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., Lorè 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 alfatossine 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 molecolarmente.
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*

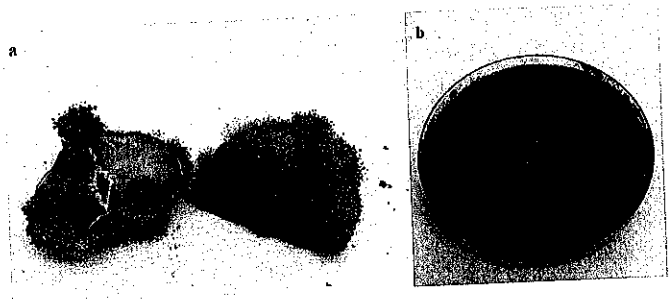


Figura 1 – *Aspergillus* sezione *Flavi* cresciuti su nocciola (a) e su YES Agar (b).
Figure 1 – Aspergillus *section* Flavi *grown on hazelnut (a) and on YES Agar (b).*

sono stati isolati da nocciole turche, probabilmente a causa delle diverse condizioni climatiche in Turchia che favoriscono maggiormente lo sviluppo di questa specie fungina.
Per valutare il potenziale aflatossigeno degli isolati fungini questi sono stati fatti crescere su Yeast Extract Sucrose (YES) Agar per 7 giorni, tre dischetti di micelio sono stati successivamente inoculati in 100 ml di YES brodo e sono stati incubati al buio a 35°C per 7 giorni. Cinque ml di terreno liquido sono stati estratti tre volte con etil acetato e gli estratti sono stati analizzati in cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a un rivelatore a fluorescenza (HPLC-FLD).
Dei 19 ceppi isolati, sei sono risultati produttori di aflatossine *in vitro* di cui 4 ceppi di *A. parasiticus* e 2 di *A. flavus*. In particolare, i quattro isolati di *A. parasiticus* hanno prodotto *in vitro* fino a circa 70 ppm ($ug^{*}g^{-1}$) di aflatossina B1 e oltre 100 ppm di aflatossine totali (Tab. 1).
La presenza di specie produttrici di micotossine nelle nocciole essiccate rappresenta un grosso rischio per la sicurezza alimentare; i dati ottenuri rafforzano la necessità di valutare efficaci strategie di essiccazione e conservazione delle nocciole per limitare la presenza di tali microorganismi e di conseguenza la presenza di aflatossine nel prodotto finale.

Ringraziamenti
Il presente lavoro è stato svolto con il contributo del progetto "FDM – Food Digital Monitoring", finanziato dalla Regione Piemonte.

Lavori citati
KABAK B. (2016) - Aflatoxins in hazelnuts and dried figs: Occurrence and exposure assessment. Food chemistry, 211, 8-16.
PRENCIPE S., SICILIANO I., CONTESSA C., BOTTA R., GARIBALDI A., GULLINO M. L., SPADARO D. (2018) - Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from fresh chestnuts and along the chestnut flour process. Food Microbiology, 69, 159-169.
SCHMIDT-HEYDT M., RÜFER C. E., ABDEL-HADI A., MAGAN N., GEISEN R. (2010) - The production of aflatoxin B 1 or G 1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. Mycotoxin Research, 26, 241-246.

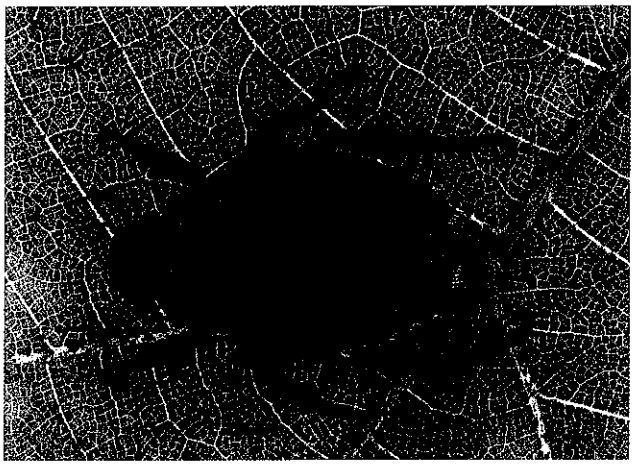
Tabella 1 – Produzione *in vitro* di aflatossine da parte di ceppi di *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* precedentemente isolati da nocciole fresche o essiccate. Le concentrazioni sono espresse in nanogrammi (ng) per millilitro di terreno (ml) (ppb).
Table 1 – Aflatoxin production in vitro by Aspergillus flavus *and* Aspergillus parasiticus *strains isolated from fresh or dried hazelnuts. The concentrations are expressed in nanograms (ng) per millilitre of liquid media (ml) (ppb).*

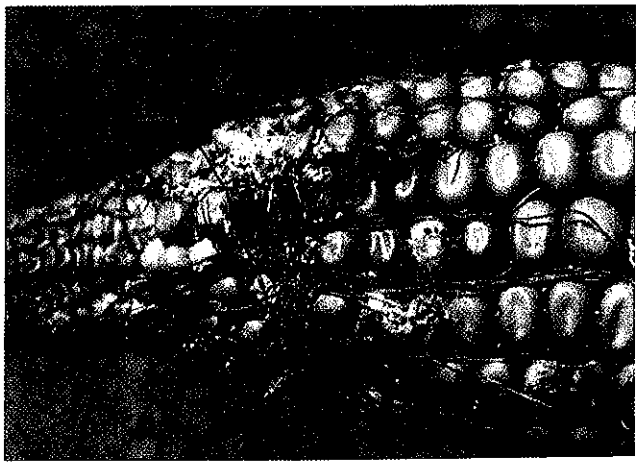
Ceppo	Isolamento	Origine	Identificazione	AFG2	AFG1	AFB2	AFB2
NAF1	Nocciole fresche	Italia	*A. flavus*	-	-	0,76	15,34
N1A-AF1	Nocciole fresche	Italia	*A. flavus*	-	-	0,85	15,17
LT1SA2	Nocciole essiccate	Turchia	*A. flavus*	-	-	-	-
HT1BAF1	Nocciole essiccate	Turchia	*A. parasiticus*	-	25271,32	1962,11	73875,27
HT2BA3	Nocciole essiccate	Turchia	*A. parasiticus*	-	18365,23	1611,49	73055,78
HT2BAF1	Nocciole essiccate	Turchia	*A. parasiticus*	-	20502,10	1247,28	46488,90
HT2SA5	Nocciole essiccate	Turchia	*A. parasiticus*	-	36117,58	2188,98	58635,48
HT2SA6	Nocciole essiccate	Turchia	*A. flavus*	-	-	-	-
HT3BAF1	Nocciole essiccate	Turchia	*A. parasiticus*	-	-	-	-
HT3BAF2	Nocciole essiccate	Turchia	*A. flavus*	-	-	-	-
EAF1	Nocciole essiccate	Italia	*A. flavus*	-	-	-	-
EAF2	Nocciole essiccate	Italia	*A. flavus*	-	-	-	-
EAF3	Nocciole essiccate	Italia	*A. flavus*	-	-	-	-
EAF4	Nocciole essiccate	Italia	*A. flavus*	-	-	-	-
EAF5	Nocciole essiccate	Italia	*A. flavus*	-	-	-	-
EIAF1	Nocciole essiccate	Italia	*A. flavus*	-	-	-	-
EIAF2	Nocciole essiccate	Italia	*A. flavus*	-	-	-	-
EIAF3	Nocciole essiccate	Italia	*A. flavus*	-	-	-	-
EIAF4	Nocciole essiccate	Italia	*A. flavus*	-	-	-	-

PROTEZIONE DELLE COLTURE

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

INCONTRI FITOIATRICI 2019





ISSN 2279-7602 - Anno XII - Marzo 2019

Volume 12

N° 2