

diverse ditte sementiere. Per ciascuno di questi lotti sono state svolte tre prove *in vitro* utilizzando un substrato di coltura a base di agar patata addizionato di streptomicina solfato (25 mg/L). Ogni prova ha previsto l'impiego di 400 semi per lotto i quali sono stati distribuiti in capsule Petri contenenti 10 semi ciascuna. Dopo un periodo di incubazione di 7 giorni ad una temperatura media di 20-22 °C, è stata valutata la presenza di contaminazioni fungine da *Alternaria* spp. Sono stati quindi selezionati complessivamente 50 isolati rappresentativi di *Alternaria* provenienti dai diversi lotti di semi al fine di svolgere le prove di patogenicità *in vivo* su pianta. Gli isolati sono stati propagati su terreno di coltura agarizzato a base di patata e carota per favorirne la sporulazione. Dopo un periodo di incubazione in cella climatica alla temperatura di 20 °C con un fotoperiodo di 12 ore, è stata preparata la sospensione conidica necessaria all'inoculazione. Per ciascun isolato sono state inoculate sei piante sane di basilico (cv. Italiano Classico) di cui tre sono state posizionate in cella climatica a 22 °C e tre in cella climatica a 26 °C. I vasi di basilico sono stati mantenuti incappucciati con un sacchetto di polietilene per un periodo di 5 giorni per garantire un livello di umidità necessario ai fini dell'attacco fogliare da parte del patogeno.

Su un totale di 50 isolati saggiati, 20 sono risultati patogeni su basilico determinando a carico dell'apparato fogliare aree necrotiche più o meno estese.

L'*Alternaria* spp. è un patogeno oramai diffuso, la cui presenza è stata riscontrata in diversi areali di produzione di basilico in Piemonte dove la coltivazione si effettua in campo e in serra. La trasmissione tramite materiale di propagazione infetto, sembrerebbe essere quindi la via preferenziale di introduzione di questo patogeno nei sistemi di produzione intensiva.

A partire da questi risultati preliminari, sono previste successive prove di patogenicità che coinvolgeranno i restanti isolati di *Alternaria* spp. ottenuti da seme.

Ringraziamenti

Lavoro svolto con un contributo del progetto Europeo Horizon 2020 (EMPHASIS), No 634179 "Effective Management of Pests and Harmful Alien Species - Integrated Solutions".

Lavori citati

GULLINO M. L., GILARDI G., GARIBALDI A. (2014) - Seed-Borne Fungal Pathogens of Leafy Vegetable Crops in: Global Perspectives on the Health of Seeds and Plant Propagation Material, Plant Pathology in the 21st Century. Springer Science, 47-56.

GILARDI G., GARIBALDI A., GULLINO M. L. (2018) - Emerging pathogens as a consequence of globalization and climate change: leafy vegetables as a case study. *Phytopathologia Mediterranea*, 57, 1, 146-152.

SICILIANO I., ORTEGA F. S., GILARDI G., BOSIO P., GARIBALDI A., GULLINO M. L. (2018) - Molecular phylogeny and characterization of secondary metabolite profile of plant pathogenic *Alternaria* species isolated from basil. *Food Microbiology*, 73, 264-274.

Studio della biosintesi della griseofulvina, micotossina prodotta dal patogeno *Penicillium griseofulvum*

Silvia Valente*** - Agnese Cometto** - Maria Lodovica Gullino*** - Angelo Garibaldi* - Davide Spadaro***

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

**Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DiSAFA) - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

La griseofulvina è una micotossina ad attività genotossica classificata dall'agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro come possibile cancerogeno per l'uomo (IARC - classe 2B). Inizialmente scoperta come molecola antibiotica, ha una forte attività antifungina ed è per questo utilizzata in medicina e in campo veterinario contro dermatofiti. Questa micotossina viene prodotta da numerose specie appartenenti al genere *Penicillium*, fra cui *P. griseofulvum*, uno degli agenti del marciume verde-azzurro su mele (Spadaro *et al.*, 2011). Considerata l'importanza della griseofulvina, sono stati studiati i geni deputati alla sua biosintesi. Il cluster della griseofulvina è stato identificato in *P. aethiopicum* e in *P. griseofulvum* e alcuni dei geni putativi sono stati in precedenza verificati ottenendo mutanti knockout (Banani *et al.*, 2016; Cacho *et al.*, 2014).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare il ruolo dei putativi fattori trascrizionali, codificati dai geni *gsfR1* e *gsfR2*, e di investigare il ruolo della griseofulvina sulla patogenicità di *P. griseofulvum*.

Sono stati ottenuti dei mutanti knockout per i geni *gsfR1* e *gsfR2* e dei knockout per il gene *gsfA* codificante per l'enzima chiave del cluster, ovvero una polichetide sintasi. La delezione del gene è stata ottenuta mediante trasformazione genica mediata da *Agrobacterium tumefaciens*. Attraverso PCR e qPCR sono stati verificati

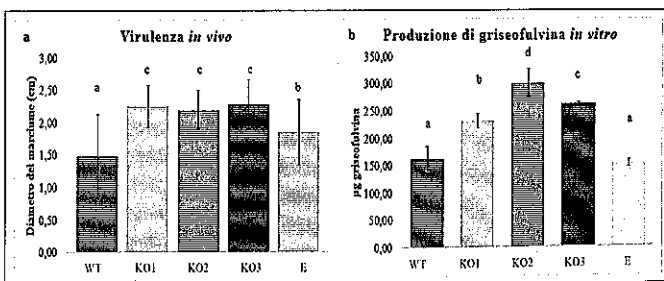


Figura 1 - Effetto della delezione del gene *gsfR1* sulla virulenza (a) e sulla produzione *in vitro* di griseofulvina (b). WT = ceppo wildtype, KO = ceppi knockout, E= ceppo ectopico. Trattamenti con lettere uguali non sono statisticamente diversi secondo il test di Duncan ($p < 0,05$).

Figure 1 - Effect of the deletion of *gsfR1* gene in the virulence (a) and in the production in vitro of griseofulvin in vitro (b). WT= wildtype strain; KO= knockout mutants; E= ectopic strain. Treatments followed by the same letter are not statistically different following Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

rispettivamente il corretto ottenimento dei mutanti e il numero di integrazioni nel genoma. Sono stati selezionati tre deletanti per ciascun gene più un ceppo ectopico, ovvero risultato di un evento di ricombinazione non omologa, resistente all'antibiotico di selezione e contenente una copia funzionale del gene target. I ceppi selezionati sono stati inoculati in PDA per 7 giorni ed è stata valutata la crescita *in vitro*, la sporulazione e la produzione di griseofulvina (Fig. 1).

La virulenza dei ceppi è stata valutata inoculando 20 µl di una sospensione di 1×10^6 conidi/mL in mele 'Golden Delicious' e misurando il marciume dopo 5 e 7 giorni dall'inoculazione.

Come atteso, i mutanti per la polichetide sintasi non producono griseofulvina *in vitro*. Al contrario i mutanti per *gsfR1* producono significativamente più griseofulvina rispetto al wildtype mentre la delezione del gene *gsfR2* non porta ad un significativo cambiamento di produzione *in vitro*.

La delezione dei geni non sembra influire sulla crescita dei ceppi *in vitro*, ad eccezione dei mutanti per il gene *gsfR1* che producono significativamente meno conidi dei ceppi wildtype e degli ectopici, assumendo una colorazione bianca della colonia su piastra.

I mutanti di delezione per *gsfA* si sono dimostrati meno virulenti del ceppo wildtype, mentre i mutanti di delezione per *gsfR1*, in grado di produrre significativamente più griseofulvina, sembrerebbero essere più virulenti di *P. griseofulvum* wildtype.

Questo lavoro ha portato a una migliore comprensione della biosintesi di griseofulvina. È stato studiato il ruolo dei due fattori di trascrizione putativi. Dai risultati si può affermare che *gsfR2* non è coinvolto nella regolazione della biosintesi di griseofulvina, mentre *gsfR1* regola negativamente la biosintesi di griseofulvina proteggendo *P. griseofulvum* dagli effetti negativi causati da un'eccessiva produzione di questo composto antimicotico. È stata anche indagata la relazione tra produzione di griseofulvina e la patogenicità su mele. A quanto ci risulta, questo è il primo lavoro che mette in relazione la produzione di griseofulvina con la patogenicità e ulteriori studi potrebbero confermare questa ipotesi.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato svolto con il contributo del progetto "LIFE.SU.SA.FRUIT - Low pesticide IPM in sustainable and safe fruit production", finanziato dall'Unione Europea. (LIFE13 ENV/HR/000580).

Lavori citati

BANANI H., MARCET-HOUBEN M., BALLESTER A. R., ABBRUSCATO P., GONZÁLEZ-CANDELAS L., GABALDÓN T., SPADARO D. (2016) - Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. BMC genomics, 17, 19.
CACHO R. A., TANG Y., CHOOI Y. H. (2014) - Next-generation sequencing approach for connecting secondary metabolites to biosynthetic gene clusters in fungi. Frontiers in Microbiology, 5, 1-16.
SPADARO D., LORÉ A., AMATULLI M. T., GARIBALDI A., GULLINO M. L. (2011) - First Report of *Penicillium griseofulvum* Causing Blue Mold on Stored Apples in Italy (Piedmont). Plant Disease, 95, 76-76.

Ritrovamento di *Aspergillus parasiticus* forti produttori di aflatossine su nocciole turche

Silvia Valente^{*,**} - Giovanna Roberta Meloni^{*} - Maria Lodovica Gullino^{*,**} - Angelo Garibaldi^{*} - Davide Spadaro^{*,**}

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

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

Molte specie appartenenti al genere *Aspergillus* possono svilupparsi sulle nocciole in campo e in post-raccolta; la loro presenza rappresenta un problema per la sicurezza alimentare e la qualità del prodotto, in quanto molte specie sono potenzialmente produttrici di micotossine. In particolare, *A. flavus* e *A. parasiticus* sono noti per la loro abilità di produrre aflatossine, molecole con attività mutagena, teratogena e immunosoppressiva, classificate dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come metaboliti cancerogeni per l'uomo (Prencipe *et al.*, 2018, Kabak *et al.*, 2016). Ci sono numerosi tipi di aflatossine prodotte in natura, le quattro principali sono le aflatossine B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2). Mentre quasi tutti gli isolati di *A. parasiticus* sono in grado di produrre sia aflatossine B che aflatossine G, solamente il 40-50% degli isolati di *A. flavus* è in grado di produrre AFB1 e AFB2 (Schmidt-Heydt *et al.*, 2010; Kabak *et al.*, 2016).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la presenza di isolati aflatossigeni su nocciole fresche ed essiccate provenienti da Italia e Turchia.

Gli isolamenti sono stati effettuati a partire da nocciole con guscio, sgusciate e visibilmente ammuffite (Fig. 1). In particolare, sono stati pesati 20 grammi di nocciole con guscio e 10 grammi di nocciole sgusciate e sono stati messi in agitazione con 80 ml e 90 ml rispettivamente di soluzione salina Ringer addizionata di 1% di Tween 20, un tensioattivo che favorisce la sospensione delle spore nella soluzione. Sono stati piastrati 100 µl di ciascuna diluizione seriale su due terreni selettivi, ovvero Malt Extract Agar (MEA) con tetraciclina, e *Aspergillus flavus* and *parasiticus* Agar (AFPA). Il terreno AFPA permette di isolare ceppi potenzialmente aflatossigeni, i quali assumono una colorazione arancione sul retro della colonia dopo 48 ore di crescita sul terreno.

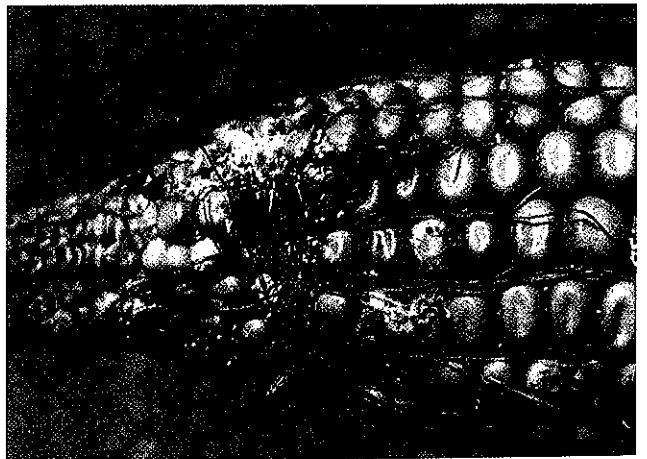
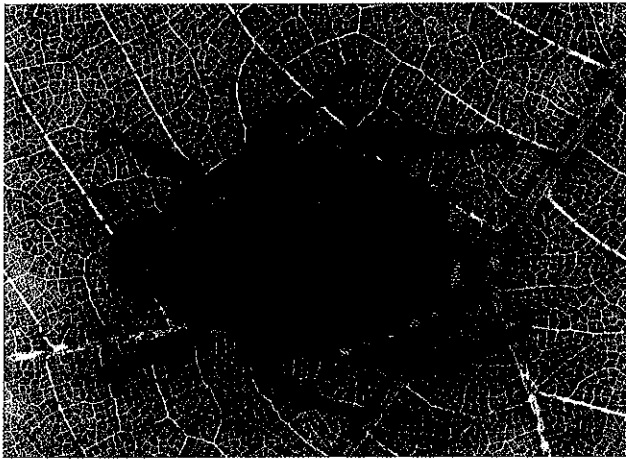
A partire dalle piastre ottenute sono stati reisolati alcuni ceppi fungini, morfologicamente riconducibili al genere *Aspergillus*. Gli isolati sono stati caratterizzati molecularmente.

Sono stati isolati 19 ceppi di *Aspergillus* sezione *Flavi* di cui 13 isolati di *A. flavus* e 6 di *A. parasiticus*. La maggior parte dei ceppi è stata isolata da nocciole già essiccate, solamente due isolati di *A. flavus* erano presenti su nocciole fresche. Tutti gli isolati di *A. parasiticus*

PROTEZIONE DELLE COLTURE

RIVISTA SCIENTIFICA DI PATOLOGIA VEGETALE, ENTOMOLOGIA
AGRARIA E DISERBO DELLE COLTURE

INCONTRI FITOIATRICI 2019



Volume 12

N° 2