103: 185-190

Murphy G., Lynen F. (1975) Patulin biosynthesis: The metabolism of m-hydroxybenzyl alcohol and m-hydroxybenzaldehyde by particulate preparations from *Penicillium patulum*. *Eur J Biochem* 58:467-75

Naidu G.S.N., Panda T. (2003). Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 16:57-67

Nasi F. (2001). Attività enzimatica: Studio della proteasi in funghi fitopatogeni. Tesi di Laurea

Nelson D.L., Lehninger A.L., Cox M.M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry* (3rd ed.), New York: Worth Publishers

- Neway J., Gaucher G.M.** (1981) Intrinsic limitations on the continued production of the antibiotic patulin by *Penicillium urticae*. *Can J Microbiol* 27:206-15
- Northolt M.D.** (1979). The effect of water activity and temperature on the production of some mycotoxin. *Diss. Wageningen*
- Northolt M.D., Bullerman L.B.** (1982). Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental condition. *J. Food Protection* 45:519-26
- Orejas M., Espeso E.A., Tilburn J., Sarkar S., Arst H.N., Peñalva, M.A.** (1995) Activation of the *Aspergillus PacC* transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9: 1622-1632
- Ortega J.** (1996) Pectolytic enzymes produced by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tex. J. Sci.* 48: 123-28
- Osmani S.A., Scrutton M.C.** (1985) The sub-cellular localization and regulatory properties of pyruvate carboxylase from *Rhizopus arrhizus*. *Eur J Biochem* 147:119-128
- Overman S.A., Romano A.H.** (1969) Pyruvate carboxylase of *Rhizopus nigricans* and its role in fumaric acid production. *Biochem Biophys Res Commun* 37:457-463
- Panasenko V.T.** (1967). Ecology of microfungi. *Bot. Rev.* 33: 189-215
- Paterson R.R.M., Bridge P.D.** () Biochemical techniques for filamentous fungi. CAB International, International Mycological Institute, IMI Technical Handbook No.1
- Park D., Robinson P.M.** (1969). Sporulation in *Geotrichum candidum*. *Br. Mycol. Soc.* 52:213-22
- Pazur J.H.** (1966) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Methods Enzymol.* 9: 82-87
- Pedersen H., Hjort C., Nielsen J.** (2000) Cloning and characterization of oah, the gene encoding oxaloacetate hydrolase in *Aspergillus niger*. *Mol. Gen. Genet.* 263: 281-86
- Peleg Y., Battat E., Scrutton M.C., Goldberg I.** (1989) Isoenzyme pattern and subcellular localization of enzymes involved in fumaric acid accumulation by *Rhizopus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:334-39
- Peñalva M.A., Arst, H.M.** (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 426-446
- Pitt J.I., Hocking A.D.** (1999). Fungi and Food Spoilage. *Aspen Publishers, Inc.*, Gaithersburg, Maryland
- Pratella G.C.** (1996). Note di bio-patologia e tecnica di conservazione e trasporto dei frutti. I penicilli delle pomacee. *Rivista di frutticoltura* 4: 73-75
- Prusky D., Gold S., Keen N.T.** (1989) Purification and characterization of an endopolygalacturonase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35: 121-133
- Prusky D., McEvoy J.L., Saftner R., Conway W.S., Jones R.** (2004) The relationship between host acidification and virulence of *Penicillium spp.* on apple and citrus fruit. *Phytopathology*, 94: 44-51
- Prusky D., Yakoby N.** (2003). Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Molecular Plant Pathology*, 4(6):509-16
- Ramaswamy A.** (2002). Ecological analysis of secondary metabolite production in *Aspergillus spp.* Master's thesis. Office of Graduate Studies of Texas A & M University, College Station
- Rambelli A.** (1981) Fondamenti di micologia. Ed Zanichelli, Bologna
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V.** (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62(3):597-635
- Reiß, J.** (1982). Development of *Aspergillus parasiticus* and formation of aflatoxin B1 under the influence of conidiogenesis affecting compounds. *Arch. Microbiol.* 133:236-38
- Rhodes R.A., Moyer A.J., Smith M.L., Kelley S.E.** (1959) Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. *Appl Microbiol* 7:74-80
- Rollins J.A., Dickman M.B.** (2001) pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of pacC/RIM1 homolog. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 75-81

- Rollins, J.A.** (2003) The *Sclerotinia sclerotium* *pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 785-95
- Romano A.H., Bright M.M., Scott W.E.** (1967) Mechanism of fumaric acid accumulation in *Rhizopus nigricans*. *J Biotechnol* 93:600-04
- Romig W.R., Sasser M.** (1972). Herbicide predisposition of snapbeans to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 62: 785-86
- Rose J.K.C., Hadfield K.A., Labavitch J.M., Bennett A.** (1998). Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiol.*, 117: 345-361
- Rosenberger D.A., Wicklow D.T., Korjagin V.A., Rondinaro S.M.** (1991). Pathogenicity and benzimidazole resistance in *Penicillium* species recovered from flotation tanks in apple packinghouses. *Plant Disease* 75: 712-15
- Ruijter G.J.G., Kubicek C.P., Visser J.** (2002). Production of organic acids by fungi. In H. D. Osiewacz (ed) *The mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Industrial Applications Springer-Verlag, Berlin, Germany*, pp. 213-230
- Ruijter G.J.G., van de Vondervoort P.J.I., Visser J.** (1999) Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology* 145: 2569-2576
- Russell R., Paterson M.** (2007) Some fungicides and growth inhibitor/biocontrol-enhancer 2-deoxy-D-glucose increase patulin from *Penicillium expansum* strains in vitro. *Crop Protection* 2: 543-48
- Samson R.A., Frisvad J.C.** (2004) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxin and other extrolites. *Study of Mycology 49, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands*
- Sansavini S, Bellini E, Lugli S, Predieri S, Rivalta L.**, (2000). Nuove varietà di pero per il recuperare la biodiversità merceologico-qualitativa e affrontare nuovi mercati. *Frutticoltura*, 9:71-82
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffle S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487- 91
- Schimmel T.G., Coffman A.D., Parsons S.J.** (1998). Effect of butyrolactone I on the producing fungus, *Aspergillus terreus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3703-3712.
- Scott P.M., Somers E.** (1968) Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *J. Agric. Food Chem.* 16:483-485
- Sekiguchi J., Gaucher G.M.** (1977). Conidiogenesis and secondary metabolism in *Penicillium urticae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:147-58
- Sekiguchi J., Gaucher G.M.** (1978) Identification of phyllostine as an intermediate of the patulin pathway in *Penicillium urticae*. *Biochem J* 17:1785-91
- Sekiguchi J., Gaucher G.M.** (1979) Isoepoxydon, a new metabolite of the patulin pathway in *Penicillium urticae*. *Biochem J* 182:445-53
- Sekiguchi J., Gaucher G.M., Yamada Y.** (1979) Biosynthesis of patulin in *Penicillium urticae*: identification of isopatulin as a new intermediate. *Tetrahedron Lett* 1:41-2
- Sekiguchi J., Shimamoto T., Yamada Y., Gaucher G.M.** (1983) Patulin biosynthesis: enzymatic and non-enzymatic transformations of the mycotoxin (E)-ascladiol. *Appl Environ Microbiol* 45(6):1939-42
- Sepulveda G., Apablaza G.E.** (1979). Detection, identification and pathogenicity of fungi affecting onion (*Allium cepa* L.) Valenciana type, during storage. *Cienc. Invest. Agrar.* 6:51-57
- Shieh M., Brown R.L., Whitehead M.P., Carey J.W., Cotty P.J., Cleveland T.E., Dean R.A.** (1997) Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3548-52
- Shimizu K., Keller N.P.** (2001). Genetic involvement of cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 157:591-600

- Sierra G.** (1957) A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 23: 15-22
- Sim S.C.** (2001). Characterization of genes in the sterigmatocystin gene cluster and their role in fitness of *Aspergillus nidulans*. Master's thesis. Office of Graduate Studies of Texas A & M University, College Station
- Smedsgaard J.** (1997) Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A*, 760(2): 264-270
- Smith A.M., Stynes B.A., Moore K.J** (1970). Benomyl stimulates growth of a basidiomycete on turf. *Plant Dis. Report.* 54: 774-75
- Snowdon A.L.** (1990). A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables 1. General introduction and fruit. *London: Wolfe Scientific.*
- Snowdon A.L.** (1991). A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables 2. Vegetables. *London: Wolfe Scientific.*
- Stall R.E., Hortenstein C.C., Iley J.R.**(1965) Incidence of Botrytis gray mold of tomatoes. *Phytopathology* 55:447-49
- Steyn P.** (1992) The biosynthesis of polyketide-derived mycotoxins. *J Envir Pathol Toxicol Oncol* 11(1):47-59
- Strange R.N.** (2003). *Introduction to Plant Pathology.* Wiley edition
- Stotz H.U., Powell A.L.T., Damon S.E., Greve L.C., Bennett A.B., Labavitch J.M.** (1993). Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv Bartlett. *Plant Physiol.*, 102: 133-138
- Sydenham E.W., Vismer H.F., Marasas W.F.O., Brown N., Schlechter M., van de Westhuizen L., Rheeder J.P.** (1995) Reduction of patulin in apple juice samples, influence of initial processing. *Food Control* 6: 195-200
- Tamura M., Gao M., Tao R., Labavitch J.M., Dandekar A.M.** (2004). Transformation of persimmon with a pear fruit polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) gene. *Scientia Horticulturae*, 130(1):19-30
- Takano Y., Kikuchi T., Kubo Y., Hamer J.E., Mise K., Furusawa I.** (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMKI regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 374-383
- Taniwaki M.H., Hoenderboom, C.J.M., deAlmeida Vitali A., Udoldi Eiroa M.N.** (1992). Migration of patulin in apples. *J. Food. Prot.* 55:902-04
- Templeton M.D., Keith K.R., Bowen J.K., Crowhurst R.N., Rikkerink E.H.** (1994) The pectin lyase-encoding gene (pnl) family from *Glomerella cingulata*: Characterization of pnlA and its expression in yeast. *Gene.* 142:141-46
- Tilburn J., Sarkar S., Widdick D.A., Espeso E.A., Orejas M., Mungroo J., Peñalva M.A., Arst, H.N.** (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acidic and alkaline expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14: 779-790
- Tonini G.** (1996). Atlante delle alterazioni microrganiche post-raccolta. Bayer S.p.A., Italia Divisione Agraria
- Turner W.B.** (1976) Polyketides and related metabolites. In: *Smith JE, Berry DR, editors. The filamentous fungi*, vol. 2. London: Edward Arnold, Ltd
- Walton J.D.** (1994). Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiol.*, 104:1113-1118
- Wang I.K., Reeves C., Gaucher G.M.** (1991). Isolation and sequencing of a genomic DNA clone containing the 3 terminus of the 6-methylsalicylic acid polyketide synthetase gene of *Penicillium urticae*. *Can J. Microbiol* 37:86-95
- Wassenaar T.M., Gaastra W.** (2001) Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol. Lett.* 201: 1-7

- Wild B.L.** (1983). Double resistance by citrus green mould, *Penicillium digitatum* to the fungicide guazatine and benomyl. *Annals of Applied Biology* 105: 237-41
- Wu S.C., Ham K.S., Darvill A.G., Albersheim P.** (1997). Deletion of Two Endo- β -1,4-Xylanase Genes Reveals Additional Isozymes Secreted by the Rice Blast Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(6):700-708
- Wubben J.P., Have A., van Kan J.A.L., Visser J.** (2000) Regulation of endo-polygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* 37: 152-57
- Yakoby N., Freeman S., Dinoor A., Keen N.T. Prusky D.** (2000) Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides*. *C. magna* promotes pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 887-891
- Yao C., Conway W.S., Ren R., Sams C.E.** (1998) Cloning and analysis of a gene encoding polygalacturonase in *Penicillium expansum*. Direct Submission Genbank, accession AF047713
- Yvon M., Rijnens L.** (2001). *International Dairy Journal*, 11: 185-201
- Zhang S.Y., Panaccione D.G., Gallegly M.E., Zhang S.Y.** (1997). Metalaxyl stimulation of growth of isolates of *Phytophthora infestans*. *Mycologia* 89: 289-92
- Zucker M., Hankin L.** (1970). Regulation of pectate lyase synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia carotovora*. *Journal of Bacteriology*, 104(1):13-18

1.1 INTRODUZIONE	1
1.1.1 Produzione pericolosa	1
1.1.2 Conservazione	3
1.2 ALTERAZIONI POST-RACCOLTA	4
1.3 IL GENERE <i>PENICILLIUM</i>	6
1.4 LA MUFFA VERDE AZZURRA	10
1.4.1 Sintomatologia	10
1.4.2 Epidemiologia e patogenesi	11
1.4.3 Terapia	14
1.4.4 Il problema "Benzimidazoli"	15
1.4.5 Effetto iatrogeno	18
1.5. METABOLITI DI ORIGINE FUNGINA	20
1.5.1 Produzione di acid organici	21
1.6 IL CICLO DI KREBS	23
1.6.1 Acido citrico	25
1.6.2 Acido ossalico	27
1.6.3 Acido succinico	28
1.6.4 Acido fumarico	29
1.6.5 Acido malico	32
1.6.6 Acido gluconico	32
1.7 METABOLISMO DEGLI ACIDI GRASSI	33
1.8 TRANSAMINAZIONE DEGLI AMINOACIDI	36
1.9 AZIONE ENZIMATICA A CARICO DELLA PARETE CELLULARE	37
1.9.1 Principali enzimi coinvolti nella degradazione della parete cellulare	39
1.9.2 Enzimi pectolitici	40
1.9.3 Emicellulasi e cellulasi	41
1.9.4 Enzimi proteolitici	42
1.10 REGOLAZIONE GENICA ALLA BASE DEL MECCANISMO DI MODULAZIONE DEL pH	43
1.10.1 Effetto del pH ambientale sui fattori di patogenicità	46
1.10.2 Effetto del patogeno sul pH ambientale	48
1.11 METABOLITI SECONDARI	50
1.11.1 Metaboliti secondari come fattori di sporulazione	51
1.11.2 Pigmenti	52
1.11.3 Micotossine	52
1.11.4 Fattori che influenzano la formazione di micotossine	53

1.12 LA PATULINA	56
1.12.1 Biosintesi	58
2.1 SCOPI DELLE RICERCA	61
MATERIALI E METODI	62
Prove in vitro	
3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE	63
3.1.2 Caratterizzazione genotipica	63
3.1.3 PCR	64
3.2 SENSIBILTA' AL TBZ	66
3.2.1 Confronto TBZ commerciale-TBZ puro	66
3.3 IMPIEGO DELLA FONTE CARBONIOSA	67
3.4 SCREENING DELLA CAPACITA' DI ACIDIFICAZIONE DEL SUBSTRATO	68
3.5 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA IN P. EXPANSUM SU PIASTRA AGARIZZATA	69
3.5.1 Attività dell'esterasi degli acidi grassi	70
3.5.2 Attività delle lipasi	70
3.5.3 Idrolisi della caseina	71
3.5.4 Attività delle ureasi	72
3.5.5 Attività delle pectinasi	73
3.6 ESTRAZIONE DEL COMPLESSO ENZIMATICO	74
3.6.1 Estrazione della parete cellulare da pere cv "Conference"	74
3.6.2 Accrescimento del micelio su Pratt's Medium modificato	75
3.6.3 Estrazione degli enzimi prodotti in substrato liquido	76
3.6.4 Dialisi e Concentrazione	76
3.7 CARATTERIZZAZIONE ENZIMATICA MEDIANTE "CUP PLATE"	77
3.7.1 Standard per le Cup Plate	77
3.7.2 Cup plate - Pectinasi (PG)	77
3.7.3 Cup plate - Poligalatturonasi (PGA)	78
3.7.4 Cup plate - Cellulasi	78
3.8 ACCRESCIMENTO DEL MICELIO IN RELAZIONE AL pH	79
3.8.1 Influenza del pH iniziale	79
3.8.2 Influenza tempo	80
3.9 DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI ORGANICI	81
3.9.1 Preparazione degli standards	81

3.9.2	Strumentazione e condizioni operative	82
3.9.3	Identificazione	82
3.9.4	Determinazione	83
3.9.5	Espressione dei risultati	83
3.10	VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' MICOTOSSIGENA	84
3.10.1	Estrazione	84
3.10.2	Analisi HPLC	84
Prove in vivo		
3.11	ACCRESIMENTO DEL PATOGENO SU SUBSTRATO NATURALE	86
3.12	MONITORAGGIO DELLA VARIAZIONE TEMPORALE DEL pH NEL FRUTTO INFETTO	86
3.12.1	Misurazione del pH	86
3.12.2	Preparazione dei campioni per la quantificazione degli acidi organici in HPLC	87
3.12.3	Influenza del tempo	87
3.13	VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' MICOTOSSIGENA NEI FRUTTI	87
3.13.1	Estrazione	88
3.14	ELABORAZIONE STATISTICA	88
RISULTATI PROVE IN VITRO		
4.1	IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE	90
4.2	VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' AL TBZ	90
4.2.1	Confronto di efficacia tra TBZ commerciale e principio attivo puro	92
4.3	UTILIZZO DELLE FONTI DI CARBONIO	93
4.4	CAPACITA' DI ACIDIFICAZIONE DEL SUBSTRATO DA PARTE DEGLI ISOALTI DI <i>P. EXPANSUM</i> SU CREATINE SUCROSE AGAR	98
4.5	ATTIVITA' ENZIMATICHE IN <i>P. EXPANSUM</i> SU PIASTRA AGARIZZATA	100
4.6	CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO ENZIMATICO MEDIANTE METODO "CUP PLATE"	101
4.1.6	Determinazione delle curve di taratura tramite il metodo "cup plate"	101
4.6.2	Determinazione dell'attività di pectinasi, poligalatturonasi, e cellulasi negli isolati di <i>P. expansum</i> tramite il metodo "cpu plate"	102

4.7 INFLUENZA DEL pH DEL SUBSTRATO LIQUIDO SULL'ACCRESIMENTO DEL MICELIO	103
4.7.1 Influenza del pH iniziale	103
4.7.2 Influenza del tempo sulla modulazione del pH	108
4.8 DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI ORGANICI PRODOTTI SU SUBSTRATO YSM	110
4.8.1 Curve di taratura degli acidi organici utilizzati	110
4.8.2 Produzione di acidi organici in relazione al pH iniziale	111
4.8.3 Produzione di acidi organici nel tempo	113
4.9 VALUTAZIONE DELLE CAPACITA' TOSSIGENE DEI CEPPI DI <i>P. EXPANSUM</i>	116
4.9.1 Curve di taratura degli standards	116
4.9.2 Metaboliti presenti nell'estratto di colture pure di <i>P. expansum</i>	117
RISULTATI PROVE IN VITRO	118
4.10 SVILUPPO DEL PATOGENO SU PERE CV "CONFERENCE"	119
4.11 MODULAZIONE DEL Ph NEL FRUTTO INFETTO	122
4.11.1 Cambiamento temporale del pH nel tessuto infetti e nel tessuto sano	122
4.11.2 Accrescimento del patogeno	123
4.11.3 Determinazione degli acidi organici prodotti dal patogeno su substrato naturale	124
4.11.4 Produzione di acidi organici in relazione al fattore tempo	126
4.12 PRODUZIONE DI METABOLITI SECONDARI NEL FRUTTO	131
4.12.1 Patulina	131
4.12.2 Penitrem A	132
4.13 PRODUZIONE DI PATULINA IN RELAZIONE AL TEMPO	134
5.1 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	138
BIBLIOGRAFIA	