

Deteksi dan Identifikasi Molekuler Kapang Berpotensi sebagai Penghasil Patulin pada Buah Tropis

[Detection and Molecular Identification of Potentially Patulin-Producing Mold in Tropical Fruits]

Ratih Paramastuti^{1,2)}, Winiati Pudji Rahayu^{1,3)*}, dan Siti Nurjanah^{1,3)}

¹⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

²⁾ Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Nasional Karang Turi, Semarang, Indonesia

³⁾ South-East Asia Food & Agricultural Science and Technology (SEAFAST) Center-LPPM, IPB University, Bogor, Indonesia

Diterima 17 Maret 2023 / Disetujui 25 Juni 2023

ABSTRACT

Production and export of tropical fruits in Indonesia have an increasing trend every year. The important factor in the production and export of fruits is food safety. One of the contaminants that may be found in fruits is mycotoxin, especially patulin. Patulin mainly found in fruits such as apple, orange, grape, and pear. This study aimed to detect molds from tropical fruits and to identify potentially patulin-producing molds. Detection of potentially patulin-producing molds obtained from tropical fruits was carried out using the isoeopoxydon dehydrogenase (*idh*) gene. Species identification was carried out using internal transcribed spacer (ITS) region. The mold isolate sequences of ITS rDNA region were analyzed for their homology using both BLAST search and phylogenetic tree. A total of 26 molds were isolated from four types of fruit (malang apple, ambon banana, medan orange, and avocado) obtained from five different places in Bogor including fruit stalls, traditional markets, and supermarkets. The positive results of *idh* gene were mold isolates that have an amplicon at 620 bp. The result showed that 5 of 26 (19.2%) isolates were positive for *idh* gene, namely A11, A34, A43, A51 and B23. The positive isolates for *idh* gene were identified as *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium anthropophilum*, *Cladosporium tenuissimum*, and *Talaromyces verruculosus*.

Keywords: molecular identification, patulin, toxigenic mold, tropical fruits

ABSTRAK

Produksi dan ekspor buah-buahan tropis Indonesia mengalami tren peningkatan dari tahun ke tahun. Salah satu faktor penting yang harus diperhatikan dalam produksi maupun ekspor buah adalah keamanan pangan. Salah satu cemaran yang dapat ditemukan pada buah adalah mikotoksin, khususnya patulin. Patulin sering ditemukan pada buah-buahan seperti buah apel, jeruk, anggur, dan pir. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat kapang yang tumbuh dari empat jenis buah-buahan tropis dan identitas kapang yang berpotensi sebagai penghasil patulin. Kapang yang berpotensi sebagai penghasil patulin dideteksi menggunakan gen *idh*. Identifikasi molekuler spesies kapang dilakukan menggunakan daerah ITS. Sekuens ITS dari rDNA kapang dianalisis homologinya dengan BLAST dan pohon filogenetik. Total kapang yang diisolasi sebanyak 26 isolat dari 4 jenis buah tropis (apel malang, pisang ambon, jeruk medan dan alpukat). Kapang tersebut didapat dari 5 tempat yang berbeda di Bogor yaitu kios buah, pasar, dan supermarket. Isolat yang positif gen *idh* mempunyai amplicon pada 620 bp. Kapang yang positif mengandung gen *idh* berjumlah 5 dari 26 (19,2%) isolat yaitu A11, A34, A43, A51, dan B23. Isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium anthropophilum*, *Cladosporium tenuissimum*, dan *Talaromyces verruculosus*.

Kata kunci: buah tropis, identifikasi molekuler, kapang toksigenik, patulin

*Penulis Korespondensi: E-mail: wpr@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Produksi buah-buahan tahunan di Indonesia selama lima tahun terakhir (2014-2018) secara umum mengalami peningkatan (Kementan, 2019). Produk buah-buahan digunakan untuk konsumsi nasional dan ekspor. Peningkatan produksi buah-buahan juga diiringi dengan meningkatnya konsumsi nasional (Kementan, 2018). Penanganan produk buah-buahan yang baik perlu dilakukan untuk menghindari kerusakan secara mikrobiologi, salah satunya adalah pertumbuhan kapang. Keberadaan kapang dikawatirkan karena dapat menghasilkan mikotoksin.

Mikotoksin adalah komponen kimia bersifat toksik yang merupakan produk metabolit sekunder dari kapang (Tola dan Kebede, 2016). Mikotoksin yang telah diidentifikasi dan dilaporkan sebanyak 300 jenis, namun yang kerap ditemukan dalam pangan antara lain aflatoksin, okratoksin, fumonisin, patulin, *zearalenone*, dan *trichothecenes* (Alshannaq dan Yu, 2017). Menurut Food Agriculture Organization (FAO), diperkirakan 25% dari hasil pertanian dunia per tahun terkontaminasi oleh mikotoksin. Namun, berdasarkan penelitian terkini nilai perkiraan tersebut masih terlalu rendah. Kontaminasi mikotoksin diperkirakan mencapai 60-80%, nilai yang tinggi ini merupakan hasil dari peningkatan sensitivitas metode analitis dan perubahan iklim (Eskola *et al.*, 2020).

Mikotoksin yang sering ditemukan pada buah-buahan adalah patulin. Patulin dapat menyebabkan masalah kesehatan akut seperti mual, muntah, ulserasi, perdarahan usus, lesi pada duodenum, perubahan fungsi penghalang usus, dan kerusakan ginjal (Vidal *et al.*, 2019). Patulin merupakan hasil metabolit sekunder kapang dari genus *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, dan *Xylaria* (Frisvad, 2018). Faktor yang memengaruhi produksi patulin pada buah antara lain jenis buah, varietas, lokasi geografis, kondisi iklim, tahun produksi, perlakuan pra dan pasca panen, metode pemanenan, cacat pada permukaan buah, penggunaan pestisida, dan kondisi penyimpanan (Oteiza *et al.*, 2017). Buah-buahan yang lebih berisiko untuk mengalami migrasi patulin ke daging adalah buah dengan kulit yang tipis seperti buah pisang, jeruk, apel, dan alpukat. Keempat buah tersebut juga termasuk 11 besar produksi tertinggi tanaman buah-buahan tahunan di Indonesia.

Patulin merupakan senyawa yang stabil sehingga tidak dapat dihilangkan dengan proses pengolahan pada bahan pangan. Metode pengolahan seperti filtrasi, perlakuan panas, dan fermentasi hanya dapat mengurangi namun tidak dapat menghilangkan kandungan patulin secara keseluruhan (loi *et al.*, 2017). Deteksi patulin dapat dilakukan menggunakan beberapa metode seperti metode referensi, metode cepat, maupun metode analitik baru. Contoh dari metode referensi antara lain *thin-layer chromatography* (TLC), *gas chromatography* (GC), *mass spec-*

trometry (MS), dan *high-performance liquid chromatography* (HPLC). Metode cepat contohnya *enzyme immunoassay test*, *dipstick*, dan *lateral flow*. Metode analitik baru contohnya *near-infrared spectroscopy*, *fluorescence*, elektroforesis kapiler, dan biosensor (Notardonato *et al.*, 2021). Metode-metode tersebut dapat mendeteksi patulin setelah terbentuk. Pencegahan dari keberadaan patulin dapat dilakukan dengan mencegah pertumbuhan kapang yang berpotensi sebagai penghasil patulin.

Keberadaan kapang penghasil patulin harus dicegah dengan deteksi dini pada rantai pangan sebelum menghasilkan toksin yang melampaui batas yang ditentukan. Deteksi menggunakan metode mikrobiologi konvensional membutuhkan waktu yang lama dan tidak dapat mendeteksi kapang yang mati sehingga tidak mampu mengindikasikan kontaminasi sebelumnya pada suatu produk. Oleh karena itu, dibutuhkan metode lain untuk mendeteksi keberadaan kapang penghasil patulin secara cepat dan spesifik seperti metode molekuler menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). PCR merupakan metode alternatif dari metode kimia dan mikrobiologi untuk mendeteksi dan mengidentifikasi kapang toksigenik pada pangan (Paterson, 2007). Protokol PCR yang dirancang menggunakan gen target *isoepoxydon dehydrogenase* (*idh*) sebagai gen target penghasil patulin dan gen target *internal transcribed spacer* (ITS) untuk identifikasi isolat kapang (Paterson, 2004; Cunha *et al.*, 2014). Gen *idh* telah digunakan secara umum untuk mendeteksi kapang yang memproduksi patulin, gen *idh* berperan dalam biosintesis patulin untuk mengonversi *isoepoxydon* menjadi *phyllostine* (Paramastuti *et al.*, 2021). Beberapa penelitian yang menggunakan gen *idh* sebagai gen target untuk mendeteksi kapang yang memproduksi patulin telah dilakukan baik menggunakan metode PCR konvensional maupun PCR *real-time* (Paterson, 2004; Luque *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2011; De Clercq *et al.*, 2016). Perkembangan deteksi mikotoksin menggunakan beberapa gen target memungkinkan deteksi beberapa mikotoksin dalam pangan pada waktu yang bersamaan (Rodríguez *et al.*, 2012; Luque *et al.*, 2013). Identifikasi kapang yang berpotensi sebagai penghasil patulin dapat dilakukan menggunakan primer universal yaitu daerah ITS. Daerah ITS merupakan penanda DNA *barcoding* universal untuk identifikasi pada tingkat spesies pada kapang atau jamur (Raja *et al.*, 2017).

Penelitian tentang kontaminasi patulin pada apel dan produk olahannya sudah banyak dilakukan, namun data mengenai kontaminasi patulin pada buah-buahan tropis masih terbatas. Kebijakan di Indonesia tentang batasan maksimum cemaran patulin hanya pada jenis pangan produk olahan apel (50 ppb), minuman beralkohol berbasis apel (50 ppb), serta *puree* apel untuk bayi dan anak (10 ppb) (BPOM, 2018). Namun, belum ada regulasi yang

mengatur batasan maksimum cemaran patulin pada produk lainnya. Data hasil deteksi dan identifikasi kapang penghasil patulin pada buah-buahan tropis dapat digunakan sebagai dasar ilmiah bagi kebijakan keamanan pangan serta pengembangan metode deteksi kapang penghasil patulin dalam pangan. Oleh karena itu, metode berperan penting untuk deteksi dan identifikasi kapang penghasil patulin pada buah-buahan tropis. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat kapang yang tumbuh pada buah tropis dan mengidentifikasi kapang yang berpotensi sebagai penghasil patulin.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah-buahan tropis berupa pisang ambon, jeruk medan, apel malang, dan alpukat, masing-masing diperoleh dari lima tempat yang berbeda di Bogor antara lain kios buah, pasar tradisional, dan supermarket. Strain *Colletotrichum musae* PA01 yang telah teridentifikasi sebagai strain toksigenik penghasil patulin dari penelitian sebelumnya digunakan sebagai kontrol positif. Media yang digunakan untuk pertumbuhan adalah *buffer peptone water*/BPW (Oxoid, Inggris), *potato dextrose agar*/PDA (Oxoid, Inggris) dan *potato dextrose broth*/PDB (Himedia, India).

Isolasi kapang

Metode untuk isolasi kapang mengacu pada Cunha *et al.* (2014) dengan modifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah mengganti media *sabouraud dextrose agar* (SDA) dengan *potato dextrose agar* (PDA) untuk memindahkan koloni spesifik. Sampel yang telah dihomogenisasi dari buah utuh (*puree* buah) sebanyak 50 g diencerkan 10^{-2} dan diinokulasikan dengan metode sebar pada media *potato dextrose agar* (PDA) yang diberi kloramfenikol 0,01% secara duplo. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang (28°C) selama 5 hari dalam kondisi gelap. Koloni yang spesifik ditumbuhkan menggunakan metode gores kuadran pada media PDA dan inkubasi dilakukan pada suhu ruang (28°C) selama 5 hari. Koloni yang terpisah kemudian ditumbuhkan dengan metode gores kuadran pada media PDA dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang (28°C). Perlakuan ini diulangi sampai didapatkan isolat murni. Isolat kapang yang didapat ditumbuhkan pada PDA miring untuk pengujian selanjutnya.

Ekstraksi DNA

Metode untuk isolasi kapang mengacu pada Tannous *et al.* (2015) dengan modifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah mengganti media *yeasts extract sucrose* (YES) menjadi *potato dextrose broth*

(PDB). Isolat kapang ditumbuhkan pada media PDA dengan metode titik lalu diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang (28°C). Miselium yang tumbuh dipotong sebesar diameter 6 mm sebanyak 2 keping. Inokulum tersebut ditumbuhkan kembali pada media PDB dan diinkubasi pada *incubator shaker* dengan agitasi konstan selama 3 hari pada suhu ruang. Miselia yang tumbuh pada media PDB kemudian disaring dan dibilas dengan akuades steril. Miselia yang didapat digerus dengan mortar dan lumpang dengan penambahan nitrogen cair, hingga diperoleh serbuk miselia yang halus. DNA diekstrak dengan menggunakan *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma, Jerman) sesuai protokol kit.

Kuantifikasi DNA

Hasil ekstraksi DNA selanjutnya dikuantifikasi untuk mengetahui konsentrasi DNA menggunakan NanoDrop UV-Vis Spektrofotometer 2000 (Thermo Scientific, Amerika Serikat). Konsentrasi DNA didapat dalam satuan $\text{ng}/\mu\text{L}$ dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio absorban pada 260 nm/280 nm, DNA dikatakan murni jika memiliki rasio $\sim 1,8$. Jika rasionya lebih rendah ($\leq 1,6$), maka menunjukkan adanya protein, fenol, atau kontaminan lain (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016).

Deteksi PCR gen *idh*

Deteksi gen *idh* dilakukan menggunakan metode Paterson (2007) yang dimodifikasi. Amplifikasi dilakukan menggunakan primer IDH1F (5'-CAATGTGTCGACTGTGCC-3')/IDH2R (5'-ACCTTCAGTCGCTGTTCTC-3') yang disintesis dari *Integrated DNA Technologies* (IDT) Singapura. Modifikasi yang dilakukan adalah mengubah kondisi dan komposisi reaksi PCR sesuai hasil optimasi. Reaksi dilakukan dengan total volume $25 \mu\text{L}$ yang mengandung $12,5 \mu\text{L}$ MyTaq Red Mix (Bioline, UK), $0,2 \text{ mM}$ dari masing-masing primer, DNA genom (100 ng) dan *nuclease free water*/NFW (1st Base, Singapura) sampai $25 \mu\text{L}$. PCR 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Thermo Scientific, Amerika Serikat) diatur pada kondisi amplifikasi sebagai berikut: tahap pra denaturasi pada suhu 94°C selama 4 menit, 30 siklus pada suhu *melting* 94°C selama 1 menit, tahap *annealing* pada suhu 54°C selama 1 menit, tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dianalisis pada 1,5% (b/v) gel Omnipur agarosa (Merck, Jerman) menggunakan *buffer* 1XTAE pada 80 V selama 1 jam. *Buffer* TAE dibuat dengan komposisi Trizma base (Sigma, Jerman), EDTA dan asam asetat (Merck, Jerman). Gel diwarnai dengan *ethidium bromide*, DNA divisualisasikan oleh transiluminasi UV pada GelDoc (Bio-rad, Bio-Rad Laboratories Pte. Ltd, Singapura) dengan target amplicon 620 bp.

Identifikasi molekuler

Amplifikasi DNA dilakukan pada daerah target ITS mengacu pada metode Hammami *et al.* (2017) yang dimodifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah mengubah kondisi dan komposisi reaksi PCR sesuai hasil optimasi. Primer yang digunakan adalah ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')/ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') yang disintesis dari *Integrated DNA Technologies* (IDT) Singapura. Amplifikasi dilakukan pada total volume reaksi sebesar 30 μ L yang mengandung 15 μ L GoTaq Master Mix (Promega, Amerika Serikat), 0,2 mM dari masing-masing primer, DNA genom (100 ng), dan NFW. Program yang dipakai untuk daerah ITS: pra denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, amplifikasi sebanyak 35 siklus (denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 54°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik), dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dianalisis pada 1,5% (b/v) gel agarosa menggunakan *buffer* 1XTAE pada 80 V selama 1 jam. Gel diwarnai dengan *ethidium bromide*, DNA divisualisasikan oleh transiluminasi UV pada GelDoc (Bio-rad, Bio-Rad Laboratories Pte. Ltd, Singapura) dengan target ampikon 600 bp.

Purifikasi produk PCR dan analisis hasil sekuen-sing

Purifikasi produk PCR dilakukan oleh PT Genetika Science Indonesia yang dilanjutkan dengan *cycle sequencing* dan pengumpulan data sekuen oleh 1st BASE DNA Sequencing Services Singapura (<https://base-asia.com/dna-sequencing-services>) menggunakan metode Raja *et al.* (2017). Sekuens tersebut dicari homologinya dengan BLAST pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Pada sekuens rDNA ITS dilakukan analisis lanjutan dengan pohon filogenetik yang disusun menggunakan metode *Maximum Likelihood* dengan model yang paling sesuai dan bootstrap 1000x pada perangkat lunak MEGA X.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat kapang dari buah-buahan tropis

Kapang yang diperoleh sebanyak 26 isolat dari empat jenis buah-buahan tropis, dengan rincian tiga belas isolat dari apel malang (A11, A21, A22, A23, A31, A32, A34, A41, A42, A43, A44, A51, dan A52), sembilan isolat dari pisang ambon (B11, B22, B23, B24, B51, B52, B53, B54, dan B55), dua isolat dari jeruk medan (O11 dan O13), dan dua isolat dari alpukat (V22 dan V41). Gambar buah, isolat kapang, dan karakteristik koloninya dapat dilihat pada Tabel 1.







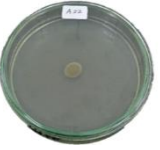








Gen *idh* dalam isolat yang berpotensi sebagai penghasil patulin










Deteksi gen penghasil patulin (gen *idh*) dilakukan pada 26 isolat yang didapat dari 4 jenis buah tropis yaitu 13 isolat dari apel malang (kode A), 9 isolat dari pisang ambon (kode B), 2 isolat dari jeruk medan (kode O), dan 2 isolat dari alpukat (kode V). Gen *idh* mempunyai ampikon sebesar 620 bp, dan berdasarkan hasil visualisasi pada Gambar 1 a dan b, terdapat 5 dari 26 (19,2%) isolat yang positif gen *idh* yaitu A11, A34, A43, A51, dan B23. Dua puluh satu isolat lainnya tidak mempunyai ampikon pada 620 bp, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak mengandung atau negatif gen *idh*. Namun, hasil negatif yang didapat mungkin juga disebabkan oleh bahan yang mengandung DNA target tidak mencukupi atau terdapat penghambatan (Paterson, 2004).


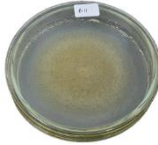


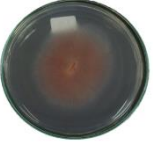






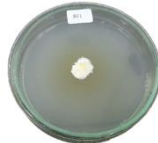



Produk PCR pada Gambar 1 a dan b masih terlihat menghasilkan *multiple band*, hasil tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Paterson (2007). Hasil yang *multiple band* menunjukkan bahwa primer IDH1/IDH2 tidak spesifik pada ampikon 620 bp. Deteksi gen *idh* menghasilkan ampikon tunggal (620 bp) hanya pada 17% dari 93 isolat yang didominasi oleh *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum*, dan *Penicillium hirsutum*. Strain lainnya dari genus *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*, dan *Paecilomyces* menghasilkan 2-8 ampikon. Spesies lain menghasilkan ampikon yang tidak spesifik namun dapat digunakan untuk menggambarkan profil DNA dalam mengidentifikasi dan mengklasifikasikan kapang. Sebagai contoh ampikon pada 400 dan/atau 500 bp berkaitan dengan kapang yang tidak menghasilkan patulin, sedangkan ampikon 450 bp berhubungan dengan beberapa strain *Aspergillus* dan *Byssochlamys nivea*. Kapang yang positif mempunyai gen *idh* menghasilkan ampikon pada 620 bp, baik itu ampikon tunggal maupun multi ampikon (Paterson, 2007).








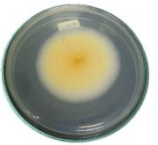




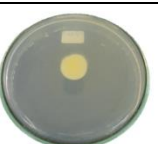


Gen yang telah diidentifikasi dan dikarakterisasi secara molekuler dalam biosintesis patulin dari *Penicillium griseofulvum*, *B. nivea*, atau *Aspergillus clavatus* antara lain patK, patG, patH, patI, dan patN yang masing-masing mengkode *6-methylsalicylic acid synthase/6MSAS*, *6-methylsalicylic acid decarboxylase*, *m-cresol hydroxylase*, *m-hydroxy-benzyl alcohol hydroxylase*, dan *isoepoxydon dehydrogenase (idh)* (Snini *et al.*, 2014). Gen *idh* pertama kali disekuens dari *Penicillium urticae* yang telah berganti nama menjadi *P. griseofulvum*. Gen *idh* merupakan enzim ketujuh pada jalur biosintesis patulin yang mengonversi *isoepoxydon* menjadi *phyllostine* dan mempunyai spesifitas absolut untuk NADP⁺ (Dombrink-Kurtzman, 2006).

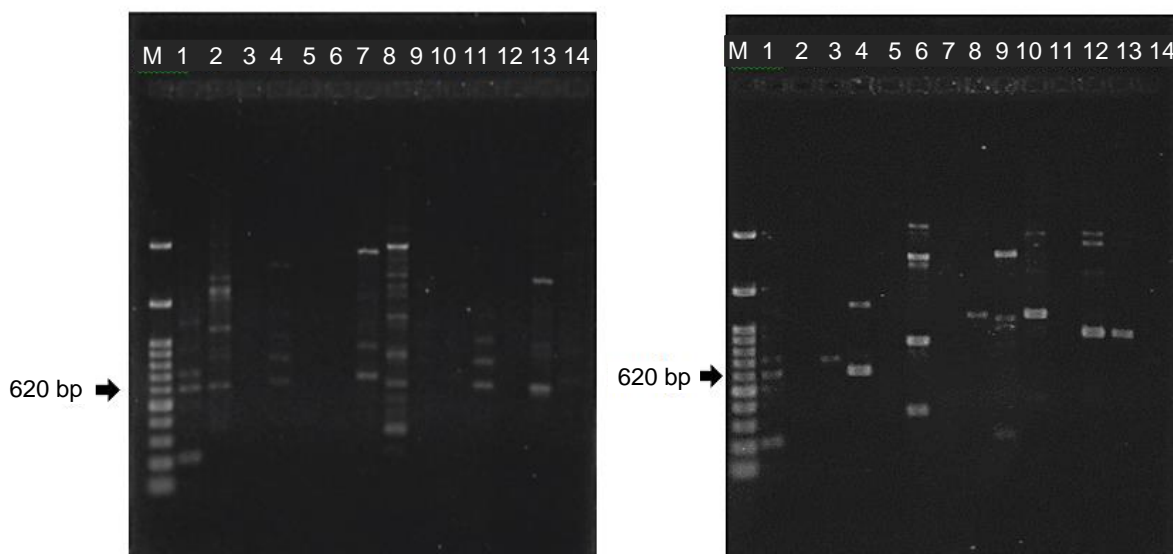
Tabel 1. Gambar buah, isolat kapang dan karakteristik koloninya
 Table 1. Picture of fruits, mold isolates, and colony characteristics

Origin	Sample	Sample Picture	Isolate Code	Isolate	Colony Characteristics	
Malang apples	A1		A11			Colonies are round, the surface color is blackish white, the reverse color is yellowish white
	A2		A21			Colonies are round, surface color is white, reverse color is yellowish white
			A22			Colonies are round, surface color is green, reverse color is green
			A23			Colonies are round, surface color is white, reverse color is yellowish white
	A3		A31			Colonies are round, surface color is brown, reverse color is brown
			A32			Colonies are round, surface color is white, reverse color is yellowish white

Origin	Sample	Sample Picture	Isolate Code	Isolate	Colony Characteristics
			A34		<i>Colonies are round, the surface color is greenish white, the reverse color is white</i>
	A4		A41		<i>Colonies are irregular in shape, surface color is white, reverse color is white</i>
			A42		<i>Colonies are round, surface color is white, reverse color is yellowish white</i>
			A43		<i>Colonies are round, surface color is green, reverse color is green</i>
			A44		<i>Colonies are round, surface color is white, reverse color is yellowish white</i>
	A5		A51		<i>Colonies are round, surface color is green, reverse color is green</i>
			A52		<i>Colonies are irregular in shape, surface color is white, reverse color is yellowish white</i>

Origin	Sample	Sample Picture	Isolate Code	Isolate	Colony Characteristics	
Ambon bananas	B1		B11			Colonies are round, the surface color is yellowish green, the reverse color is yellowish green
						Colonies are round, surface color is red, reverse color is red
	B2		B23			Colonies are irregular in shape, surface color is white, reverse color is yellowish white
			B24			Colonies are irregular in shape, surface color is white, reverse color is white
	B5		B51			Colonies are irregular in shape, surface color is white, reverse color is yellow
			B52			Colonies are round, surface color is white, reverse color is yellowish white

Origin	Sample	Sample Picture	Isolate Code	Isolate	Colony Characteristics	
			B53			Colonies are round, the surface color is yellowish white, the reverse color is yellowish white
			B54			Colonies are round, the surface color is yellowish white, the reverse color is yellowish white
			B55			Colonies are round, the surface color is yellowish white, the reverse color is yellowish white
Medan oranges	O1		O11			Colonies are round, surface color is white, reverse color is yellowish white
			O13			Colonies are round, the surface color is greenish white, the reverse color is yellowish white
Avocados	V2		V22			Colonies are round, the surface color is greenish white, the reverse color is yellowish white
	V4		V41			Colonies are round, surface color is white, reverse color is yellowish white



Gambar 1. (A) Hasil visualisasi PCR isolat (M) DNA ladder marker 100bp, (1) kontrol positif, (2) A11, (3) A21, (4) A22, (5) A23, (6) A31, (7) A32, (8) A34, (9) A41, (10) A42, (11) A43, (12) A44, (13) A51, (14) A52, (B) Hasil visualisasi PCR isolat (M) DNA ladder marker 100bp, (1) kontrol positif, (2) B11, (3) B22, (4) B23, (5) B24, (6) B51, (7) B52, (8) B53, (9) B54, (10) B55, (11) O11, (12) O13, (13) V22 (14) V41

Figure 1. (A) PCR product visualization result of isolate (M) DNA ladder marker 100 bp, (1) positive control, (2) A11, (3) A21, (4) A22, (5) A23, (6) A31, (7) A32, (8) A34, (9) A41, (10) A42, (11) A43, (12) A44, (13) A51, (14) A52, (B) PCR product visualization result of isolate (M) DNA ladder marker 100 bp, (1) positive control, (2) B11, (3) B22, (4) B23, (5) B24, (6) B51, (7) B52, (8) B53, (9) B54, (10) B55, (11) O11, (12) O13, (13) V22, (14) V41

Sekuens nukleotida dan asam amino pada gen *idh* dari *P. griseofulvum* dan *P. expansum* mempunyai perbedaan antara lain posisi asam amino tertentu, penambahan panjang intron 1 pada *P. expansum*, dan substitusi asam amino lisin menjadi treonin dalam area pengikatan koenzim pada *P. expansum*. Perbedaan inilah yang memengaruhi produksi patulin dan aktivitas enzim (Dombrink-Kurtzman, 2006).

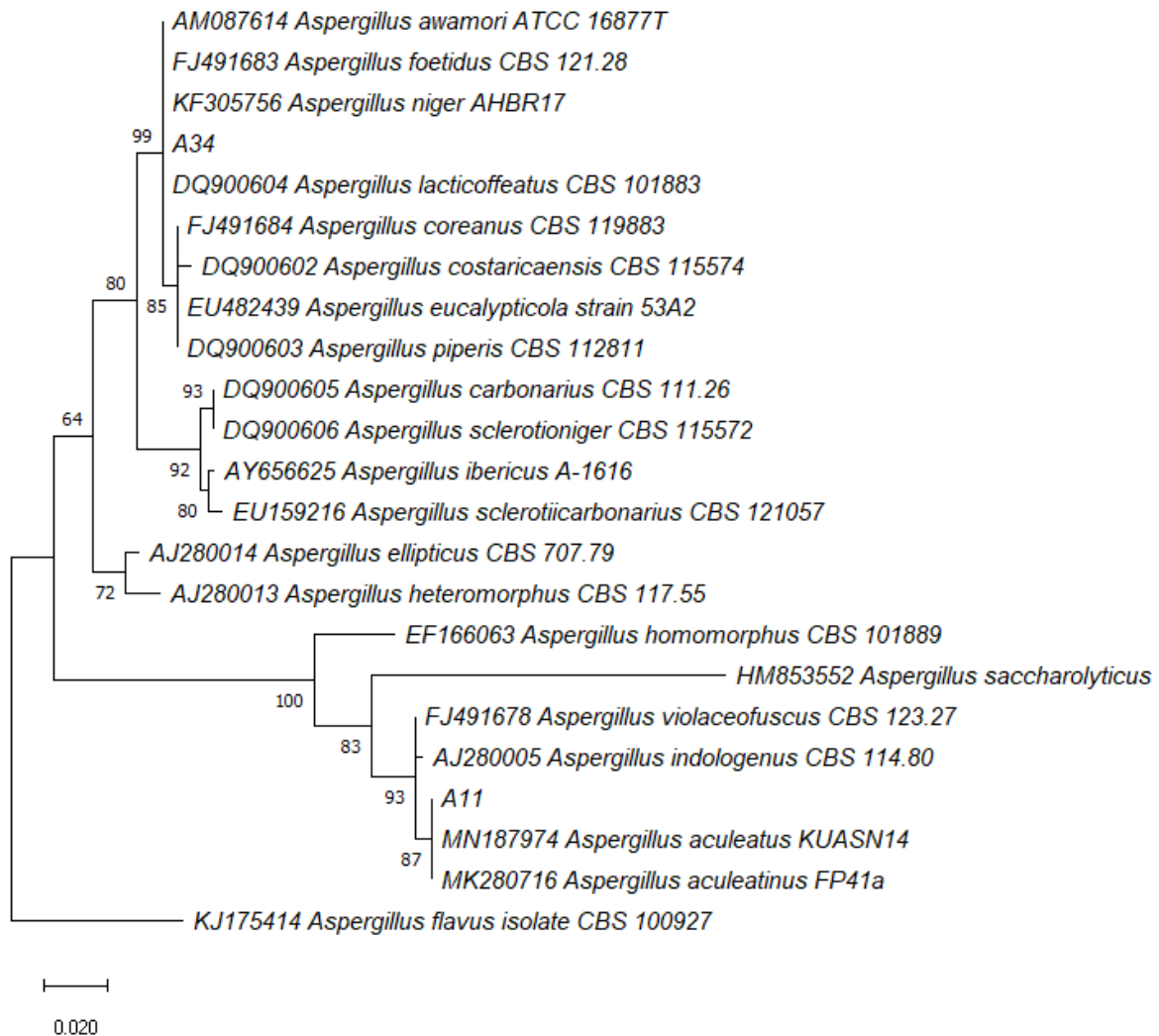
Gen *idh* tidak selalu mengindikasikan ada/tidaknya produksi patulin. Berdasarkan hasil penelitian Rharmitt (2016), isolat yang positif gen *idh* belum tentu dapat memproduksi patulin, sebaliknya ada beberapa isolat yang negatif gen *idh* tapi mampu memproduksi patulin. Hal ini mungkin disebabkan karena jalur biosintesis patulin belum dipahami sepenuhnya. Ada kemungkinan bahwa gen *idh* bukan merupakan gen yang berperan utama dalam produksi patulin. Gen *idh* bekerja mengubah *iso-epoxydon* menjadi filostin yang kemudian secara berurutan diubah menjadi neopatulin, askladiol, dan akhirnya menjadi patulin. Namun, ada kemungkinan bahwa filostin, yang merupakan prekursor patulin, diproduksi melalui gentisil alkohol dengan melewati reaksi yang melibatkan gen *idh*.

Identitas isolat positif gen *idh*

Sekuens produk hasil amplifikasi PCR dianalisis dan pohon filogenetik disusun berdasarkan analisis sekuens ITS dari kelima isolat yang positif terdeteksi *idh*. Berdasarkan hasil BLAST yang dapat dilihat di Tabel 2, kelima isolat (A11, A34, A43, A51, dan B23) tersebut teridentifikasi sebagai *Aspergillus aculeatus* KUASN 14, *A. niger* AHBR17, *Cladosporium anthropophilum* ID53, *Cladosporium tenuissimum* SAAS-17, dan *Talaromyces verruculosus* 5A3. Pohon filogenetik dari masing-masing isolat dibuat berdasarkan genusnya sehingga terdapat 3 pohon filogenetik yang disusun. Berdasarkan analisis filogenetik dari ITS, kelima isolat (A11, A34, A43, A51, dan B23) mempunyai homologi yang tinggi dengan *A. aculeatus*, *A. niger*, *C. anthropophilum*, *C. tenuissimum*, dan *Talaromyces verruculosus*. Pohon filogenetik dari kelima isolat dapat dilihat pada Gambar 2-4, dan dari gambar tersebut dapat terlihat bahwa isolat tidak dapat diidentifikasi dengan baik. Hal ini terlihat dari letak isolat dalam satu *clade* yang mengandung lebih dari satu spesies. Masing-masing isolat tidak terpisah secara tepat menjadi satu *clade* tertentu.

Tabel 2. Hasil identifikasi molekuler
 Table 2. Molecular identification result

Kode Isolat (Isolate code)	Persentase identitas (%) (Percent Identity (%))	Query Cover (%)	E value	Identitas (Identity)
A11	100	99	0.0	<i>Aspergillus aculeatus</i> KUASN 14
A34	99.67	99	0.0	<i>Aspergillus niger</i> AHBR17
A43	99.82	100	0.0	<i>Cladosporium anthropophilum</i> ID53
A51	100	100	0.0	<i>Cladosporium tenuissimum</i> SAAS-17
B23	100	100	0.0	<i>Talaromyces verruculosus</i> 5A3



Gambar 2. Pohon filogenetik dari isolat A11 dan A34 menggunakan metode *Maximum Likelihood* berdasarkan analisis ITS

Figure 2. The phylogenetic tree of A11 and A34 strains by *Maximum Likelihood* method based on analysis of ITS

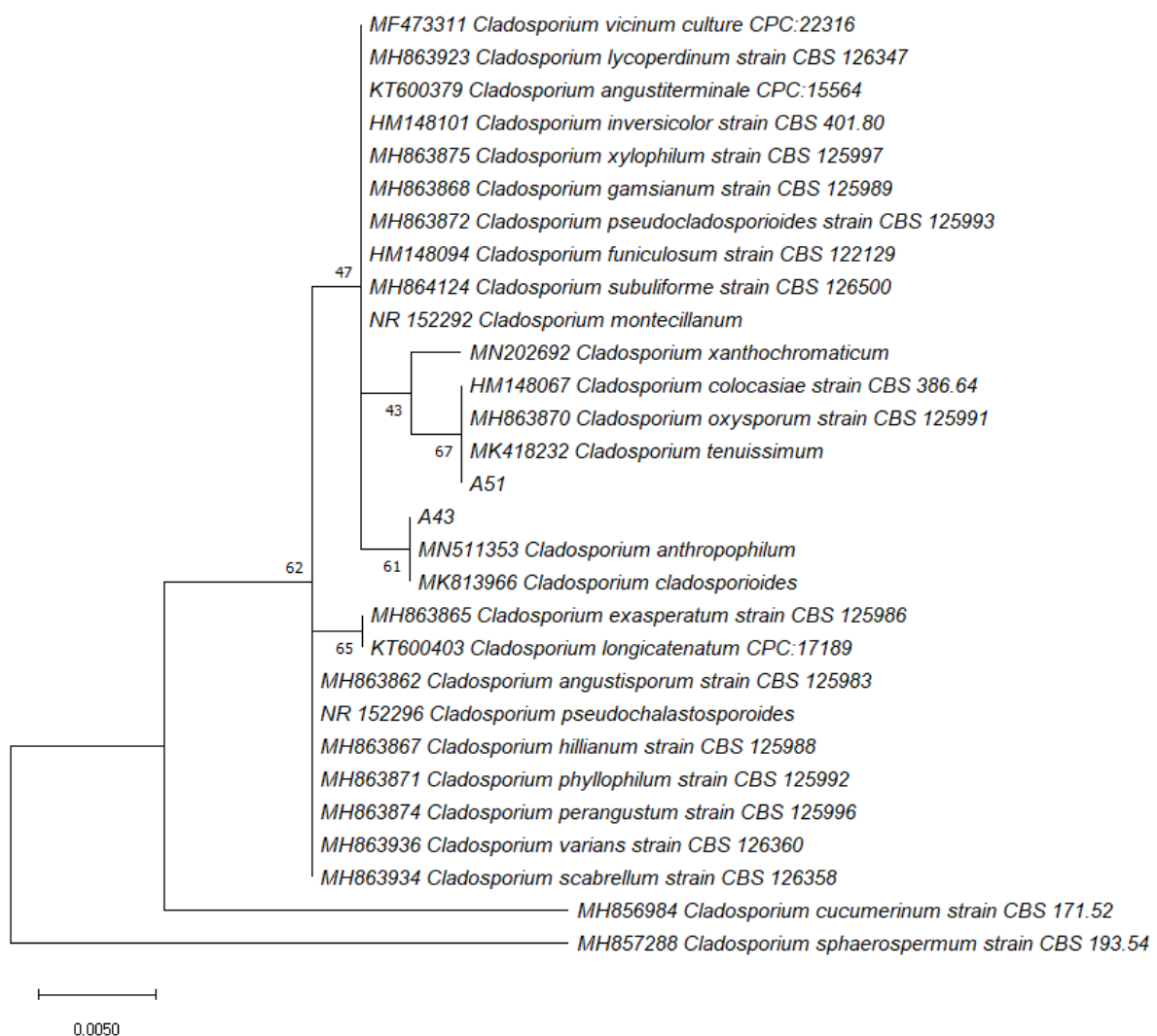
Identifikasi dengan menggunakan area ITS tidak berjalan maksimal pada beberapa genus yang sangat spesifik seperti *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, dan *Trichoderma* karena *taxa* tersebut memiliki celah yang sangat sempit atau tidak ada celah sama sekali pada area ITS-nya. Penanda sekunder digunakan untuk memperoleh identitas

yang lebih akurat pada tingkat spesies. Penanda sekunder yang dapat digunakan untuk identifikasi kapang antara lain RPB1, RPB2, tub2/BenA, dan calmodulin (CaM) untuk genus *Aspergillus* dan *Penicillium*. Barcode DNA yang direkomendasikan untuk *Penicillium* adalah tub2/BenA, sedangkan untuk analisis filogenetik adalah RPB2 atau CaM karena hasil-

nya lebih mudah disejajarkan. Barcode DNA yang direkomendasikan untuk *Aspergillus* adalah CaM dan tub2/BenA (Raja *et al.*, 2017).

A. aculeatus termasuk ke dalam kapang *Aspergillus* section *Nigri* atau aspergilli hitam, merupakan kapang kontaminan yang sering ditemukan pada pangan dan pakan (Nielsen *et al.*, 2009). *A. aculeatus* tergolong dalam *clade uniseriate black aspergilli*, kapang dalam *clade* tersebut dapat memproduksi metabolit sekunder berupa poliketida, turunan peptida non ribosomal, maupun campuran. *A. aculeatus* merupakan kapang yang umum ditemukan pada buah, biji, maupun kacang yang mengalami pembusukan (Petersen *et al.*, 2014).

A. aculeatus terbukti telah menghasilkan beberapa metabolit sekunder seperti okratoksin A, aculin A, fumonisin, *secalonic acid*, *nominine*, *okaramine*, dan *calbistrin* (Petersen *et al.*, 2014; Petersen *et al.*, 2015; Lamboni *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Belum ada penelitian yang menyebutkan bahwa *A. aculeatus* dapat memproduksi patulin. Kapang tersebut telah terdeteksi mempunyai gen 6MSAS yang merupakan prekursor patulin dan aculin A. Jalur biosintesis antara aculin A dan patulin mempunyai kesamaan pada empat tahap awal, terdapat beberapa kesamaan juga pada gen yang terlibat yaitu AcuC dan AcuD merupakan homolog dari PatI dan PatH (Petersen *et al.*, 2015).



Gambar 3. Pohon filogenetik dari isolat A43 dan A51 menggunakan metode *Maximum Likelihood* berdasarkan analisis ITS

Figure 3. The phylogenetic tree of A43 and A51 strains by *Maximum Likelihood* method based on analysis of ITS



Gambar 4. Pohon filogenetik dari isolat B23 menggunakan metode *Maximum Likelihood* berdasarkan analisis ITS

Figure 4. The phylogenetic tree of B23 strain by *Maximum Likelihood* method based on analysis of ITS

A. niger menyebabkan gejala yang paling parah pada penyakit pascapanen utama pada apel yaitu busuk *Aspergillus* (Zhang *et al.*, 2018). *A. niger* menghasilkan beberapa mikotoksin seperti okratoksin A, okratoksin B, citrinin, dan gliotoxin (Navale *et al.*, 2021). Belum ada penelitian yang menyebutkan bahwa *A. niger* dapat memproduksi patulin. *A. niger* telah terdeteksi mempunyai gen 6MSAS, yang merupakan penyandi 6MSA, yang dikenal juga sebagai prekursor patulin. Senyawa 6MSA ini juga merupakan prekursor dari yanuthone D. Terdapat persamaan antara biosintesis yanuthone D dan patulin yaitu YanC merupakan homolog dari PatI (Holm *et al.*, 2014). Kluster gen biosintetik pada *P. expansum* berbagi 5 dari 10 gen dengan kluster gen biosintetik yanuthone D pada *A. niger*. Kluster gen biosintetik yanuthone D menunjukkan homologi

setidaknya 9 dari 10 gen dibandingkan kluster gen biosintetik patulin (Nielsen *et al.*, 2017).

Cladosporium sp. merupakan kapang yang sering ditemukan pada apel, tomat, raspberi, dan stroberi (Cunha *et al.*, 2014; Nam *et al.*, 2015; Farwell *et al.*, 2023). *Cladosporium* sp. dilaporkan menghasilkan mikotoksin berupa turunan citrinin (Salvatore *et al.*, 2021). Mikotoksin utama yang dihasilkan oleh *Cladosporium* sp. adalah *cladosporin*, *isocladosporium*, *emodin*, *epicladosporic acid*, *fagicladosporic acid*, dan ergot alkaloid (Alwatban *et al.*, 2014). *C. anthropophilum* dan *C. tenuissimum* belum pernah dilaporkan dapat menghasilkan patulin.

Penicillium verruculosum atau yang sekarang disebut *T. verruculosus* merupakan kapang penyebab penyakit busuk hitam yang ditemukan pada buah mangga dan *storage rot* pada kacang tanah (Chadni *et al.*, 2017; Ortega-Acosta *et al.*, 2018). *Talaromyces*

sp. dapat menghasilkan 221 jenis metabolit sekunder yang terdiri dari 43 alkaloid dan peptida, 88 ester, 31 poliketida, 19 quinone, 15 steroid dan terpenoid, dan 25 senyawa struktur lainnya. *T. verruculosus* menghasilkan metabolit sekunder berupa (E)-3-(2,5-dioxo-3-(propan-2-ylidene) pyrrolidin-1-yl) yang merupakan golongan alkaloid dan peptida serta turunan isokumarin yang merupakan golongan ester (Zhai *et al.*, 2016). Namun, belum ada penelitian yang menyebutkan bahwa *T. verruculosus* dapat memproduksi patulin.

KESIMPULAN

Isolat yang diperoleh sebanyak 26 isolat yang didapat dari 4 jenis buah tropis yaitu 13 isolat dari apel malang, 9 isolat dari pisang ambon, 2 isolat dari jeruk medan, dan 2 isolat dari alpukat. Deteksi kapang penghasil patulin dengan gen *idh* dilakukan terhadap 26 isolat, dan terdapat 5 dari 26 (19,2%) isolat yang positif gen *idh* yaitu A11, A34, A43, A51, dan B23. Isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium antropophilum*, *Cladosporium tenuissimum*, dan *Talaromyces verruculosus*. Belum ada literatur yang mendukung bahwa kapang-kapang tersebut dapat memproduksi patulin. Gen *idh* tidak selalu mengindikasikan ada/tidaknya produksi patulin. Ada kemungkinan bahwa gen *idh* bukan merupakan gen yang berperan utama dalam produksi patulin. Hal ini dikarenakan jalur biosintesis patulin belum dipahami sepenuhnya. Deteksi kapang penghasil patulin secara molekuler membutuhkan konfirmasi dengan penggunaan primer atau gen target lain. Identifikasi molekuler kapang membutuhkan penanda sekunder untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat di tingkat spesies. Produksi patulin dari kapang yang terdeteksi mempunyai gen *idh* perlu dikonfirmasi dengan metode kimia atau biosensor.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan dana penelitian dalam skema hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) atas nama Prof. Dr. Winiati P. Rahayu yang berjudul "Buah-Buahan Tropis Indonesia Bebas Kapang Toksikogen dan Patulin". Penghargaan penulis sampaikan kepada Laboratorium Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan IPB, Laboratorium South-East Asia Food & Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, dan Laboratorium Biotechnology Research Indonesia-Netherlands Pusat Penelitian Sumberdaya

Hayati & Bioteknologi (BIORIN PPSHB) IPB yang telah menyediakan fasilitas untuk penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alshannaq A, Yu JH. 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int J Environ Res Public Health* 14: 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Alwatban MA, Hadi S, Moslem MA. 2014. Mycotoxin production in *Cladosporium* species influenced by temperature regimes. *J Pure Appl Microbiol* 8: 4061–4069.
- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2018. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 8 Tahun 2018 Tentang Batas Maksimum Cemar Kimia dalam Pangan Olahan. Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta.
- Chadni Z, Rahaman MH, Jerin I, Hoque KMF, Reza MA. 2017. Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Mycology* 8: 48–57. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1302013>
- De Clercq N, Vlaemyneck G, Van Pamel E, Van Weyenberg S, Herman L, Devlieghere F, De Meulenaer B, Van Coillie E. 2016. Isoepoxydon dehydrogenase (*idh*) gene expression in relation to patulin production by *Penicillium expansum* under different temperature and atmosphere. *Int J Food Microbiol* 220: 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.004>
- Cunha SC, Faria MA, Pereira VL, Oliveira TM, Lima AC, Pinto E. 2014. Patulin assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products. *Food Control* 44: 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.043>
- Dombrink-Kurtzman MA. 2006. The isoepoxydon dehydrogenase gene of the patulin metabolic pathway differs for *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium expansum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 89: 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10482005-9002-5>
- Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R. 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited "FAO estimate" of 25%. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60: 2773–2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- Farwell LH, Deakin G, Harris AL, Fagg G, Passey T, Verheecke-Vaessen C, Magan N, Xu X. 2023. *Cladosporium* species: The predominant species present on raspberries from the UK and

- Spain and their ability to cause skin and stigmata infections. *Horticulturae* 9: 128. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020128>
- Frisvad JC. 2018. A critical review of producers of small lactone mycotoxins: Patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin J* 11: 73–100. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2294>
- Hammami W, Al-Thani R, Fiori S, Al-Meer S, Atia FA, Rabah D, Migheli Q, Jaoua S. 2017. Patulin and patulin producing *Penicillium* spp. Occurrence in apples and apple-based products including baby food. *J Infect Dev Ctries* 11: 343–349. <https://doi.org/10.3855/jidc.9043>
- Holm DK, Petersen LM, Klitgaard A, Knudsen PB, Jarczyska ZD, Nielsen KF, Gotfredsen CH, Larsen TO, Mortensen UH. 2014. Molecular and chemical characterization of the biosynthesis of the 6-MSA-derived meroterpenoid yanuthone D in *Aspergillus niger*. *Chem Biol* 21: 519–529. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.01.013>
- loi JD, Zhou T, Tsao R, Marcone MF. 2017. Mitigation of patulin in fresh and processed foods and beverages. *Toxins* 9: 157. <https://doi.org/10.3390/toxins9050157>
- [Kementan] Kementerian Pertanian. 2018. Statistik Konsumsi Pangan Tahun 2018. Kementerian Pertanian, Jakarta.
- [Kementan] Kementerian Pertanian. 2019. Produksi Buah-Buahan di Indonesia Tahun 2014-2018. Kementerian Pertanian, Jakarta.
- Lamboni Y, Nielsen KF, Linnemann AR, Gezgin YK, Hell K, Nout MJR, Smid EJ, Tamo M, van Boekel MAJS, Hoof JB, Frisvad JC. 2016. Diversity in secondary metabolites including mycotoxins from strains of *Aspergillus* section *nigri* isolated from raw cashew nuts from Benin, West Africa. *PLoS One* 11: e0164310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164310>
- Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. 2016. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreserv Biobank* 14: 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Luque MI, Andrade MJ, Rodríguez A, Bermúdez E, Córdoba JJ. 2013. Development of a multiplex PCR method for the detection of patulin-, ochratoxin A- and aflatoxin-producing moulds in foods. *Food Anal Methods* 6: 1113–1121. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9516-1>
- Luque MI, Rodríguez A, Andrade MJ, Gordillo R, Rodríguez M, Córdoba JJ. 2011. Development of a PCR protocol to detect patulin producing moulds in food products. *Food Control* 22: 1831–1838. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.020>
- Nam MH, Park MS, Kim HS, Kim TI, Kim HG. 2015. *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* cause blossom blight in strawberry in Korea. *Mycobiology* 43: 354–359. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.354>
- Navale V, Vamkudoth KR, Ajmera S, Dhuri V. 2021. *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. *Toxicol Rep* 8: 1008–1030. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.04.013>
- Nielsen JC, Grijseels S, Prigent S, Ji B, Dainat J, Nielsen KF, Frisvad JC, Workman M, Nielsen J. 2017. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nat Microbiol* 2: 17044. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.44>
- Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC. 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal Bioanal Chem* 395: 1225–1242. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3081-5>
- Notardonato I, Gianfagna S, Castoria R, Ianiri G, De Curtis F, Russo MV, Avino P. 2021. Critical review of the analytical methods for determining the mycotoxin patulin in food matrices. *Rev Anal Chem* 40: 144–160. <https://doi.org/10.1515/revac-2021-0131>
- Ortega-Acosta SA, Reyes-García G, Vargas-Álvarez D, Gámez-Vázquez AJ, Ávila-Perches MA, Espinosa-Trujillo E, Bello-Martínez J, Damián-Nava A, Palemón-Alberto F. 2018. First report of *Talaromyces verruculosus* causing storage rot of groundnut in Mexico. *New Dis Rep* 38: 27. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.038.027>
- Oteiza JM, Khaneghah AM, Campagnollo FB, Granato D, Mahmoudi MR, Sant'Ana AS, Gianuzzi L. 2017. Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. *LWT—Food Sci Technol* 80: 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.025>
- Paterson RRM. 2004. The isoeopoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. *Micol Res* 108: 1431–1437. <https://doi.org/10.1017/S095375620400142X>
- Paterson RRM. 2007. The isoeopoxydon dehydrogenase gene PCR profile is useful in fungal taxonomy. *Rev Iberoam Micol* 24: 289–293.

- Petersen LM, Hoeck C, Frisvad JC, Gotfredsen CH, Larsen TO. 2014. Dereplication guided discovery of secondary metabolites of mixed biosynthetic origin from *Aspergillus aculeatus*. *Molecules* 19: 10898–10921. <https://doi.org/10.3390/molecules190810898>
- Petersen LM, Holm DK, Gotfredsen CH, Mortensen UH, Larsen TO. 2015. Investigation of a 6-MSA synthase gene cluster in *Aspergillus aculeatus* reveals 6-MSA-derived aculinic acid, aculins A-B and epi-aculin A. *Chem Bio Chem* 16: 2200–2204. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500210>
- Paramastuti R, Rahayu WP, Nurjanah S. 2021. Patulin-producing mold, toxicological, biosynthesis, and molecular detection of patulin. *Adv Food Sci Sustain Agric Agroind Eng* 4: 93–109. <https://doi.org/10.21776/ub.afssaae.2021.004.02.3>
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J Nat Prod* 80: 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rharmitt S, Hafidi M, Hajjaj H, Scordino F, Giosa D, Giuffre L, Barreca D, Criseo G, Romeo O. 2016. Molecular characterization of patulin producing and non-producing *Penicillium* species in apples from Morocco. *Int J Food Microbiol* 217: 137–140. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.019>
- Rodríguez A, Isabel Luque M, Andrade MJ, Rodríguez M, Asensio MA, Córdoba JJ. 2011. Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products. *Food Microbiol* 28: 1190–1199. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.04.004>
- Rodríguez A, Rodríguez M, Andrade MJ, Córdoba JJ. 2012. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *Int J Food Microbiol* 155: 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.007>
- Salvatore MM, Andolfi A, Nicoletti R. 2021. The genus cladosporium: A rich source of diverse and bioactive natural compounds. *Molecules* 26: 1–45. <https://doi.org/10.3390/molecules26133959>
- Snini SP, Tadrict S, Laffitte J, Jamin EL, Oswald IP, Puel O. 2014. The gene PatG involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase. *Int J Food Microbiol* 171: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.020>
- Tannous J, Atoui A, El Khoury A, Kantar S, Chdid N, Oswald IP, Puel O, Lteif R. 2015. Development of a real-time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples. *Food Microbiol* 50: 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.001>
- Tola M, Kebede B. 2016. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food Agric* 2: 1–12. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1191103>
- Vidal A, Ouhibi S, Ghali R, Hedhili A, Saeger SD, Boevre MD. 2019. The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food Chem Toxicol* 129: 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.048>
- Zhai MM, Li J, Jiang CX, Shi YP, Di DL, Crews P, Wu QX. 2016. The bioactive secondary metabolites from *Talaromyces* species. *Nat Prod Bioprospect* 6: 1–24. <https://doi.org/10.1007/s13659-015-0081-3>
- Zhang X, Li Y, Wang H, Gu X, Zheng X, Wang Y, Diao J, Peng Y, Zhang H. 2016. Screening and identification of novel ochratoxin A-producing fungi from grapes. *Toxins (Basel)* 8: 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins8110333>
- Zhang M, Tang J, Huang Z, Hu K, Li Y, Han Z, Chen X, Hu L, Yao G, Zhang H. 2018. Deletion of catalase gene *cpeB* reduces *Aspergillus niger* virulence in apple fruits. *J Agric Food Chem* 66: 5401–5409. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01841>