

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia Vegetale

Ciclo XXV

Aspergillus flavus: controllo della biosintesi
di aflatossina e strategie di biocompetizione

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Marcello Tomaselli

Tutori:

Chiar.ma Prof.ssa Anna Torelli

Chiar.mo Prof. Francesco M. Restivo

Dottoranda: Francesca Degola

*Il processo di una scoperta scientifica è,
in effetti,
un continuo conflitto di meraviglie.*

Albert E.

Introduzione	1
1. Funghi e micotossine	2
2. <i>Aspergillus flavus</i> : caratteri generali	7
3. Aflatossine	9
3.1 Genetica dell'aflatossinogenesi	11
3.2 Regolazione e significato biologico	14
3.3 Strumenti di prevenzione	16
4. Biocontrollo per il contenimento della contaminazione	19
4.1 Agenti microbici: competitori intraspecifici	20
4.2 Botanicals	21
 Scopo del lavoro	 23
 Materiali e Metodi	 24
1. Terreni e ceppi	
1.1 Terreni di coltura	25
1.2 Sospensioni sporali	27
1.3 Ceppi di <i>A. flavus</i>	27
2. Isolamento dei ceppi naturali	
2.1 Isolamento da cariossidi di mais	28
2.2 Isolamento da farine	28
2.3 Caratterizzazione degli isolati	
2.3.1 Morfologia della colonia	29
2.3.2 Morfologia delle strutture riproduttive	30
2.3.3 Sclerozi	30
2.3.4 Produzione di aflatossina	31
2.3.5 Accrescimento radiale	31
3. Condizioni di coltura	
3.1 Coltura in micropiastre	33
3.2 Crescita su cariossidi per indurre la degenerazione del ceppo.	34

4. Estrazione e amplificazione del DNA	
4.1 Estrazione	34
4.2 Quantificazione del DNA	35
4.3 Amplificazione (PCR)	35
4.4 Randomly Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR)	37
5. Dosaggio delle aflatossine	37
Risultati e Discussione	39
1. Analisi semi-quantitativa dell'accumulo di aflatossina	40
1.1 Validazione della metodica	41
1.2 Definizione della cinetica di accumulo dell'aflatossina	43
1.3 Adattamento della metodica all'analisi in tempo reale	47
1.4 Potenzamento della sensibilità della metodica	50
2. Interferenza nello stato ossidativo della cellula: effetto di composti antiossidanti sulla biosintesi di aflatossina	55
2.1 Effetto di composti puri	57
2.2 Effetto di estratti organici di piante curative	62
2.3 Effetto di estratti naturali commerciali	71
3. Analisi della competizione intraspecifica	75
3.1 Test di competitività in vitro: la selezione dei buoni competitori	76
3.2 Effetto della concentrazione di spore e del rapporto afa ⁺ /afa ⁻ sull'efficienza biocompetitiva	79
3.3 Effetto del tempo di inoculo e cinetica di accumulo in competizione	82

3.4 Prove di ricostruzione su matrice e applicazione in campo	84
3.5 Effetto della degenerazione sulla competizione	92
3.6 Caratterizzazione genetica dei buoni competitori	95
4. Competizione interspecifica	100
4.1 Isolamento e caratterizzazione di nuovi ceppi provenienti dal Madagascar	101
4.2 Test di competitività <i>in vitro</i>	104
4.3 Test di competitività su matrice naturale	105
Conclusioni e Prospettive	108
Bibliografia	112
Sitografia	131
Materiale Supplementare	132

Introduzione

1. FUNGHI E MICOTOSSINE

Al genere *Aspergillus* vengono a tutt'oggi attribuite più di 200 specie saprofitiche, fortemente aerobiche, molte delle quali largamente diffuse come contaminanti ambientali naturali; la maggior parte colonizza materia organica di origine vegetale, spesso a danno di cibi ricchi di amido. Fu catalogato per la prima volta nel 1729 dal sacerdote e biologo italiano Pier Antonio Micheli, che osservando al microscopio le strutture riproduttive di questi funghi le paragonò a degli *aspersori* (dal latino *aspergillum*, “spruzzatore di acqua lustrale”), denominando il genere di conseguenza. Nonostante numerosi Aspergilli risultino patogeni per alcuni tipi di piante e di coltivazioni, e taluni addirittura patogeni per gli animali, non mancano le specie utili per l'uomo. Ad esempio dalla biofermentazione industriale di *A. niger* viene ottenuto quasi il 90% della produzione mondiale di acido citrico; lo stesso *A. niger* è impiegato come produttore di enzimi di interesse enologico (pectinasi), *A. sojae* e di *A. oryzae* rappresentano da secoli gli starter di elezione nella preparazione di salse e bevande orientali tradizionali fermentate come salsa di soia, miso e sakè, *A. fumigatus* viene impiegato per la sintesi di idrossicumarina, e *A. nidulans* è da decenni considerato un organismo modello per studi sia di genetica che di biologia molecolare. *A. oryzae* è anche una sorgente importante di glucoamilasi, alfa-amilasi e proteasi sfruttate nella panificazione per il processamento dell'amido (Bigelis, 1992; Machida *et al.* 2008).

Alcune tra le specie più diffuse accumulano e rilasciano prodotti del metabolismo secondario estremamente dannosi, anche a basse dosi, per l'organismo animale (micotossine): l'azione nociva di queste molecole sulle funzioni cellulari può risultare in effetti nefrotossici (ocratossine), epatotossici (aflatossine), immunotossici e immunosoppressivi (aflatossine, ocratossine), mutageni (aflatossine), teratogeni (ocratossine) e cancerogeni (aflatossine, ocratossine, fumonisine). Sfortunatamente per l'uomo, queste specie sono contaminanti naturali e quasi ubiquitari non solo di numerose coltivazioni cerealicole (mais,

frumento, riso, orzo, segale, ecc.), dei semi oleaginosi (arachidi, girasole, semi di cotone, ecc.), ma anche di altre matrici alimentari come frutta secca, spezie, caffè e uva; inoltre, a causa della loro stabilità chimica, le micotossine sono estremamente resistenti al calore ai trattamenti a cui vengono normalmente sottoposte le derrate durante i processi di preparazione degli alimenti. Di conseguenza possono persistere anche dopo la scomparsa del microorganismo produttore, e contaminare una matrice apparentemente non alterata.

Il reale impatto sanitario ed economico della contaminazione da micotossine fu pienamente compreso solo a partire dal 1960, anno in cui in Inghilterra una partita di farina di arachidi contaminata da aflatossina provocò quello che fu definito Turkey X Disease e uccise numerosi tacchini, anatroccoli, suini e bovini (Blout, 1961); tuttavia, già nel XIX secolo il consumo di segale contaminata da *Claviceps purpurea* era stato correlato alla comparsa di ergotismo, e poco dopo fu descritta una sintomatologia tossica dell'uomo dovuta all'ingestione di pane ottenuto con frumento infestato da *Fusarium graminearum*. E ancora, tra il 1942 e il 1947, diversi villaggi rurali della Russia furono colpiti dalla leucopenia tossica alimentare (Alimentary Toxic Aleukia, ATA) causata dal consumo di frumento e di miglio contaminati da *Fusarium sporotrichioides* e *F. poae*.

Il rischio non si esaurisce alle materie prime, ma si parla anche di contaminazione indiretta, poiché trasferendosi attraverso tutta la filiera produttiva fino ai prodotti lavorati e semilavorati, le micotossine possono essere ad esempio ritrovate come residui o metaboliti tossici nei prodotti alimentari che derivano da animali alimentati con mangimi contaminati, aumentando così il livello di esposizione nell'uomo.

Pur dipendendo dalla quantità di micotossina assunta con gli alimenti, dalla tossicità del composto, dal peso corporeo dell'individuo, dalla compresenza di più micotossine e da fattori dietetici, è noto da tempo che l'esposizione dell'organismo a questi metaboliti fungini può produrre sia nell'uomo che negli animali da reddito un'ampia varietà di quadri patologici sia acuti che cronici, dall'esito molto spesso infausto (Creppy, 1999; Peraica *et al.*, 1999; Hussein and Brasel, 2001; De Vries *et al.*, 2002). Occorre inoltre segnalare che sebbene

l'esposizione alle micotossine sia prevalentemente a carico dell'apparato gastroenterico, è stato dimostrato un certo livello di rischio anche per quanto riguarda la via inalatoria e il contatto diretto con l'epidermide (Peraica *et al.*, 1999).

La loro presenza in molti alimenti costituisce quindi un motivo di crescente preoccupazione per la salute dei consumatori, inducendo numerosi Paesi a imporre misure atte al controllo: per quanto riguarda l'Italia, il quadro normativo dell'UE tutela i consumatori fissando i livelli massimi di micotossine in alimenti e mangimi per garantire che non siano nocivi per la salute umana o degli animali, spingendo così per mantenere i tenori di micotossine al livello più basso ragionevolmente conseguibile soprattutto seguendo le buone pratiche raccomandate in materia di agricoltura, stoccaggio e lavorazione. I tenori massimi di micotossine e di altri contaminanti negli alimenti sono stabiliti nel regolamento (CE) n. 1831/2003 e successive modifiche [1], mentre le disposizioni relative ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine sono state introdotte con il regolamento (CE) n. 1831/2003 [2]. Inoltre, la direttiva 2002/32/CE stabilisce inoltre i livelli massimi di contaminanti, comprese le micotossine, consentiti nei mangimi [3]. Le direttive comunitarie più dettagliate riguardanti i limiti fissati sia per diverse matrici che per le diverse destinazioni d'uso sono promosse dall'Istituto Superiore di Sanità [4].

La normativa risulta molto complessa e in continua evoluzione, e si riferisce sia ai prodotti alimentari sia ai prodotti destinati all'alimentazione animale; poichè si suddivide secondo il livello di applicazione (Unione Europea, Italia, per gli alimenti non compresi nella legislazione europea, Stati Uniti e normativa a livello mondiale), sussistono diverse discrepanze tra le legislazioni delle diverse nazioni, che causano non trascurabili complicazioni nel commercio internazionale. A pagarne il prezzo più alto sono soprattutto i Paesi in via di sviluppo, per i quali il blocco delle importazioni di alcuni prodotti agricoli da parte dei Paesi consumatori dei medesimi può portare a pesanti ripercussioni economiche. Nell'approvare gli sforzi per armonizzare le varie legislazioni vigenti, le agenzie

internazionali competenti come FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) e WHO (World Health Organization) sottolineano però come nei paesi in via di sviluppo sia molto più grave il danno causato dalla denutrizione che non l'incidenza delle patologie conseguenti all'esposizione della popolazione alle micotossine, mettendo in discussione l'imposizione in queste aree di limiti che comporterebbero la riduzione di risorse alimentari già esigue ("Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003") [5].

Un aspetto purtroppo poco approfondito riguarda gli effetti letali derivanti dalle micotossicosi che interessano gli animali da compagnia (Puschner, 2002), nonostante esista un'ampia letteratura che dimostra come il *pet food* risulti molto spesso contaminato da aflatossine, ocratossina, tricoteceni e altre micotossine (Boermans and Leung, 2007); se anoressia, depressione e insufficienza renale sono i sintomi evidenti di tossicosi provocate da livelli di contaminazione tanto alti quanto poco frequenti, gli effetti cronici epatotossici e carcinogenici dovuti all'esposizione a concentrazioni più contenute risultano molto più difficili da individuare e, proprio per questo motivo, nella maggior parte dei casi si risolvono con la morte dell'animale (Leung *et al.*, 2006). L'industria del *pet food* si trova dunque a doversi confrontare con il problema della contaminazione da micotossine alla stregua dei mangimifici che operano nella produzione di alimenti per le specie da reddito. In particolare, i punti critici riguardano: i) l'utilizzo di materie prime e dei loro sottoprodotti contaminati, poiché spesso i sottoprodotti della lavorazione dei cereali (crusca, buccette, farinaccio, cruschello, germe, glutine, pula, farinette, etc.) sono soggetti ad un livello di contaminazione molto più alto del cereale grezzo; ii) le condizioni di stoccaggio, in quanto i principali fattori ambientali associati alla produzione di micotossine sono le temperature medio-alte e il tenore elevato di umidità delle derrate e quindi di acqua libera; iii) la corretta valutazione della contaminazione, perchè la distribuzione non uniforme delle infezioni fungine rende necessari campionamenti il più possibile rappresentativi delle materie prime e/o dei prodotti stoccati; iv) la presenza di "micotossine nascoste", cioè di tossine

coniugate ad altre molecole che non vengono rilevate dalle normali metodiche analitiche (Berthiller *et al.*, 2012).

La contaminazione da micotossine nelle derrate alimentari rappresenta insomma un problema di vastissime proporzioni che, lontano dall'essere scongiurato, richiede sforzi congiunti non solo da parte di tutti gli operatori del settore, ma anche da parte degli organi di legislazione e controllo: la FAO ha infatti stimato che il 25% delle derrate alimentari in tutto il mondo sia affetto da contaminazione, e che il numero delle micotossine conosciute e quello delle derrate note per essere passibili di contaminazione sia in continuo aumento (Kabak *et al.*, 2006).

2. ASPERGILLUS FLAVUS: CARATTERI GENERALI

Il maggior produttore di aflatossine è il fungo filamentoso *Aspergillus flavus*. Come per altri Aspergilli, la sua presenza nell'ambiente è praticamente ubiquitaria: contaminante naturale delle coltivazioni di mais, arachidi e cotone, rappresenta dallo 0.2 all'8% della popolazione microbica *culturable* del suolo; comunemente infeudato in zone temperate comprese tra i 16° e i 35° di latitudine, è piuttosto raro oltre i 45° (Klich, 2007).

In condizioni di umidità e temperatura favorevoli (l'optimum di crescita è 28-37°C, il che lo rende patogeno per l'uomo, ma il range permissivo si estende dai 12 ai 48°C), i conidi germinano originando un micelio in grado, in poco tempo, di maturare e di disperdere numerose spore che a loro volta colonizzeranno i substrati adeguati nell'ambiente circostante (spighe di mais, etc.). Nel caso del mais *A. flavus* colonizza le setole e le cariossidi; lo stadio più critico per l'attacco del patogeno è il passaggio dalla fase lattea a quella cerosa-precoce della maturazione della spiga (Zuber and Lillehoj, 1979). L'estensione dell'infezione sui tessuti vegetali è determinata dalle condizioni degli stessi: piante sane sono meno esposte all'attacco del fungo, mentre in situazioni di stress termico e deficit idrico le strutture riproduttive della pianta sono più suscettibili all'infezione; ma non sono solo questi fattori ad influenzare la diffusione del fungo in una coltura: ad esempio, lacerazioni dello scutello del seme dovute all'azione di uccelli e insetti come *Elasmopalpus lingosellus* e *Sitophilus zeamais* sono state associate a picchi di infezione (LaPrade and Manwiller, 1977). Il suolo sembra essere il serbatoio che permette al fungo di svernare in forma quiescente (come spora o sclerozi) fino al sopraggiungere della stagione vegetativa più adatta per la germinazione e per una nuova colonizzazione; le forme di quiescenza possono restare vitali nel terreno per oltre tre anni (Wicklow *et al.*, 1993).

Conosciuta fin dal 1809, è stata fino a poco tempo fa considerata una specie a riproduzione esclusivamente asessuale, in grado di riprodursi solo

vegetativamente attraverso la generazione di spore asessuate (conidi). In determinate condizioni di crescita, tuttavia, *A. flavus* forma *sclerozi*, strutture riproduttive molto simili a corpi fruttiferi sessuali detti *cleistotecie*; sulla base del diametro i ceppi si dividono in due morfotipi: ceppi di classe L (diametro medio sclerozi $> 400\mu\text{m}$) e ceppi di classe S (diametro medio sclerozi $< 400\mu\text{m}$), che riproduttivamente sembrano essersi separati l'uno dall'altro da più di 1 milione anni (Ehrlich *et al.*, 2005). Studi filogenetici hanno permesso di raggruppare i ceppi di *A. flavus* nei due sottogruppi I e II (Geiser *et al.*, 1998; Tran-Dinh *et al.*, 1999); Geiser *et al.* (2001) sono stati in grado di dimostrare che mentre tra i ceppi appartenenti al gruppo I sono rappresentati sia isolati S che L, nel gruppo II sono presenti solo individui S.

Preceduta dall'identificazione dei geni di mating *MAT1-1* e *MAT1-2* sia in *A. flavus* che nella specie anch'essa aflatossigenica e a lui strettamente correlata *A. parasiticus* (Ramirez-Prado *et al.*, 2008), è stata recentemente dimostrata l'esistenza di uno stadio sessuale per entrambe, individuato rispettivamente in *Petromyces flavus* (Horn *et al.*, 2009) e in *Petromyces parasiticus* (Horn *et al.*, 2009). Generalmente lo scambio di materiale genetico tra i funghi filamentosi asessuati è limitato da un sistema di compatibilità vegetativa, e avviene attraverso fusione delle ife in eterocarionti stabili (Leslie, 1993); la formazione di un network di micelio funzionale si verifica solo tra individui appartenenti allo stesso gruppo di compatibilità vegetativa (VCG). All'interno delle popolazioni di *A. flavus* diversi VCG costituiscono numerose subpopolazioni, i cui appartenenti sono caratterizzati da variazioni genetiche e morfologiche più o meno evidenti (Horn, 2007); anche la diversa efficienza nell'accumulare metaboliti secondari, nell'infettare le piante e nel degradare la materia organica potrebbe riflettere le differenze tra i VCG (Ehrlich *et al.*, 2007).

3. AFLATOSSINE

I composti identificati col nome “aflatossina” sono 14, tra cui le meno frequenti sono AFB_{2a}, AFG_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFP₁, AFQ₁ e AFR₀, mentre le principali sono AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂: naturalmente prodotte dal metabolismo secondario di alcuni Aspergilli quali *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. bombycis*, recentemente si è dimostrato che sono prodotte anche da specie come *A. arachidicola*, *A. minisclerotigenes*, *A. pseudocaelatus* e *A. pseudonomius* (Varga *et al.*, 2011). AFB₁, considerata il membro principale della famiglia in quanto più diffusa e maggiormente prodotta, è stata classificata dall’International Agency for Research on Cancer (IARC 1993) come la sostanza cancerogena naturale più potente finora individuata. Il termine “aflatossina” si riferisce all’organismo individuato per la prima volta come produttore (**A-*spergillus* FLA-*vus* TOSSINA**), e l’acronimo comprende un’informazione non solo etimologica ma che chimico-fisica: B si riferisce infatti alla fluorescenza blu emessa dalla molecola quando esposta ad una sorgente di luce ultravioletta della lunghezza d’onda specifica $\lambda = 365\text{nm}$, mentre G indica l’emissione di una fluorescenza verde (*green*) nelle stesse condizioni. Così come B₂ è il derivato idrossilato di B₁, G₂ altro non è che il derivato idrossilato di G₁. La forma reattiva di AFB₁ è l’eossido che si forma per intervento del citocromo P450; questo è in grado di legare l’N₇ della guanina formando un complesso AFB₁-DNA che, a livello della sequenza del gene oncosoppressore *p53*, provoca una trasversione G:C – T:A a carico della terza base del codone 249^{Arg}, che diventa 249^{Ser}. Poiché il residuo 249 si localizza nel loop L3 di P53, dove partecipa alla stabilizzazione del loop attraverso interazioni con i residui adiacenti, lo switch Arg-Ser imprime una maggior flessibilità alla struttura, e compromette sia la dimerizzazione dell’oncosoppressore che il suo legame con il DNA bersaglio (Joerger and Fersht, 2007). Questa mutazione è considerata una sorta di “firma” dell’esposizione ad aflatossina, ed è stata riscontrata nel 75% dei casi di carcinoma epatocellulare diagnosticati in Paesi in via di sviluppo (Cina e Corno d’Africa), mentre è stata individuata in meno del 3% dei casi accertati nei Paesi industrializzati (Gouas *et al.*, 2009).

Le aflatossine M_1 e M_2 (*Milk-toxins*) rivestono un'importanza paragonabile a quella di AFB e AFG non solo perchè sono il principale metabolita animale rispettivamente di AFB₁ e AFB₂, ma soprattutto perché si trovano con frequenza nel latte vaccino e in un'ampia gamma di semilavorati e prodotti finiti. Derivati epossidici prodotti dal metabolismo epatico e renale dei mammiferi ruminanti, vengono in parte escreti per via mammaria nel latte ed in parte accumulati nel muscolo. E' stato stimato che il tasso di trasferimento dall'alimento (B_1) al latte (M_1) è di 55:1 (Frobish *et al.*, 1986). Purtroppo, questo è un problema che non riguarda solo la filiera lattiero-casearia o che si limita a minacciare la redditività degli allevamenti da carne: vengono infatti sempre più spesso riportati casi di presenza di aflatossina M_1 nel latte materno umano, soprattutto in quelle zone geografiche nelle quali, per condizioni sociali o climatiche, la popolazione è molto più esposta alle micotossine attraverso l'ingestione di cibi contaminati (Polychronaki *et al.*, 2006; Ghiasian and Maghsood, 2012; Oluwafemi, 2012).

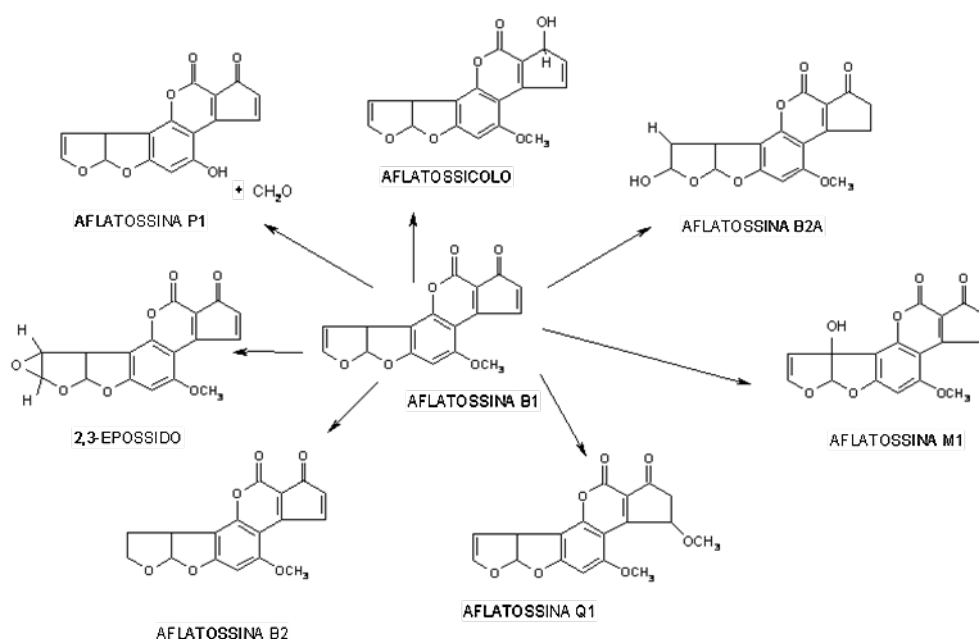


Fig. 1: Struttura chimica dell'aflatossina B₁ e di alcuni derivati.

3.1 Genetica dell'aflatossinogenesi

Dal punto di vista chimico le aflatossine sono derivati difuranocumarinici del poliketide, e il risultato finale di un pathway biosintetico che coinvolge più di 17 enzimi i cui geni, organizzati in un cluster di 70kb (fig. 2) contenente 25 ORFs (GeneBank Accession number AY371490), si trovano sul cromosoma III (Bhatnagar *et al.*, 2006). L'espressione del pathway biosintetico è regolata dal prodotto genico del gene *aflR*, un fattore di trascrizione $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ che riconosce la sequenza consenso 5'-TCGN₅CGR-3' localizzata nella regione promotrice di diversi geni strutturali del cluster (Woloshuk *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1998); un secondo livello di controllo trascrizionale è affidato al prodotto genico di *aflS*, che è stato dimostrato esercitare un ruolo regolativo sui geni strutturali attraverso la modulazione dell'espressione di *aflR* stesso (Chang, 2004; Du *et al.*, 2007).

Esiste un certo grado di conservazione del cluster aflatossinico tra molte delle specie afferenti al genere *Aspergillus* sia all'interno che all'esterno della sezione *Flavi*, a cui *A. flavus* e *A. parasiticus* appartengono, come *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. zhaoqingensis*, *A. bombycis* ed *Emericella astellata*; questo, unitamente all'individuazione in altri generi fungini di geni biosintetici caratteristici dell'aflatossina e della sterigmatocistina, suggerisce che questi metaboliti assicurino un qualche vantaggio adattativo, anche se probabilmente solo in alcune condizioni ambientali (Cary and Ehrlich, 2006). Si ritiene che la modulazione dell'espressione dovuta a variazioni nella sequenza codificante di *aflR*, nei promotori di entrambi i geni regolatori e in alcuni siti di binding localizzati nella regione intergenica *aflR/aflS* possa influire sulla differenza di risposta agli stimoli ambientali e nutrizionali del metabolismo aflatossinico nei diversi funghi produttori (Ehrlich *et al.*, 2003).

Nonostante *A. oryzae* e *A. sojae*, come riportato sopra, condividano buona parte del cluster con specie aflatossigene, essi sono tuttavia incapaci di portare a termine la biosintesi della tossina. Numerose mutazioni, delezioni più o meno estese e riarrangiamenti nella sequenza impediscono l'espressione dei geni

implicati nel pathway (Watson *et al.*, 1999; Kusumoto *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006); in entrambe le specie la delezione del gene regolatore *aflR* si incontra con una certa frequenza, così come difetti nell'attività del gene co-regolatore *aflS*, ma sono molteplici i fattori genetici responsabili della loro atossigenicità (Chang and Ehrlich, 2010). In questo senso anche eventi di dimensione limitata come SNPs (Small Nucleotide Polymorphisms) possono avere un'ampia portata: ad esempio, una mutazione non senso che determina una preterminazione del tradotto di *aflR* è stata dimostrata essere causa nell'atossigenicità di *A. sojae* (Matsushima *et al.*, 2001). Una delezione che interferisce solo parzialmente con l'accumulo di aflatossina è quella responsabile dell'incapacità di produrre aflatossina G da parte di *A. flavus*, in cui la mancanza della regione intergenica compresa tra i geni *aflF* e *aflU*, che contiene le regioni promotrici e la sequenza bersaglio dell'attivatore trascrizionale *aflR*, compromette irrimediabilmente la possibilità di compiere l'ultimo step biosintetico; infatti mentre i due prodotti genici non sembrano essere determinanti per la formazione di AFB, la mancanza della monossigenasi codificata da *aflU* non permette la conversione dei due intermedi nei prodotti finali AFG₁ e AFG₂ (Ehrlich *et al.* 2004). Alterazioni del cluster sono causa della perdita di aflatossigenicità anche all'interno delle stesse specie produttrici: nel caso specifico di *A. flavus*, uno screening effettuato su granaglie, mangimi e altre matrici alimentari provenienti dall'Italia ha dimostrato che oltre il 60% dei ceppi non aflatossigenici isolati contiene delezioni nel cluster aflatossinico (Criseo *et al.*, 2001; Degola *et al.*, 2007).

L'aflatossigenicità non è una caratteristica irreversibilmente predeterminata geneticamente: è infatti noto che il mantenimento e la propagazione degli isolati in terreni di coltura sintetici provoca, dopo un tempo variabile, la perdita di alcune caratteristiche morfologiche, fisiologiche e metaboliche (sporulazione, capacità proliferativa del micelio aereo, produzione di sclerozi); il metabolismo secondario non fa eccezione: è stato ampiamente dimostrato che ceppi di *A. flavus* produttori di aflatossina perdono la capacità di accumulare la tossina dopo un numero di generazioni che varia dal substrato, dalle condizioni di coltura (pH, attività dell'acqua, temperatura, disponibilità di nutrienti) e, soprattutto,

dal ceppo stesso. Evidenze ottenute attraverso l'analisi delle spore singole indicano che la popolazione di conidi ottenuta dalle colture “degenerate” è in realtà una miscela di individui wild-type e varianti basso-produttrici o non produttrici di aflatossina (Horn and Dorner, 2002). L'osservazione che in condizioni di laboratorio avviene una selezione a favore degli individui atossigenici mentre la pressione selettiva a cui sono sottoposte le popolazioni di *A. flavus* in natura favorisce invece gli individui la cui capacità di accumulare aflatossina non viene alterata, supporta l'importanza del ruolo che questo metabolita ricopre nella biologia e nell'ecologia del fungo.

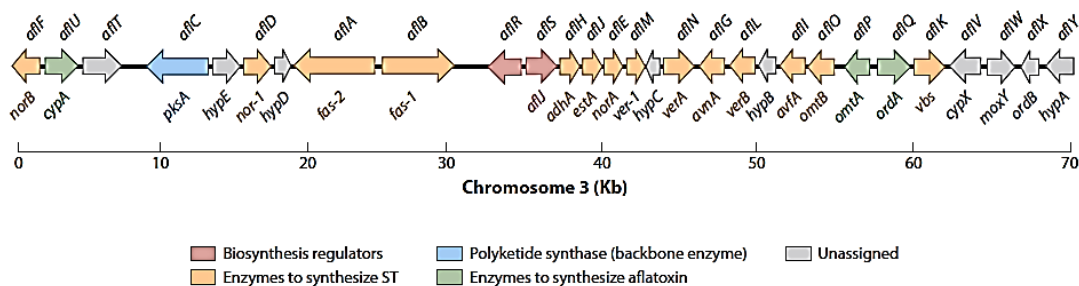


Fig. 2: Cluster aflatossinico di *Aspergillus flavus*. I prodotti genici di *aflA*, *aflB*, (fatty acid synthase), e *aflC* (polyketide synthase) sono necessari per la sintesi del primo precursore stabile dell'aflatossina, l'acido norsolorinico (NOR). NOR viene successivamente convertito in sterigmatocistina (in giallo i geni coinvolti) e poi in aflatossina (in verde). In seguito al completamento del sequenziamento del genoma di *A. flavus*, i geni del cluster sono stati ribattezzati: i nomi nuovi sono riportati sopra lo schema, i vecchi sono stati posizionati al di sotto di esso. Geni per i quali non è stata ancora individuata una funzione sono stati evidenziati in grigio.

Da: Amaike and Keller, 2011

3.2 Regolazione e significato biologico

L'accumulo di prodotti del metabolismo secondario è comunemente associato ai processi di sporulazione del microrganismo; così come altri prodotti tossici le micotossine sono secrete dal fungo durante la crescita all'approssimarsi della fase di produzione dei conidi, nel caso delle aflatossine, anche durante la formazione degli sclerozi. Fattori che interferiscono con la crescita e/o la sporificazione di *A. flavus* quali temperatura, attività dell'acqua e disponibilità di un'interfaccia aria-superficie possono influenzare la produzione di aflatossina. (Calvo *et al.*, 2002). L'effetto del pH è tuttora contraddittorio, poichè nonostante sia stato dimostrato che a pH = 4 la produzione di aflatossina è massima, esso comunque dipende dalla composizione del terreno di coltura (Cotty, 1988a). A seconda della combinazione di questi parametri la biosintesi della tossina può essere più o meno inibita o stimolata (Giorni *et al.* 2009; Schmidt-Heydt *et al.* 2009). L'effetto dei nutrienti è stato ampiamente discusso: contrariamente a zuccheri complessi (galattosio, mannitolo, lattosio), peptone e zuccheri semplici come saccarosio, glucosio, fruttosio, e sorbitolo agiscono come regolatori positivi della biosintesi di aflatossina; la presenza di nitrato come unica fonte di azoto produce il medesimo risultato (Calvo *et al.*, 2002).

Alcuni metaboliti secondari vengono sintetizzati dai funghi durante determinati stadi di sviluppo in cui i livelli di ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) incrementano in modo significativo. In natura le cellule possono essere interessate da stress ossidativo in seguito alla produzione/esposizione di ROS, come ad esempio l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale idrossile ($OH^\bullet$) e i perossidi organici; queste molecole possono essere generate sia come by-products della respirazione dal sistema di trasporto degli elettroni che da varie attività metaboliche, inclusa la risposta di un organismo ospite ad un organismo infestante (Moye-Rowley, 2003). Recenti studi puntano ad un ruolo importante dello stato ossidativo della cellula nella regolazione della biosintesi di aflatossina: osservando non solo il pathway biosintetico ma anche gli eventi metabolici ad esso correlati, si individua una serie di step ossidativi che

portano alla formazione dell'anello diidrobisfuranico a monte della sintesi di AFB₁ e AFB₂. Inoltre, la presenza di geni correlati a trasformazioni ossidative strutturali (quattro citocromo-P₄₅₀ monoossigenasi, perossidasi e FAD-monoossigenasi) in prossimità del cluster aflatossinico (Kim *et al.*, 2005) suggerisce l'importanza delle conversioni ossidative nella sintesi di aflatossina. Addirittura sembra che lo stress ossidativo sia un prerequisito essenziale per la produzione della tossina (Jayashree and Subramanyam, 2000; Narasaiah *et al.*, 2006). La relazione tra stress ossidativo e sintesi di AF è stata rafforzata dall'individuazione, in *A. parasiticus*, del fattore di trascrizione ApyapA, che risponde allo sbilanciamento dell'equilibrio ox/redox della cellula attivando, tramite il controllo dell'espressione, una serie di enzimi deputati allo *scavenging* dell'eccesso di specie ossidanti nel citoplasma (Reverberi *et al.*, 2008; Roze *et al.*, 2011).

Le strutture che più intervengono nei processi di bilanciamento ossidoriduttivo cellulare sono probabilmente i perossisomi, che proprio in virtù della loro attività sono implicati a diverse vie di trasduzione del segnale correlate alla risposta della cellula allo stress ossidativo; condizioni analoghe di stress possono verificarsi durante la colonizzazione di materiale organico da parte di *A. flavus*: substrati ricchi di acidi grassi (arachidi, noci, mais, semi di cotone) infatti rilasciano perossidi organici in seguito alla digestione da parte del fungo, i quali possono rappresentare un input ossidativo per il patogeno stesso. Sebbene non sia ancora chiara la catena di eventi che lega la proliferazione dei perossisomi all'incremento di accumulo di aflatossina, è ormai dimostrato il loro ruolo nel generare le oxilipine necessarie alla progressione della sintesi della tossina (Reverberi *et al.*, 2012). Queste e altre evidenze portano a considerare l'aflatossina una sorta di "molecola di difesa" sintetizzata da *A. flavus* per far fronte ad un eccesso di ROS nella fase tardiva della crescita.

Anche se non è ancora ben chiaro in che modo lo stato ossidativo dell'organismo agisca sulla biosintesi di aflatossina, è stato comunque osservato che diverse sostanze con proprietà antiossidanti (come ascorbato, BHT, eugenolo, etilene e metil-jasmonato) sono in grado di esercitare un'azione di

inibizione/contenimento su di essa (Jayashree and Subramanyam, 1999; Passone *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009; Meimaroglou *et al.*, 2009). L'effetto inibitorio degli antiossidanti sembra esercitarsi attraverso la sollecitazione dell'attività enzimatica di SOD, CAT e GPX, abbattendo l'accumulo di aflatossina attraverso la down-regolazione dell'espressione dei geni del cluster aflatossinico (Reverberi *et al.*, 2005).

3.3 Strumenti di prevenzione

L'uso dei metodi chimici e fisici disponibili per la detossificazione dei prodotti agricoli contaminati è molto limitato non solo per i problemi di sicurezza correlati alle procedure, ma anche a causa delle alterazioni nelle proprietà nutrizionali e organolettiche che le materie prime subiscono in seguito ai trattamenti, dell'efficacia limitata e dei costi. Questo, contestualmente alla necessità di mantenere il livello dei contaminanti al di sotto dei limiti previsti dalla normativa, ha portato le associazioni di coltivatori, gli organi di sorveglianza e in generale tutti gli operatori del settore alla stesura di diversi disciplinari di autoregolamentazione volti a prevenire la contaminazione a monte, ossia una serie di accortezze nella gestione delle coltivazioni che limitano il più possibile l'attacco e lo sviluppo di *A. flavus* sulla matrice. L'infezione del fungo produttore si può sviluppare sia sulle piante prima del raccolto (contaminazione da campo) che nelle derrate dopo il raccolto stesso, durante i processi di conservazione, trasformazione e trasporto: quelle che vengono definite "buone pratiche agricole" possono contribuire a limitare l'infezione (e quindi la contaminazione) direttamente in campo (Dorner, 2004).

Poiché *A. flavus* infesta saprofitariamente non solo le cariossidi ma anche residui colturali (tutoli, frammenti di stocco, tessuti fogliari) di mais e di altre piante, l'interramento di questo materiale attraverso la lavorazione del terreno e l'avvicendamento colturale può limitare la dispersione dei conidi e, di conseguenza, la diffusione del patogeno. In questo senso i risultati migliori si

ottengono prolungando nella successione l'intervallo di semina delle varietà suscettibili a più di due anni. Anche i fattori che provocano lesioni della superficie della granella (grandine, attacchi di insetti, raccolta meccanizzata, etc.) aumentano il rischio di infezione; ad esempio le larve della piralide (*Ostrinia nubilalis*) o di altri lepidotteri possono trasportare i conidi dalla superficie fogliare alle gallerie scavate nella spiga. Per questo motivo i trattamenti antifitofagi diventano fondamentali per la prevenzione della contaminazione da aflatossine. La scelta del periodo di intervento è critica, e i trattamenti vanno effettuati in corrispondenza della seconda generazione del fitofago facendo riferimento ai Bollettini provinciali. Tuttavia, diverse ricerche hanno dimostrato che l'impiego di insetticidi necessario per ridurre la contaminazione da aflatossina a livelli accettabili non è economicamente vantaggiosa, oltre che ecologicamente insostenibile. In questo senso l'approccio più efficace sembra invece essere l'uso di ibridi resistenti all'attacco degli insetti; è stato più volte documentato un significativo contenimento dell'aflatossina in colture di BT-mais, l'ormai famoso ibrido trasformato con un gene di *Bacillus thuringensis*, anche se questo si verifica solo in determinate condizioni. D'altra parte la commercializzazione di linee geneticamente modificate non è consentita in diversi Paesi, soprattutto per la delicata problematica derivante dal principio di precauzione sull'effetto che il consumo di organismi geneticamente modificati potrebbe avere sulla salute umana.

Uno degli strumenti agronomici più importanti per il controllo delle infezioni in campo è l'irrigazione, infatti una condizione ad alto rischio è la presenza di stress idrico successivo alla maturazione cerosa della granella. Gli interventi irrigui vanno effettuati in maniera corretta non solo nel periodo immediatamente antecedente la fioritura maschile, ma anche nella fase più avanzata della coltura qualora le condizioni di umidità del terreno siano insufficienti ad assecondare la richiesta idrica della pianta.

L'ultima barriera che il fungo deve superare è la resistenza innata della pianta. Fin dagli anni '70 sono stati portati avanti numerosi studi mirati all'individuazione dei caratteri genetici responsabili, nei genotipi resistenti, sia

della bassa efficienza di colonizzazione da parte di *A. flavus* che dell'inibizione dell'accumulo di aflatossina (Chen *et al.*, 2001).

Una sensibile riduzione del rischio di contaminazione può essere ottenuta al momento del raccolto, evitando la trebbiatura di colture in cui la granella possiede un'umidità non inferiore al 22%. Un esempio recente: la siccità e le alte temperature registrate durante la campagna maidicola del 2012, condizioni climatiche che hanno favorito una pesantissima contaminazione delle colture cerealicole da parte di *A. flavus*, hanno determinato un'impennata dei livelli di aflatossina delle derrate agricole tale da provocare alla sola regione Veneto un danno stimato intorno ai 200 milioni di euro (fonte: ConfAgricoltura). E' proprio a causa delle lesioni e dell'umidità del seme che la fase di stoccaggio è una fase critica per l'attacco da parte di *A. flavus*, e, di conseguenza, per la contaminazione da aflatossina; per questa ragione le procedure raccomandate nei disciplinari consigliano di essiccare il prima possibile dopo la raccolta, evitando lunghe soste delle partite di granaglie sui piazzali delle strutture di conferimento. L'essiccazione non dev'essere però condotta a temperature troppo elevate, soprattutto quando la granella non è molto umida, per evitare le microlesioni durante il fenomeno del "rinvenimento".

4. BIOCONTROLLO PER IL CONTENIMENTO DELLA CONTAMINAZIONE

Nonostante l'applicazione delle corrette pratiche agricole possa efficacemente ridurre l'entità delle perdite economiche legate alla contaminazione da micotossine, in molti casi si preferisce accompagnarle da (se non sostituirle con) trattamenti chimici antifungini in grado di azzerare la popolazione microbica residente sulle colture. L'acquisizione della consapevolezza che l'uso diffuso e prolungato di pesticidi ha portato non solo allo sviluppo di resistenza verso il prodotto da parte degli organismi bersaglio ma anche a fenomeni di amplificazione dell'effetto del pesticida stesso, l'insorgenza di problematiche relative alla contaminazione sempre più pesante di acqua, suolo e prodotti agricoli sia primari che derivati da parte di residui dannosi, e l'effetto non calcolato che questi prodotti hanno avuto su specie diverse da quella di interesse (Abudulai *et al.*, 2001) hanno portato negli anni ad una politica sempre più restrittiva nei confronti della loro commercializzazione. In questo panorama, anche grazie alle nuove biotecnologie disponibili e sempre più accessibili, si è aperta negli anni la strada più eco-sostenibile dei biopesticidi. Secondo la definizione della US Environmental Protection Agency Pesticides (2008), sono "biopesticidi tutti quei pesticidi derivati da materiale biologico come batteri, piante e animali, e in alcuni casi anche da determinati minerali". Sulla base della risorsa biologica da cui provengono i biopesticidi si possono classificare in biopesticidi microbici, botanicals, zoopesticidi e piante geneticamente modificate; generalmente impiegati per controllare piuttosto che eliminare i microrganismi e gli insetti nocivi, molti di essi possiedono sia una selettività maggiore nei confronti del bersaglio che una tossicità nulla verso le specie non-target rispetto ai corrispettivi chimici.

Il mercato dei biopesticidi ha subito negli ultimi anni una notevole accelerazione: se negli Stati Uniti alla fine del 1996 erano solo 16 i prodotti registrati, alla fine del 2003 il loro numero è aumentato a 1090, per un volume d'affari pari a 2,2 miliardi di dollari. Nel 2008 il totale delle registrazioni in Cina ammontava a

327 prodotti, corrispondenti all'1,6% del totale dei biopesticidi disponibili nel mondo; sempre nel 2008, in India risultavano registrati solo 12 biopesticidi, ma nel 2007 il giro d'affari in Giappone sfiorava i 9 milioni di dollari l'anno (Leng *et al.*, 2011).

4.1 Agenti microbici: competitori intraspecifici

Come per altre micotossine la lotta biologica con antagonisti microbici, singolarmente o come parte di una più vasta strategia di controllo integrato, si è presentato come un approccio promettente per il controllo delle aflatossine sia in campo che nelle fasi di post-raccolta. Tra le molte strategie possibili sono stati descritti metodi biologici che sfruttano batteri, lieviti o funghi come competitori in grado di interferire con la crescita di *A. flavus* (e *A. parasiticus*) e/o con la biosintesi della tossina. Su questo tema è disponibile una letteratura molto ampia (Dorner, 2004; Yin *et al.*, 2008). In particolare, l'uso di ceppi atossigenici (afla-) di *A. flavus* ha dimostrato un successo talmente notevole nel ridurre la contaminazione da aflatossina in mais e semi di cotone (Cotty, 1994) che uno di questi isolati (AF36) è stato registrato negli Stati Uniti come biopesticida, e lì attualmente impiegato come biocompetitore nel contenimento della contaminazione da aflatossina (Dorner, 2004). Altri ceppi fanno parte di formulazioni commerciali adibite allo stesso uso e utilizzate in Paesi diversi (Aflasafe® in Nigeria; [6]) o su colture diverse (Pitt and Hocking, 2006; Yin *et al.*, 2008; Tsitsigiannis *et al.*, 2010). L'efficienza competitiva in campo di un biopesticida di questo genere è tuttavia influenzata da numerosi fattori ambientali ed ecologici (Cotty and Mellon, 2006); inoltre il successo della loro commercializzazione dipende in gran parte dalla capacità di controllare costantemente la popolazione tossigenica delle zone di applicazione, mantenendo i livelli di aflatossina al di sotto dei limiti legislativi.

I meccanismi con cui alcuni ceppi afla- interferiscono con l'accumulo di aflatossina da parte dei ceppi produttori (afla+) non è stato ancora

definitivamente stabilito. L'opinione prevalente è che questo dipenda dall'esclusione competitiva che il ceppo negativo è in grado di imprimere al ceppo tossigenico, come risultato di una occupazione fisica del substrato e di una competizione per i nutrienti. Tuttavia sono diverse le ipotesi che possono essere prese in considerazione (Mehl and Cotty, 2010); tra queste, quella (ancora controversa) che prevede l'esistenza di uno o più "fattori diffusibili" rilasciati dal biocompetitore e in grado di influenzare alcuni processi a monte della sintesi di tossina apre uno scenario completamente nuovo, che implica un livello di comprensione del metaboloma di *A. flavus* ancora solo parzialmente raggiunto (Cotty and Bayman, 1993; Horn *et al.*, 2000). La variabilità nella capacità dei ceppi di *afla* di prevenire la contaminazione da aflatossine potrebbe sottolineare l'esistenza di diversi meccanismi che possono o non possono agire sinergicamente (Cotty and Bhatnagar, 1994).

4.2 Botanicals

Alla base della formulazione dei biopesticidi di origine vegetale si trovano generalmente principi attivi derivanti dal metabolismo secondario come flavonoidi, alcaloidi, oli essenziali (EOs); noti per le loro proprietà battericide, antinfiammatorie e aromatiche, molti di essi si sono rivelati estremamente efficaci nell'inibire lo sviluppo di funghi patogeni e l'accumulo di micotossine (Alpsoy, 2010; Sharma and Sharma 2012). Ad esempio, effetti inibitori sulla biosintesi di aflatossina e sulla crescita di *A. flavus* e *A. parasiticus* sono stati riportati per estratti fogliari di *Azadirachta indica* (Bhatnagar *et al.*, 1990), *Syzigium aromaticum* (Reddy *et al.*, 2009) e *Mentha viridis* (Gibriel *et al.*, 2011), ma la letteratura in proposito è assai ampia (Reddy *et al.*, 2010; Thanaboripat, 2011). L'efficacia antifungina degli EOs è influenzata da interazioni ambientali complesse, ma non solo: la natura chimica dei componenti degli oli stessi, cioè il basso peso molecolare combinato con pronunciate tendenze lipofile, consente loro di penetrare la membrana cellulare più rapidamente rispetto ad altre

sostanze. Tuttavia l'attività antimicrobica sembra essere svolta da componenti minori, che probabilmente agiscono in sinergia (Burt, 2004).

Alcuni tra i vantaggi nell'utilizzare composti di origine vegetale come agenti di biocontrollo sono sicuramente una maggior efficacia e una maggior sicurezza rispetto alla maggior parte dei composti di sintesi, ma soprattutto una maggior accettazione da parte del consumatore. Diversi studi si sono concentrati sul potenziale utilizzo di EO e droghe vegetali in genere nel contenimento di funghi micotossigenici, soprattutto come strategia di biocontrollo sulle derrate immagazzinate. Tuttavia, l'applicazione appropriata dei botanicals deve ancora essere approfondita; nonostante lo sfruttamento di estratti naturali possa risultare un promettente metodo di conservazione nelle zone rurali dei Paesi in via di sviluppo in cui l'accesso alle moderne strutture di stoccaggio delle scorte alimentari agricole è particolarmente difficile, occorre confrontarsi non solo con la messa a punto di efficienti sistemi di dispersione del prodotto, ma anche con le problematiche legate alla natura chimico-fisica dei botanicals stessi: sensibilità alla luce, scarsa resistenza alle alte temperature, estrema volatilità ed eventuale tossicità verso l'uomo rendono la caccia all'estratto naturale migliore per questo scopo ancora aperta.

SCOPO DEL LAVORO

La prima parte del progetto si pone come obiettivi principali l'analisi della competizione intraspecifica, con particolare attenzione all'effetto sulla biosintesi dell'aflatossina, e l'individuazione e la caratterizzazione di un ceppo di *A. flavus* efficace nel contenere la contaminazione da aflatossina sulle coltivazioni di mais della Pianura Padana. Attraverso la messa a punto di una metodica basata sull'uso di piastre multipozzetto e di un lettore di fluorescenza ci si propone di effettuare non solo uno screening di massa sulla popolazione residente sulle coltivazioni di mais della valle del Po, ma anche di analizzare *in vitro* l'effetto sull'efficienza competitiva di diversi fattori come la concentrazione di spore, il tempo di inoculo e il rapporto di quantità tra due ceppi in competizione, al fine di indagare alcuni meccanismi che sono alla base del processo di competizione.

La stessa procedura sarà sfruttata per studiare l'effetto di composti dalle note proprietà antiossidanti sull'accumulo di tossina: con questo proposito la metodica di coltivazione/lettura in micropiastra è stata sfruttata per valutare sia composti puri (come acido ascorbico, acido α -lipoico e N-acetil-cisteina), che estratti naturali commerciali utilizzati come materie prime nella cosmetica e nella nutraceutica, che estratti vegetali complessi.

Materiali e Metodi

1. TERRENI E CEPPI

1.1 Terreni di coltura

Yeast Extract Sucrose medium (YES):

estratto di lievito	20g/l
saccarosio (YES 5%)	50g/l
saccarosio (YES 15%)	150g/l
Quando necessario, agar	2g/l

Sterilizzazione in autoclave per 20' a 121°C.

Czapek Yeast Extract Agarose (CYA):

saccarosio	30g/l
estratto di lievito	5g/l
NaNO ₃	3.0g/l
K ₂ HPO ₄	1.3g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g/l
KCl	0.5g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g/l
trace metal solution (1% w/v ZnSO ₄ ·7H ₂ O; 0.5% w/v CuSO ₄ ·5H ₂ O)	1ml/l
agar	15g/l

Sterilizzazione in autoclave per 20' a 121°C.

Malt Extract Agar (MEAB):

estratto di malto	20g/l
peptone	10g/l
glucosio	20g/l
agar	20g/l

Sterilizzazione in autoclave per 20' a 121°C.

CY20S:

Terreno CYA con 200g/l di glucosio e privo di trace metal solution.

Sterilizzazione in autoclave per 15' a 121°C.

Coconut Agar Medium (CAM):

400g di crema di cocco commerciale (Vitasia) portati a 1.2l con H₂O bidistillata; agar 20g/l.

Sterilizzazione in autoclave per 10' a 121°C.

Coconut Liquid Medium (CLM):

400g di crema di cocco commerciale (Vitasia) portati a 1.2l con H₂O bidistillata.

Sterilizzazione in autoclave per 10' a 121°C.

Clarified Coconut Medium (CCM):

CLM ottenuto come descritto sopra viene raffreddato a 0-4°C durante la notte. Il risultato di questa incubazione a freddo è la separazione della fase grassa (solidificata) dalla fase liquida; questa viene recuperata sterilmente e centrifugata 15 min a 3,200xg. Il particolato residuo sia flottante che depositato viene scartato, mentre la fase intermedia “chiarificata” viene utilizzata come terreno di coltura negli esperimenti di timing con lettura diretta della piastra di inoculo (Degola *et al.*, 2011).

DRBC + Fe-citrato (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol):

glucosio	10g/l
peptone	5g/l
KH ₂ PO ₄	1g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g/l
Rosa Bengala	25mg/l
dichloran	1mg/l
cloramfenicolo (da soluzione 34mg/ml)	2.94ml/l
agar	20g/l

citrato ferrico (sterilizzato a parte)

0.5g/l

Sterilizzazione in autoclave per 20' a 121°C.

1.2 Sospensioni sporali

Le sospensioni sporali vengono ottenute a partire da sezioni di terreno YES 5% agarizzato inoculate e incubate per 7 giorni al buio a 28°C in provette di vetro; quando la coltura è matura si aggiunge una soluzione sterile di H₂O bidistillata e Tween20 (0.1%). La provetta viene agitata con vortex in modo da rimuovere i conidi dalla superficie della colonia stessa e portarli in soluzione. La sospensione viene filtrata in sterilità con una membrana di nylon (porosità 32µm) per rimuovere i residui di micelio; la concentrazione finale dei conidi viene determinata allo spettrofotometro (OD₆₀₀) secondo una retta di taratura appositamente costruita. Le colture utilizzate in ogni singolo esperimento sono ottenute sempre da sospensioni di conidi recuperate e conteggiate poco prima dell'inoculo.

1.3 Ceppi di *A. flavus*

Il ceppo MAM13 (afla⁺) è stato gentilmente fornito dal Dr. G. Criseo del Dip. Di Scienze Microbiologiche Genetiche e Molecolari dell'Università di Messina. Il ceppo afla⁻ BS07 è stato gentilmente fornito dal dott. K.C. Erlich (North Carolina State University, Dept. of Plant Pathology, USA). Il ceppo di *A. parasiticus* NRRL2999 proviene dalla collezione CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands). Gli altri ceppi, isolati e caratterizzati in questo studio, sono elencati nella tabella S-1 della sezione Materiale Supplementare.

2. ISOLAMENTO DEI CEPPI NATURALI

2.1 Isolamento da cariossidi di mais

Otto chicchi di mais prelevati da ogni lotto vengono vortexati con 5ml una soluzione sterile di H₂O bidistillata e Tween20 (0.1%), e lasciati riposare 15'; 50µl e 100µl della soluzione di lavaggio vengono poi piastrati su terreno selettivo DRBC+Fe-citrato e le piastre vengono successivamente incubate 4 giorni al buio a 31°C. Le colonie la cui morfologia macroscopica corrisponde a quella di *A. flavus* vengono recuperate, replicate su YES e incubate a 28°C al buio fino alla completa sporificazione della coltura. La sospensione sporale successivamente ottenuta viene divisa in due stock, di cui uno viene conservato a -20°C e l'altro viene mantenuto a 4°C e utilizzato per le successive colture del ceppo.

2.2 Isolamento da farine

L'isolamento è stato effettuato mediante l'utilizzo di buste con filtro caratterizzate dalla presenza di un filtro che separa la stesca in due compartimenti; il filtro permette il passaggio delle spore, mentre impedisce il passaggio della parte corpuscolare.

Circa 30gr di farina vengono amalgamati con 40ml di una soluzione di lavaggio (H₂O bidistillata + Tween20 0.1%). Un volume di 100µl della soluzione filtrata viene poi piastrato su DRBC Fe-cit; le piastre sono incubate a 31°C per 4 giorni al buio.

2.3 Caratterizzazione degli isolati

L'identificazione colturale degli isolati è stata condotta presso il Laboratorio di Micologia della Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari (SSICA) di Parma secondo le chiavi identificative proposte da Pitt (Pitt and Hocking, 1997) e Samson (Samson *et al.*, 2004). Laddove effettuata, l'identificazione molecolare dei ceppi è stata condotta presso il laboratorio delle Dott.^{ssa} G.C. Varese, della Mycotheca Universitatis Taurinensis (MUT; Università di Torino).

2.3.1 Morfologia della colonia

-diametro: la misurazione viene effettuata con un centimetro sul retro della colonia; nel caso di *Aspergillus flavus* le colonie cresciute su CYA hanno un diametro di 50-70mm a 37°C e di 65-70mm a 25°C, su MEAB presentano un diametro che può variare dai 50 ai 60mm. In CY20S il diametro è compreso tra i 65 ed i 70mm.

-caratteristiche macroscopiche: l'osservazione allo stereomicroscopio (ingrandimento 5X-25X) permette di valutare con maggiore precisione il colore della colonia oltre che la struttura dei conidiofori ed il grado di sporificazione. A questo ingrandimento sono ben osservabili le teste degli aspergilli, dalla tipica struttura aspergillare radiata, e i conidi che si dispongono in organizzazione colonnare quando il conidioforo è in avanzato stato di maturazione (fig. 3-H). La consultazione dell'Handbook of color (Kornerup and Wanscher, 1978) fornisce la chiave di lettura cromatica più attendibile ai fini dell'identificazione. Le colonie di *A. flavus*, cresciute su CYA a 37°C hanno un aspetto non particolarmente addensato e sono spesso fioccosi al centro (fig. 3-C). Le teste conidiali solitamente sono distribuite in maniera uniforme sull'intera colonia, mentre sono rade o assenti in aree di crescita fioccosa o di produzione di sclerozi; sono caratterizzate da un colore che va dal verde-grigiastro al verde oliva ma talvolta risultano tendenti al giallo e nelle zone dove il micelio è più vecchio spesso virano verso il verde. I conidi delle colonie cresciute su CYA a

25°C sono di colore verde, verde oliva o oliva, talvolta screziati con venature grigio-gialle o grigio-oliva, il micelio è bianco (fig. 3-A). Gli sclerozi quando presenti, hanno una colorazione che può variare dal marrone al nero. L'aspetto di *A. flavus* su MEAB è molto simile a quello su CYA, ma talvolta il micelio può essere meno addensato e più fioccoso (fig. 3-B); i conidi sono di colore verde oliva, occasionalmente verde scuro. Il reverse della colonia si presenta solitamente incolore, a volte tendente al giallo. Le caratteristiche delle colonie cresciute in CY205 sono molto simili a quelle che si osservano in CYA, eccetto che per il colore giallo prodotto occasionalmente sul reverse. A 37°C *A. flavus* cresce rapidamente e può essere distinto da *A. oryzae* grazie alla texture meno fioccosa della colonia ed al colore più tendente al verde.

2.3.2 Morfologia delle strutture riproduttive

Le caratteristiche microscopiche dei conidiofori sono state analizzate con un microscopio a contrasto interferenziale Polyvar (Reichert Jung). Con un'ansa sterilizzata si preleva una piccola porzione di colonia adeguatamente sporificata, solitamente una porzione di micelio dove i corpi fruttiferi siano abbastanza giovani ed il numero di conidi non sia eccessivo. Il campione prelevato viene stemperato su un vetrino porta-oggetto in una goccia di acido lattico; prima di coprire il campione con il vetrino copri-oggetto vengono aggiunte due gocce di acido acetico per allontanare dai conidiofori l'eccesso di conidi maturi. Ad un ingrandimento 1250x si osserva bene la struttura tipica delle teste degli *Aspergilli*, con metule e filiadi in evidenza (fig. 3-E). Secondo le chiavi di identificazione *A. flavus*, in quanto biseriato, si distingue per la presenza sia di metule che di filiadi sulla testa del conidioforo, ed inoltre per la forma sferica e il diametro della vescicola (da 20 a 45µm; fig. 3-D) e per la superficie rugosa e il diametro (dai 3 ai 6µm) dei conidi (fig. 3-F; 3-G).

2.3.3 Sclerozi

Rappresentano uno dei parametri per la classificazione di *A. flavus*. La formazione degli sclerozi viene indotta inoculando i ceppi su CYA e incubandoli

a 30°C. Laddove si osservi la formazione di queste strutture esse vengono recuperate con uno stuzzicadenti, lavate in una soluzione di etanolo al 20% per allontanare i conidi dalla superficie e posizionate in una goccia di agar allo 0.5% su vetrini portaoggetti. Le strutture vengono osservate al microscopio ottico ad un ingrandimento di 10X, e il diametro misurato utilizzando un righello presente sull'oculare. Per ciascun ceppo si calcola il valore medio di almeno 20 sclerozi. I ceppi vengono classificati come S (small) se il diametro medio degli sclerozi è inferiore ai 400µm o come L (large) se il diametro medio è superiore ai 400µm.

2.3.4 Produzione di aflatossina

Condotto in terreno CAM, il test sfrutta la capacità delle aflatossine di emettere fluorescenza in seguito ad eccitazione tramite radiazioni UV di 365nm, grazie alla loro struttura chimica: i gruppi funzionali aromatici con bassi livelli di energia, infatti, originano transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$. L'emissione è correlata alla rigidità della molecola. In virtù della sua composizione, il terreno a base di crema di cocco consente l'osservazione dell'accumulo di aflatossina come anello di fluorescenza sottostante la colonia (Arseculeratne *et al.* 1969; Davies *et al.* 1987). Un volume di 10µl della sospensione sporale del ceppo viene inoculato su terreno CAM e incubato 4-5 giorni a 25°C al buio. In seguito all'esposizione della piastra al transilluminatore UV ($\lambda=365\text{nm}$), gli isolati che presentano il caratteristico alone di fluorescenza blu intorno alla colonia vengono battezzati come produttori di aflatossina (afla⁺), al contrario, in assenza di fluorescenza il ceppo viene classificato come non produttore (afla⁻).

2.3.5 Accrescimento radiale

La determinazione della velocità di accrescimento radiale (radial growth) è stata condotta misurando per 4 giorni, ogni 24h, l'incremento della raggio di 3 colonie del ceppo inoculate in 3 punti equidistanti in una piastra Petri ($\varnothing = 9\text{cm}$) di terreno YES 5% e incubate a 25°C. La stima della crescita, espressa in cm/giorno, è ottenuta misurando il *reverse* delle colonie con un centimetro.

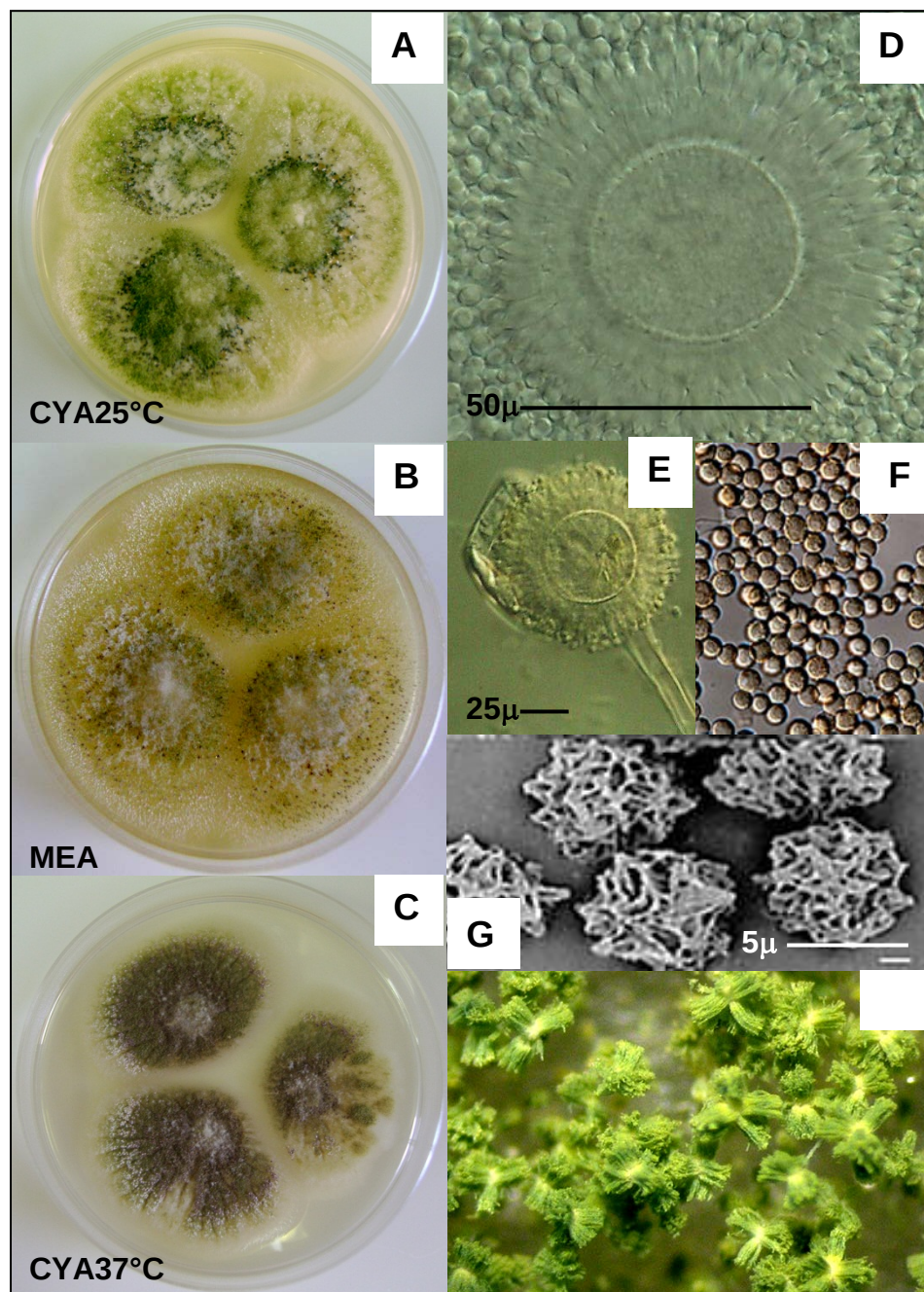


Fig. 3: Caratteristiche morfologiche macro e microscopiche di *A. flavus*.

3. CONDIZIONI DI COLTURA

3.1 Coltura in micropiastre

Il sistema si basa sull'inoculo di sospensioni sporali in piastre da 96 pozzetti (Tissue Culture Plate 96-well Flat Bottom with Lid, Sarstedt, USA) utilizzando come terreni di coltura sia CLM che CCM. Ogni pozzetto contiene un volume finale di 200 μ l di coltura, e una concentrazione variabile di spore; negli esperimenti di competizione il numero di conidi è pari a 10³/pozzetto, per un rapporto dei due ceppi pari a 1:1 (5x10² ognuno, così come i rispettivi controlli). La crescita viene condotta al buio a 25°C per 6 giorni: parametri come la morfologia del micelio e l'avanzamento dello stadio di sporificazione sono valutati come indici di maturazione della coltura. La quantificazione dell'aflatossina viene ottenuta con un lettore di micropiastre a fluorescenza (TECAN SpectraFluor PLUS, Mannedorf, Switzerland), settato sui seguenti parametri: λ_{ecc} =360nm, λ_{em} =465nm; gain=83; n° flash=3; integration time=200 μ sec; lag time=0 μ sec. La lettura dei campioni può avvenire secondo due procedure: **1.** per le colture in CLM, alla fine del periodo di incubazione 100 μ l di terreno di coltura vengono accuratamente rimossi dai pozzetti della piastra di coltura e trasferiti in una nuova piastra, evitando, per quanto possibile, di trascinare micelio durante il trasferimento. **2.** Per le colture in CCM le letture vengono eseguite direttamente nella piastra di coltura. In entrambi i casi, la fluorescenza viene acquisita dal fondo dei pozzetti.

Nel processo di elaborazione dei dati il valore grezzo di lettura viene normalizzato, sottraendo il valore di fluorescenza basale dato dalla lettura di terreno ottenuto dalla crescita di un ceppo non produttore: si presuppone, in questo modo, che il segnale di fluorescenza dell'aflatossina venga ripulito dal contributo della plastica, del terreno e di eventuali metaboliti rilasciati nel terreno durante la crescita.

3.2 Crescita su cariossidi per indurre la degenerazione del ceppo

Per simulare la degenerazione dovuta alla propagazione su un substrato naturale, una sospensione sporale del ceppo negativo TO ϕ contenente 5×10^3 conidi viene inoculata su 3 cariossidi di mais precedentemente sterilizzate in autoclave; la coltura, incubata a 28°C al buio per 7 giorni (o comunque per il tempo necessario alla completa sporificazione del micelio); il recupero e il filtraggio della sospensione sporale vengono condotti secondo la stessa procedura descritta in precedenza. Infine, 50 μ l della sospensione vengono re-inoculati su altre 3 cariossidi di mais sterili; 1ml della medesima viene invece conservato a -20°C. Questo procedimento è stato ripetuto per 25 volte.

4. ESTRAZIONE E AMPLIFICAZIONE DEL DNA

4.1 Estrazione:

Condotta con il protocollo classico della doppia estrazione in fenolo-cloroformio. Una sezione di micelio non sporificato viene campionata da una coltura solida o liquida e posta all'interno di una microprovetta con circa 200 μ l di glass microbeads ($\varnothing=100-200\mu$ m); il campione viene congelato in azoto liquido e sottoposto per 5'' all'azione meccanica di un amalgamatore dentale (TAC200S, LINEA TAC, Montegrosso d'Asti, Italia; frequenza d'oscillazione 4200 colpi/min, Hz50-60). I passaggi di congelamento e frantumazione vengono ripetuti per 3 volte, e comunque fino alla completa polverizzazione del micelio. Dopo l'aggiunta di 800 μ l di buffer di estrazione (EDTA 0.5M, pH 8.5 + SDS 20%) il campione viene nuovamente agitato nell'amalgamatore e incubato per 15' a 68°C, poi centrifugato 15' a 12000rpm. Al supernatante vengono aggiunti

125 μ l di CH₃COONa 3M: dopo un'ora in ghiaccio il campione viene centrifugato a 4°C per 15' a 12000rpm. La purificazione dalla frazione proteica avviene lavando il campione due volte con 1ml di FIAC (fenolo-cloroformio-alcol isoamilico 25:24:1) e una volta con 1ml di cloroformio. La fase acquosa viene recuperata e precipitata con un ugual volume di alcool isopropilico, lavata con etanolo al 70% e risospesa in TE+RNasi (Tris-HCl 10mM, pH 8.0 + EDTA 1mM + RNasi 20 μ g/ml), che ripulisce il campione da eventuale RNA residuo. Il campione viene conservato a -20°C, e diluito 1:50 prima di essere utilizzato come templatato nella reazione di PCR.

4.2 Quantificazione del DNA:

Il DNA viene quantificato su gel di agarosio tramite confronto con uno standard: 2 μ l di campione e 1 μ l di LB 10X (bromofenolo blu 0.25% (w/v), xilene cianolo 0.25% (w/v), glicerolo 30% (w/v)) vengono portati a 10 μ l con H₂O bidistillata e caricati in un gel allo 0.8%.

4.3 Amplificazione (PCR)

Le reazioni di amplificazione sono state condotte secondo il seguente programma: 4' a 94°C; 5 x 1' a 94°C – 1' a 60°C – 1' a 72°C; 30 x 1' a 94°C – 1' a 55°C – 1' a 72°C; 6' a 72°C (Degola *et al.*, 2007.)

I prodotti di amplificazione dei geni target sono stati ottenuti assemblando la seguente mix di reazione:

gDNA (diluizione 1:50)	2 μ l
Flexi Buffer 5X Colorless	4 μ l
MgCl ₂ 25mM	2 μ l

dNTP 25mM	0.2μl
Primer Fw (12.5 pmol)	0.8μl
Primer Rev (12.5 pmol)	0.8μl
GoTaq® Hot Start (Promega) 5U/μl	0.125μl
H ₂ O BD sterile fino a	20μl

I primers utilizzati per l'amplificazione del DNA sono elencati di seguito:

Primer code	Gene	Accession number	Primer sequence
aflS-gF	<i>aflS</i>	AF077975	GAACGCTGATTGCCAATGCC
aflS-giR			GAACGCTGATTGCCAATGCC
pksAFw	<i>aflC</i>		CTTGGTCTACCATTGTTTGG
pksARev			CTCATTTCATGCGAGTCAAG
Nor-F	<i>aflD</i>	AY510455	ACGGATCACTTAGCCAGCAC
Nor-R			CTACCAGGGGAGTTGAGATCC
aflH-F	<i>aflH</i>	AY371490	GAGACGGGGCAGAACATCCTC
aflH-R			AGCAGCCATAGCCTTCTTCA
aflJ-est cF	<i>aflJ</i>	AY371490	CGTGGCACCAGTTCGTGAGG
aflJ-est R			TGTCCAGCCCCAGTTCAGC
aflM-F	<i>aflM</i>	AY371490	CCGTTTAGATGGCAAAGTGG
aflM-cR			CAAGCGGCACACTCGTCTA
aflN-cF	<i>aflN</i>	AY371490	CGGTAGTGCTGGACACTCAAC
aflN-R			CGTTCCTTGACACGACATGG
aflP-F	<i>aflP</i>	AY371490	CACGAAGCCACTGGTAGAGG
aflP-cR			GATTTCAACGCATGCAGCATC
Tub1-F	<i>tub1</i>	M38265	GCTTTCTGGCAAACCATCTC
Tub1-R			GGTCGTTTCATGTTGCTCTCA

4.4 Randomly Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR):

La tecnica RAPD-PCR prevede l'amplificazione casuale di frammenti di DNA mediante l'uso di oligonucleotidi di 15-20bp che sono in grado di appaiarsi al DNA in corrispondenza di una sequenza complementare; questo determina l'amplificazione di un numero variabile di sequenze di diverse dimensioni. In questo studio il gDNA è stato amplificato con l'oligonucleotide 842 (UBC SSR Primer RAPD Synthesis project Oligonucleotide Set 100/9, Biotechnology Laboratory, Vancouver, Canada), che nel corso di analisi precedenti era risultato tra i migliori in grado di genotipizzare isolati naturali di *A. flavus*. La sequenza del primer 842, leggermente degenerata, è 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3', dove Y=G,C ($T_m=54/56^{\circ}\text{C}$). Il programma di amplificazione utilizzato prevede: 4' a 94°C ; 5 x 1' a 94°C – 20'' a 47°C - 2' a 72°C ; 6' a 72°C .

5. DOSAGGIO DELLE AFLATOSSINE

Come descritto in Degola *et al.* (2012), la determinazione della concentrazione di aflatossina nei brodi è stata condotta estraendo $300\mu\text{l}$ di coltura con 2.5 volumi di metanolo 70% (v/v), incubando la miscela a temperatura ambiente in agitazione per un'ora e centrifugando 10' a $3000\times g$. Il supernatante è stato recuperato e la concentrazione di aflatossina B determinata tramite fluorescence-HPLC, secondo la procedura descritta da Chiavaro *et al.* (2001). La separazione è stata ottenuta con una colonna C18 Waters XTerra™ (150 x 2.1mm; $3\mu\text{m}$) in condizioni isocratiche (CH_3OH : 6 mmol/l β -CD in acqua, 20 : 80 v/v). Il limite di rilevamento (LOD) è stato fissato $<0.05\text{ng}$. I campioni risultati positivi sono stati successivamente confermati con analisi UPLC-MS, come riportato in Degola *et al.* (2007). In questo caso, le analisi cromatografiche sono state condotte con

un sistema Alliance 2695 (Waters) equipaggiato con spettrometro di massa singolo quadrupolo ZMD (Waters). Anche in questo caso è stata utilizzata una colonna analitica C18 XTerra™ (250 x 2.1mm, 3μm). Il limite di rilevamento è stato fissato a 0.1μg/l. Le analisi sono state replicate in triplo, con un recupero del 95%.

La determinazione della concentrazione di aflatossina nei campioni di granella è stata invece condotta secondo il metodo codificato dall'Istituto Superiore di Sanità relativo al Regolamento CE N. 401/2006 della commissione sui metodi di campionamento e analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 70/12). In breve, il campione viene macinato (Knifetec® 1095 Foss Tecator, AB, Hoganas, Sweden) e omogeneizzato per 3' con metanolo 80% (v/v) in un rapporto peso/volume di 1:5; la miscela viene filtrata su carta, diluita 1:10 in acqua bidistillata e rifiltrata attraverso glass microfiber filter (1.5μm, VICAM, Watertown, MA, USA). 10 ml del filtrato (equivalente a 1g di campione) viene fatto passare attraverso una colonnina di immunoaffinità (AFLATEST, VICAM) per AFB₁. Dopo 2 lavaggi, l'aflatossina viene eluita con 1ml di metanolo, alla velocità di flusso di 1–2 gocce/sec. L'eluato, raccolto in una glass vial, viene addizionato con 1ml di fase mobile prima dell'iniezioni in HPLC (Spotti *et al.*, 1999). L'analisi cromatografica è condotta con una pompa JascoModel PU-1580, equipaggiata con colonna Vertex (150x4.6mm, Eurospher 100-5C18, Kramer, Berlin, Germany), autocampionatore Jasco Model AS-1555 (loop=0.1 ml) e Jasco Model FP-1520 fluorescence detector ($\lambda_{ex}=365nm$ and $\lambda_{em}=440nm$).

Risultati e Discussione

1. ANALISI SEMI-QUANTITATIVA DELL'ACCUMULO DI AFLATOSSINA

Diversi autori hanno riportato sistemi adatti per la rapida identificazione di ceppi di *A. flavus* produttori di aflatossina (Dyer and McCammon, 1994; Rojas-Duran *et al.*, 2007); in particolare, Cotty (1988b) descrive un semplice metodo a fluorescenza per stimare quantitativamente il livello di aflatossina in un terreno di coltura solido. Fino a questo momento per una diagnosi rapida (qualitativa) di aflatossigenicità si ricorreva dunque all'inoculo del ceppo su piastre di terreno agarizzato a base di crema di cocco (CAM), osservando al transilluminatore l'alone di fluorescenza blu ($\lambda=365\text{nm}$) caratteristico delle colonie in grado di accumulare tossina, mentre la determinazione della concentrazione della stessa passa tutt'ora attraverso tecniche immunologiche (ELISA) o chimiche (HPLC). Da un punto di vista pratico ed economico, la tecnica colturale presenta diversi vantaggi: di facile realizzazione, non necessita né di apparecchiature costose e complesse (con tutti i costi di manutenzione e le problematiche di formazione degli operatori connessi); come già accennato, tuttavia, il periodo di incubazione necessario per ottenere un risultato certo può risultare abbastanza lungo (Degola *et al.*, 2009), ed il dato stesso è puramente qualitativo. Similmente, anche l'effetto della competizione intraspecifica sull'accumulo di aflatossina può essere studiato co-inoculando i ceppi in piastre CAM: in questo caso la scomparsa o l'indebolimento dell'alone di fluorescenza in corrispondenza delle colonie miste *afla⁺/afla⁻* è stato individuato come indice di buona efficienza competitiva del non produttore sul ceppo produttore (Degola *et al.*, 2011). La metodica non permette però la valutazione di differenze nell'efficacia competitiva di ceppi diversi, ed inoltre uno screening significativo richiederebbe un numero di piastre di coltura pari al numero di ceppi che si desidera testare.

Le popolazioni atossigeniche di *A. flavus* presenti in natura rappresentano un bacino da cui si possono selezionare i competitori più efficienti: l'approccio biocompetitivo, applicato al controllo della contaminazione da aflatossina nei cereali ed in altre colture suscettibili, necessita quindi di una metodica rapida, economica e highthroughput che sia in grado di vagliare ampie popolazioni di *A.*

flavus, alla ricerca di buoni competitori. Primo scopo di questo lavoro è stato realizzare uno strumento che permettesse di analizzare l'efficienza competitiva del maggior numero possibile di ceppi afla⁻ (o di un solo competitore nei confronti del maggior numero possibile di ceppi afla⁺), una metodica duttile e low-cost, adattabile alle necessità di alta resa per un'applicazione su larga scala. Abbiamo quindi sviluppato un sistema di coltivazione in piastra multipozzetto (in questo lavoro sarà descritto l'uso di micropiastre a 96 pozzetti, ma la metodica si può applicare anche a multiwell di 384) che rappresenta non solo un mezzo veloce ed efficiente per testare contemporaneamente diversi ceppi per la loro efficacia competitiva nell'abbattere l'accumulo di aflatossina, ma che costituisce anche uno strumento molto utile per studiare le condizioni che interferiscono nella produzione di aflatossina nei ceppi produttori, le variabili che influenzano l'efficacia di un biocompetitore e l'effetto di sostanze inibitrici o stimolatrici della biosintesi stessa.

1.1 Validazione della metodica

Il principio alla base della procedura si basa sulla coltivazione di *A. flavus* in 200µl di coltura liquida all'interno dei pozzetti di una micropiastra; l'utilizzo di un terreno liquido a base di crema di cocco (CLM) e l'incubazione ad una temperatura ottimale non solo per la crescita ma anche per l'accumulo di tossina (25°C) dovrebbe permettere un buon compromesso tra la velocità di maturazione della coltura e il raggiungimento del livello massimo di aflatossina in un tempo ragionevolmente limitato. Al termine dell'incubazione un volume fisso di brodo di coltura viene recuperato, trasferito in una piastra multipozzetto pulita e esaminato con un lettore di micropiastre a fluorescenza, equipaggiato con un filtro di eccitazione e di emissione specifici per l'aflatossina ($\lambda_{ex}=360nm$; $\lambda_{em}=465$). L'intensità luminosa (espressa come unità arbitraria dallo strumento) è, entro un certo intervallo dipendente anche dalla sensibilità del lettore, direttamente proporzionale alla concentrazione di AF presente nel terreno.

Gli esperimenti preliminari condotti per valutare l'affidabilità di questa procedura nel restituire un dato semi-quantitativo sono stati effettuati confrontando il valore di fluorescenza di diluizioni seriali di un terreno proveniente da una coltura di un ceppo produttore e la concentrazione di AF stimata con saggio ELISA. Tra 100ppb e 10ppm la correlazione si è dimostrata molto buona ($R^2 > 0.98$) in un ampio campo di concentrazione di aflatossina (da 100ppb a 10ppm) (fig. 4).

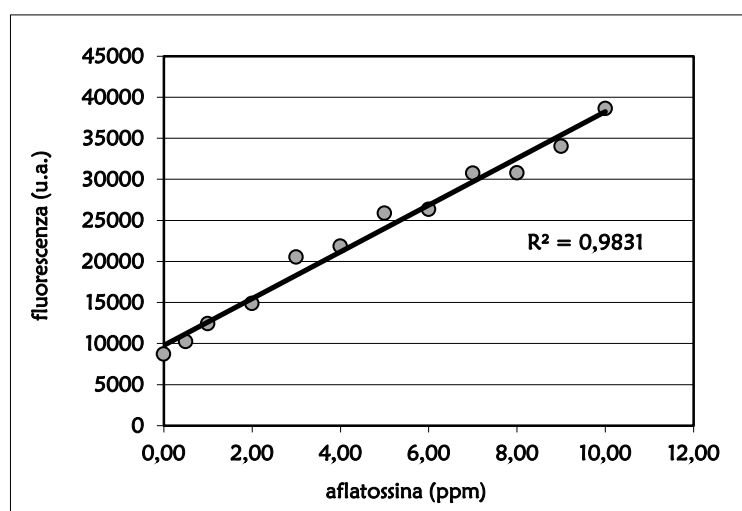


Fig. 4: Correlazione fluorescenza/concentrazione di AFB. L'intensità luminosa, espressa in unità arbitrarie (u.a.), è stata corretta sottraendo ai valori reali di lettura il valore di fluorescenza di un terreno di coltura di un ceppo afla-. La concentrazione di aflatossina (ppm) è stata determinata

Una seconda verifica di correlazione tra fluorescenza e concentrazione è stata ottenuta con un dosaggio HPLC di un'ulteriore serie di campioni a concentrazione crescente. Anche in questo caso i valori di fluorescenza ottenuti con il lettore di micropiastre sono stati normalizzati per eliminare il contributo di intensità luminosa dato dalla plastica della piastra di lettura, dal terreno e da eventuali prodotti metabolici rilasciati nel mezzo; a ciascuno è stato sottratto il valore di fluorescenza medio (5 repliche) di un terreno proveniente da una coltura di un ceppo afla-.

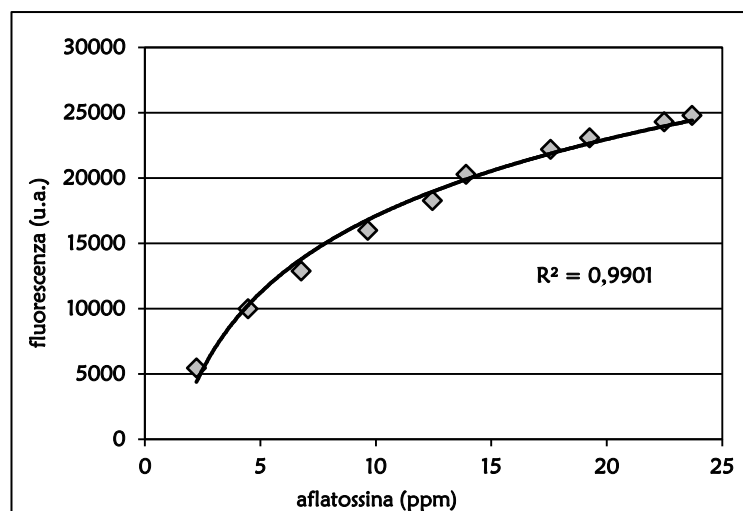


Fig. 5: Correlazione fluorescenza/concentrazione di AFB. La concentrazione di aflatossina (ppm) è stata determinata con HPLC (vedi sez. Materiali e Metodi); LOD=0.05ppb.

1.2 Definizione della cinetica di accumulo dell'aflatossina

La metodica di coltura in micropiastra è stata quindi utilizzata per osservare e analizzare la cinetica di accumulo di aflatossina di un ceppo forte produttore e di un ceppo medio-basso produttore, seguendo l'incremento di fluorescenza in ragione della quantità di aflatossina che i due ceppi di *A. flavus* sono in grado di accumulare. Le letture sono state effettuate ogni tre ore a partire dalle 24h dopo l'inoculo, nel tentativo individuare il momento in cui la sensibilità del sistema permette di rilevare l'inizio del rilascio della tossina nel terreno CLM. Alle colture dei due afla⁺ è stata affiancata una coltura di un ceppo afla⁻, allo scopo di analizzare anche l'andamento della relativa fluorescenza (derivante dal contributo del terreno tal quale e di prodotti metabolici rilasciati in esso durante la crescita). In queste condizioni (25°C, buio) livelli osservabili di fluorescenza sono stati registrati in una finestra temporale compresa tra le 50 e le 60h dopo l'inoculo, e l'incremento di intensità luminosa del terreno prosegue con una velocità ceppo-specifica, per raggiungere un probabile plateau intorno alle 90h

(fig. 6). La fluorescenza della coltura afla- si mantiene invece costante (>5000 u.a.).

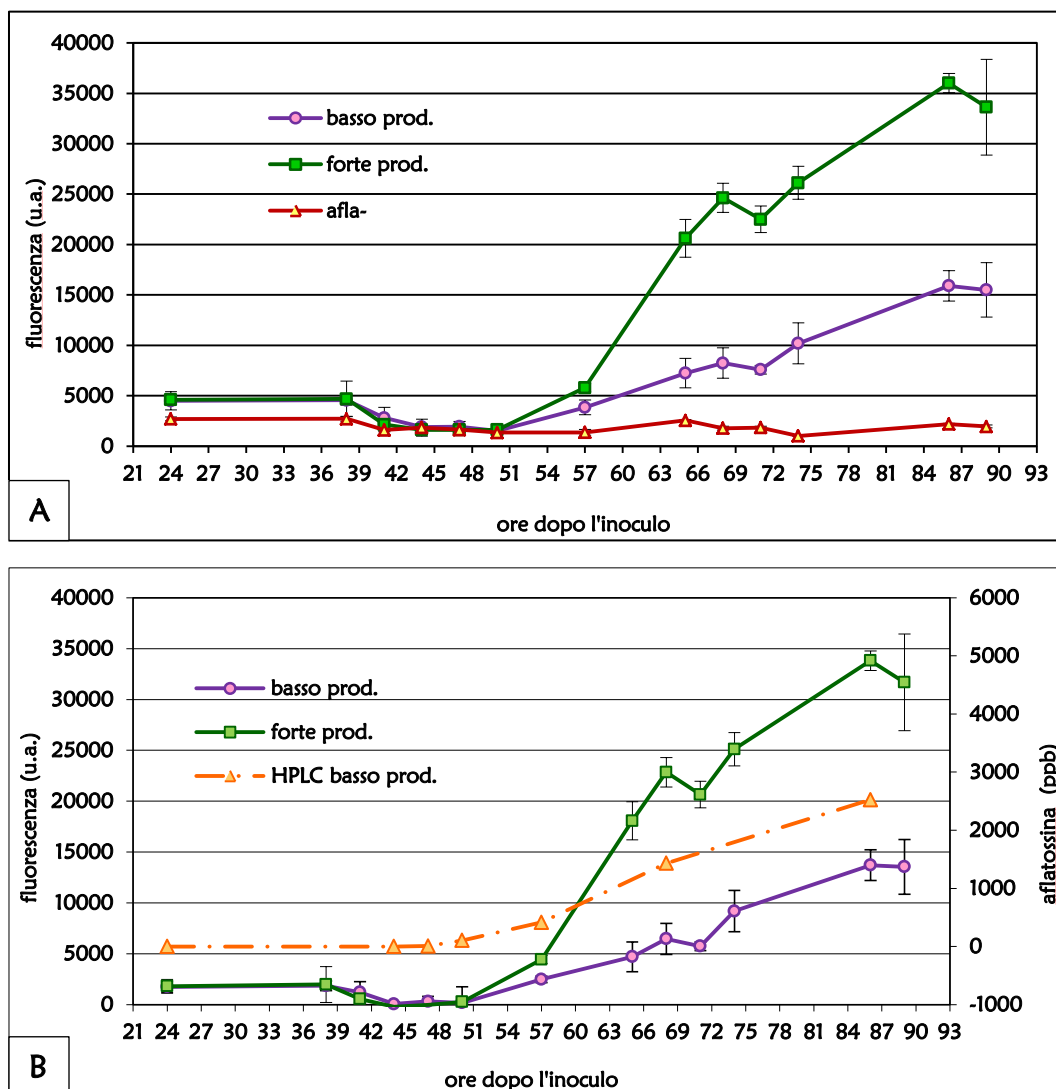


Fig. 6: Cinetica di accumulo di aflatoxina in CLM. Le curve si riferiscono ad una crescita condotta in CLM a 25°C al buio. La lettura dei valori di fluorescenza è stata ottenuta campionando 100µl di terreno per ogni tempo. Ogni campione è stato replicato in triplo. **A)** Aumento di fluorescenza nel terreno di un ceppo forte produttore di AF (curva verde), di un ceppo basso produttore (curva viola) e di un ceppo afla- (curva rossa). **B)** I valori di lettura dei campioni afla+ sono stati normalizzati sottraendo, per ogni tempo, i corrispondenti valori del ceppo afla-. I dosaggi di AF, determinati mediante HPLC (curva gialla), sono stati effettuati sui campioni di terreno provenienti dalla coltura del ceppo basso produttore.

La diagnosi fluorimetrica si dimostra pertanto affidabile come metodo per osservare e seguire il rilascio di aflatossina nel terreno, ma come per qualunque nuova metodica proposta occorre stabilirne la sensibilità. Su alcuni campioni rappresentativi della coltura del medio-basso produttore è stato pertanto condotto un dosaggio dell'aflatossina con HPLC. Come mostrato in fig. 6-B, il rilascio della aflatossina nel terreno viene registrato dal metodo analitico già dopo 47h dall'inoculo, mentre la lettura della fluorescenza ne consente il rilevamento solo fra le 50 e le 57h. La 'finestra buia, cioè l'intervallo di tempo in cui la tossina può essere individuata con l'analisi chimica ma non è ancora sufficientemente abbondante per essere rilevata dal lettore di fluorescenza, non è superiore alle 10 ore. L'incremento della concentrazione dell'aflatossina evidenziato dal dosaggio chimico ha comunque un andamento concorde con la curva della fluorescenza.

La metodica è stata sfruttata collateralmente per seguire il time-course dell'accumulo di aflatossina in colture di *A. parasiticus*. Filogeneticamente molto vicino ad *A. flavus*, *A. parasiticus* è una specie ugualmente significativa fra quelle in grado di produrre aflatossina: esso è infatti in grado di accumulare AF non solo di classe B, ma anche di classe G (G_1 e G_2). Per capire se la metodica potesse essere applicabile allo studio anche di questa specie è stato seguito l'andamento di accumulo della tossina in una coltura del ceppo di collezione afla⁺ *A. parasiticus* NRRL2999; per confronto, l'isolato aflatossigenico Fri2+ (forte produttore) di *A. flavus* è stato impiegato in una coltura parallela. L'accumulo della tossina è stato monitorato rilevando giornalmente i valori di fluorescenza associati a campioni provenienti dai terreni di coltura dei due ceppi.

I dati ottenuti (fig. 7) mostrano che in CLM l'andamento della curva di accumulo dell'aflatossina è molto simile per le due specie. Valori più alti di fluorescenza raggiunti dalla coltura di *A. parasiticus* rispetto quella di *A. flavus* potrebbero dipendere sia da differenze ceppo-specifiche nel potenziale di accumulo tra NRRL2999 e Fri2+, sia dal contributo, in *A. parasiticus*, della fluorescenza delle AFGs.

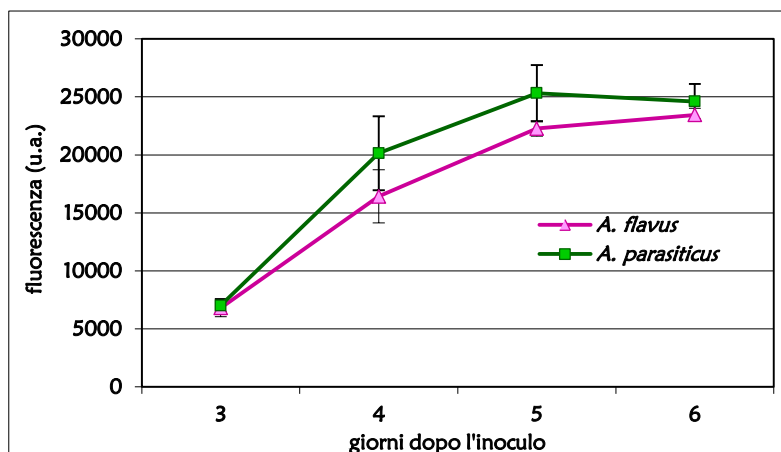


Fig. 7: Cinetiche di accumulo AF in *A. parasiticus* e *A. flavus* a confronto. Le colture in CLM sono state incubate a 25°C e il dosaggio della fluorescenza effettuato giornalmente fino al raggiungimento del plateau di accumulo (6 giorni). Le barre di errore di ogni campione si riferiscono alla deviazione standard calcolata su 6 repliche.

La sensibilità del lettore di micropiastre, ossia dei filtri di eccitazione e di emissione a lunghezze d'onda fisse, non permette purtroppo di discriminare tra le due classi di aflatossine.

La tecnica di coltivazione in micropiastre accoppiata ad un sistema di rilevamento basato sulla fluorescenza si dimostra realmente utile per valutare semiquantitativamente la concentrazione di aflatossina in terreno CLM. L'uso di un terreno a base di crema di cocco risulta decisamente più vantaggioso rispetto ai mezzi di coltura sintetici usati comunemente (YES, PDA, CYA, etc.) perché, nonostante questi risultino più o meno efficienti nel promuovere la produzione di AF da parte degli *Aspergilli* tossigeni, il CLM è apparentemente privo di quei composti naturalmente fluorescenti o schermanti che impediscono la determinazione dell'aflatossina con procedure basate sulla fluorescenza (per un approfondimento si veda Rojas *et al.*, 2005). I metodi culturali sono generalmente considerati meno sensibili dei metodi analitici (Abbas *et al.*, 2004); tuttavia, anche se questo è vero, le evidenze ottenute in questa sede dimostrano che l'intensità di emissione della fluorescenza è quantitativamente correlata con la concentrazione di tossina determinata con HPLC: questa osservazione sostiene

la validità della metodica, la quale, pur non possedendo la sensibilità dei metodi analitici classici, ha mostrato una buona affidabilità nel valutare e dosare la presenza di aflatossina in modo semplice ed economico. In questo senso va sottolineato che la procedura proposta non è pertanto destinata a sostituire saggi convenzionali come HPLC o ELISA per la determinazione quantitativa delle aflatossine; piuttosto, è particolarmente indicata per quelle sperimentazioni che richiedendo un'analisi multifattoriale della cinetica di accumulo della tossina.

1.3 Adattamento della metodica all'analisi in tempo reale

Una caratteristica negativa del terreno CLM consiste nel fatto che una delle sue componenti tende a formare un deposito nei pozzetti, aumentando notevolmente il rumore di fondo della fluorescenza dei campioni. Durante la crescita del micelio il deposito tende gradualmente a scomparire (probabilmente in conseguenza del consumo di parte di nutrienti contenuti nel terreno), ma per la determinazione della fluorescenza specifica dell'aflatossina è comunque necessario recuperare un'aliquota di terreno dalla piastra di coltura e trasferirla in una piastra pulita per la lettura. Ciò rende laborioso condurre esperimenti in cui siano necessarie numerose repliche e diversi tempi di lettura. L'esigenza di poter non solo analizzare velocemente un numero elevato di campioni ma anche condurre letture in tempo reale ha portato ad una modificazione della formulazione del terreno a base di crema di cocco: un CLM centrifugato e privato in parte di quella frazione flocculante/sedimentante che, precipitando sul fondo dei pozzetti, altera il rilevamento della fluorescenza, è stato testato sia per la sua capacità di indurre ancora un buon livello di accumulo di aflatossina (e ovviamente di consentire una buona crescita del fungo), sia per la possibilità di leggere i campioni direttamente dal fondo della piastra di inoculo. Le cinetiche di accumulo di due colture di un ceppo forte produttore (Fri2+), una allestita nel terreno "chiarificato" così ottenuto (CCM, Clarified Coconut Medium) e una preparata in CLM, sono state messe a confronto (fig. 8). Per la stima della

fluorescenza sia campioni in CLM che campioni in CCM sono stati recuperati e trasferiti, come da procedura, in una piastra di lettura, mentre un'altra serie di campioni in CCM è stata letta direttamente dal fondo della piastra di coltura.

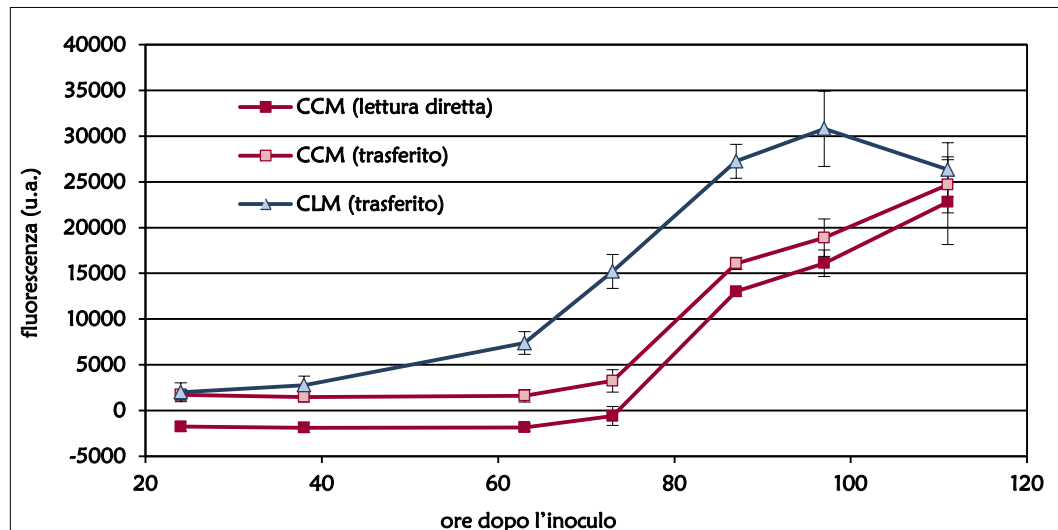


Fig. 8: Confronto cinetiche di accumulo AF in CLM e CCM. Le colture del ceppo di *A. flavus* Fri2+, incubate nelle stesse condizioni (25°C, buio), sono state seguite fino al raggiungimento del plateau di fluorescenza da parte della coltura CLM (114h). Le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard calcolata su 3 repliche.

Le due curve ottenute con il CCM non presentano alcuna differenza significativa; la piccola variazione di intensità a favore del CCM recuperato è probabilmente dovuta al minor volume analizzato rispetto a quello presente nei pozzetti letti direttamente, poiché in essi il volume residuo della coltura è ovviamente variabile rispetto a quello fisso (100μl) dei campioni recuperati per la lettura. L'osservazione principale è che la crescita in CCM provoca un ritardo nel rilascio di AF nel terreno rispetto alla coltura in CLM: al momento della massima produzione di tossina in CLM, infatti, la produzione nel terreno chiarificato corrisponde circa alla metà. Lo shift nell'inizio del rilevamento (dalle 63h in CLM alle 73h in CCM) potrebbe essere dovuto ad una diversa velocità di crescita di *A. flavus* nei due terreni, da attribuirsi ad una minore concentrazione di nutrienti

nella variante chiarificata. Questo “ritardo” si propaga fino al raggiungimento del plateau, che in CLM si assesta già 87h dopo l'inoculo quando in CCM l'accumulo di aflatossina è ancora in fase di incremento. Tuttavia, durante la fase tardiva della crescita (114h) sono stati raggiunti livelli di aflatossina simili in entrambi i terreni. Le diverse fasi dell'accumulo dell'aflatossina possono dunque essere rilevate in tempo reale. La concentrazione di AF nel terreno può essere valutata rapidamente (allo strumento è necessario meno di un minuto per leggere l'intera micropiastra) e le letture possono essere effettuate ad intervalli di tempo anche brevi (da un giorno a poche ore, a poche decine di minuti) durante l'incubazione delle colture. Inoltre, la modalità di lettura 'diretta' consente di monitorare il decorso della biosintesi di aflatossina in ogni pozzetto senza disturbare la crescita del micelio.

L'osservazione del plateau dei valori di fluorescenza, inizialmente interpretato come un equilibrio tra il raggiungimento dello stadio finale della maturazione della coltura e il massimo livello possibile di biosintesi di tossina da parte della stessa, è stata oggetto di approfondimento; non poteva infatti essere esclusa a priori l'ipotesi che il blocco dell'incremento della fluorescenza non corrispondesse ad un reale plateau di concentrazione dell'aflatossina, ma rivelarsi un artefatto dovuto all'esaurimento di “enhancers” naturali di fluorescenza presenti nel terreno. Teoricamente questa eventualità dovrebbe manifestarsi in modo ancor più evidente in CCM (in quanto impoverito rispetto al CLM), è stata quindi seguita la produzione di AF in questo terreno da parte di un forte produttore, prolungando il tempo di incubazione fino a 10 giorni. Dal terzo giorno di crescita è stato effettuato un campionamento giornaliero, sottoponendo i campioni sia al rilevamento della fluorescenza che al dosaggio della concentrazione di aflatossina tramite HPLC (fig. 9). I risultati ottenuti mostrano che quando viene raggiunto il plateau di fluorescenza (96h) lo stesso accade per la curva dei valori di aflatossina determinati con l'analisi chimica. Questo ci porta a concludere che la concentrazione di eventuali molecole in grado di incrementare la fluorescenza delle aflatossine è tale, anche in CCM, da garantire la loro funzione fino a un titolo di tossina nel terreno pari ad almeno

9ppm. Inoltre eventuali artefatti attribuibili all'accumulo nel mezzo di coltura di metaboliti con capacità di schermatura nei confronti della fluorescenza possono essere esclusi.

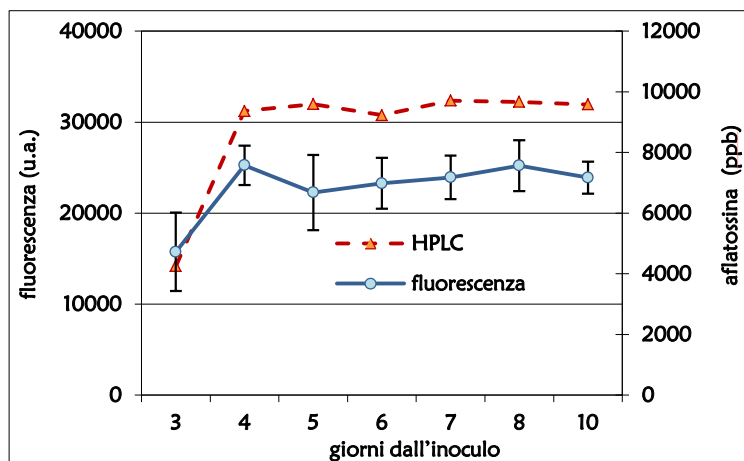


Fig. 9: Determinazione della produzione di AF durante la fase tardiva della crescita. La coltura del ceppo forte produttore Fri2+ è stata condotta in terreno CCM e mantenuta per 10 giorni a 28°C per accelerarne la maturazione. Lettura della fluorescenza e determinazione della concentrazione di AFB con HPLC sono state effettuate in parallelo sugli stessi campioni. I valori di fluorescenza della coltura aflatoxigenica sono stati normalizzati. Ogni campione è stato replicato in triplo.

1.4 Potenzamento della sensibilità della metodica

Quanto discusso finora dimostra come l'uso della metodica descritta consenta di rilevare concentrazioni di tossina superiori ai 100ppb con una buona affidabilità; tuttavia, un abbassamento di questo limite attraverso l'aumento della sensibilità del sistema potrebbe rendere quest'ultimo molto più efficace nell'evidenziare differenze significative in campioni contenenti concentrazioni inferiori di aflatossina. La naturale fluorescenza caratteristica delle aflatossine è determinata dalla loro struttura pentaeterociclica altamente ossigenata; tuttavia questa struttura è piuttosto rigida, e consente la restituzione di una intensità luminosa basale piuttosto bassa. Nelle tecniche analitiche generalmente utilizzate per il dosaggio della tossina ed equipaggiate con rilevatori di fluorescenza, questa bassa

emissione viene incrementata utilizzando sistemi di derivatizzazione pre- e post-colonna. Alcune molecole come le ciclodestrine (cyD) si sono dimostrate molto efficaci come reagenti di derivatizzazione post-colonna (Francis *et al.*, 1988; Vasquez *et al.*, 1992; Dall'Asta *et al.*, 2003; Galaverna *et al.*, 2008). Queste particolari molecole sono oligomeri ciclici di α -D-glucosio, in cui ogni unità è collegata all'altra mediante un legame α -1,4 glucosidico; questo determina la formazione di una struttura tridimensionale a forma di cono tronco, con una superficie esterna polare e una cavità interna non polare all'interno della quale possono “ospitare” una molecola idrofoba (fig. 10). Sono molecole solubili in acqua, e il riconoscimento di una molecola “ospite” è altamente selettivo, poiché la cavità ha una dimensione precisa e poco flessibile; il processo di riconoscimento è assolutamente reversibile e non avviene mediante la formazione di legami covalenti, inoltre esso è soggetto ad inibizione da parte di molecole che abbiano una maggiore affinità per la ciclodestrina del substrato stesso.

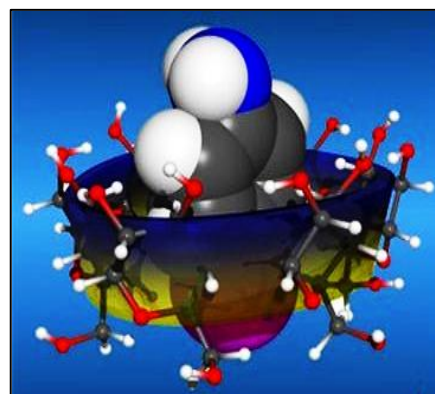
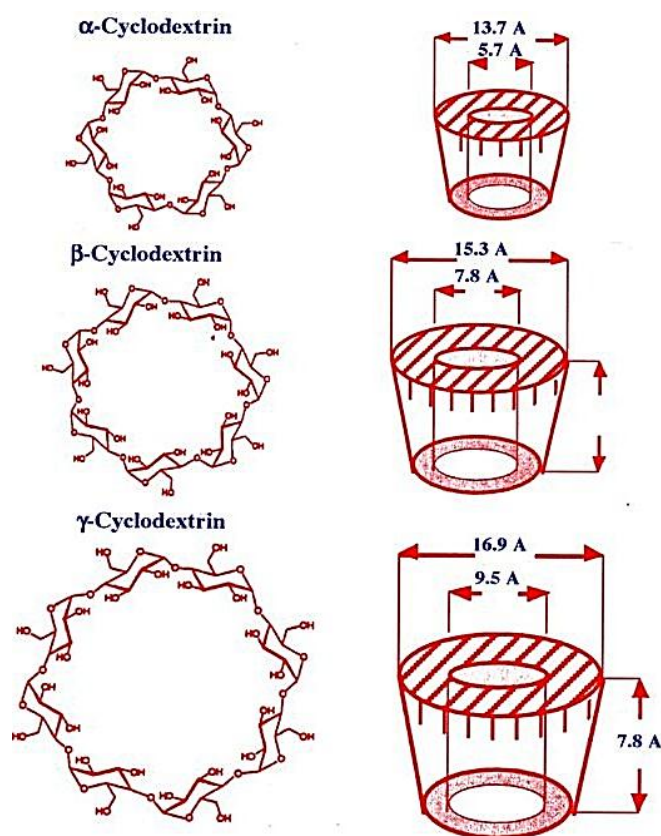


Fig. 10: Struttura delle cyd. **Sinistra:** struttura chimica, dimensioni e organizzazione spaziale di α -, β - e γ -cyd. **Sopra:** interazione della cavità apolare con una molecola idrofoba. Sono prodotte dalla degradazione parziale dell'amido seguito da una polimerizzazione enzimatica delle unità di glucosio in strutture cristalline omogenee toroidali.

Studi recenti hanno mostrato un significativo incremento della fluorescenza dell'aflatossina, prodotta da ceppi tossigeni di *Aspergillus*, grazie all'aggiunta di concentrazioni variabili di β -ciclodestrine ai tradizionali terreni sintetici impiegati per la coltivazione di muffe e lieviti (Fente *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2005). È stata pertanto vagliata la possibilità di migliorare il limite di rilevazione del sistema di coltura in micropiastre aggiungendo questi enhancers di fluorescenza al terreno CLM, nell'attesa che questa aggiunta permettesse di rendere osservabili anche piccoli accumuli di aflatossina. Per questa prova sono stati scelti tra tipi di ciclodestrine: α -cyd, β -cyd e una forma derivatizzata di β -cyd (butyl-cyd); queste sono state aggiunte, appena prima della lettura al fluorimetro, a campioni provenienti da terreno di coltura di un ceppo afla⁺ e contenenti concentrazioni crescenti di aflatossina appena prima della lettura.

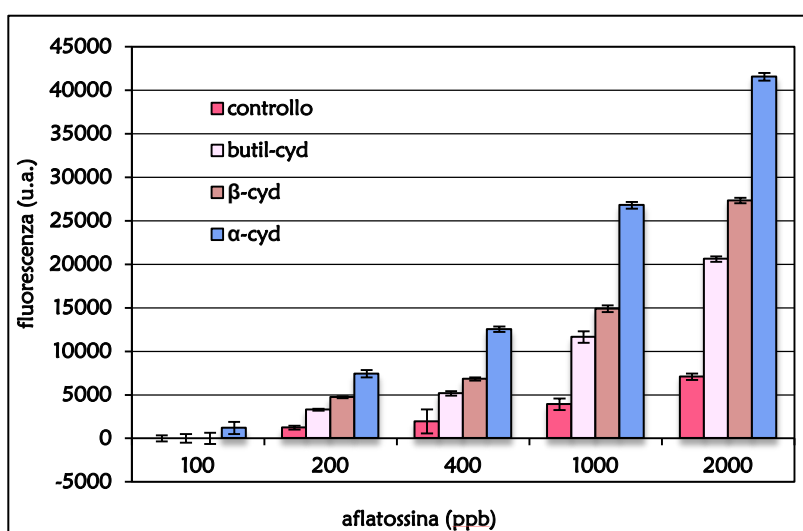


Fig. 11: Effetto delle ciclodestrine sulla fluorescenza dell'aflatossina. α -cyd, β -cyd e butyl-cyd sono state aggiunte all' 1.5% (w/v finale) a campioni di colture afla⁺ con concentrazioni di AF comprese tra 100 e 2000ppb. Le barre di errore verticali indicano la deviazione standard calcolata su tre repliche per campione.

L'effetto è evidente: la presenza di ciascuna delle tre molecole aumenta significativamente l'intensità dell'emissione di fluorescenza del terreno nei campioni con concentrazioni di AF superiori a 200ppb (fig. 11). In questa indagine la performance migliore tra tutte le ciclodestrine testate si ottiene con α -

cyd, che incrementa il livello di fluorescenza di otto volte rispetto al controllo. Le differenze tra gli enhancers in termini di efficacia sono state in qualche modo oscurate alla concentrazione più bassa di AF (100ppb), a dimostrazione del fatto che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, probabilmente questo rappresenta il limite inferiore della sensibilità del sistema. Nell'ottica di un utilizzo di routine della metodica, tuttavia, il costo attuale dell' α -cyd rappresenta senza dubbio uno svantaggio; più accettabile in questo senso è invece il costo della β -cyd, della quale abbiamo voluto pertanto stabilire la minima concentrazione efficace nel garantire un incremento apprezzabile della fluorescenza basale dell'aflatossina. Sono state messe a confronto concentrazioni decrescenti nell'ambito 3% - 0.3% di β -cyd e altre ciclodestrine disponibili: succinil-cyd e idrossipropil-cyd. Alle due concentrazioni più alte (3 e 1.5%) la resa della β -cyd si è dimostrata leggermente inferiore rispetto alle altre due ciclodestrine, ma questa differenza tende a livellarsi alla concentrazione più bassa (0.3%), alla quale l'incremento dell'intensità del segnale è pari al doppio del controllo (dato non riportato). Riferendosi a campioni provenienti da colture in CLM, negli esperimenti sopra descritti le ciclodestrine sono state aggiunte ai campioni prima della lettura. Tuttavia, la possibilità di utilizzare il CCM per l'analisi in tempo reale di cinetiche di accumulo rende interessante verificare l'effetto dell'aggiunta di ciclodestrine direttamente al terreno fin dall'inoculo della coltura. Con questa finalità una sospensione sporale di un ceppo afl^a è stata inoculata in terreno CCM: essendo un terreno "impoverito", il rischio che il fungo metabolizzi le ciclodestrine come fonte di carbonio è stato ridotto aggiungendo saccarosio. Al termine del periodo di incubazione è stata effettuata una prima lettura della fluorescenza, dopodiché gli stessi campioni sono stati risottoposti a lettura dopo ulteriore aggiunta di β -cyd (sempre allo 0.3%). I dati ottenuti (fig. 12) indicano che la disponibilità di saccarosio non influenza l'accumulo di aflatossina da parte del ceppo produttore; tuttavia, il confronto tra le colture addizionate con ciclodestrina al momento dell'inoculo e al momento della lettura sembra indicare che parte di queste vengano effettivamente metabolizzate/degradate dal fungo durante la crescita.

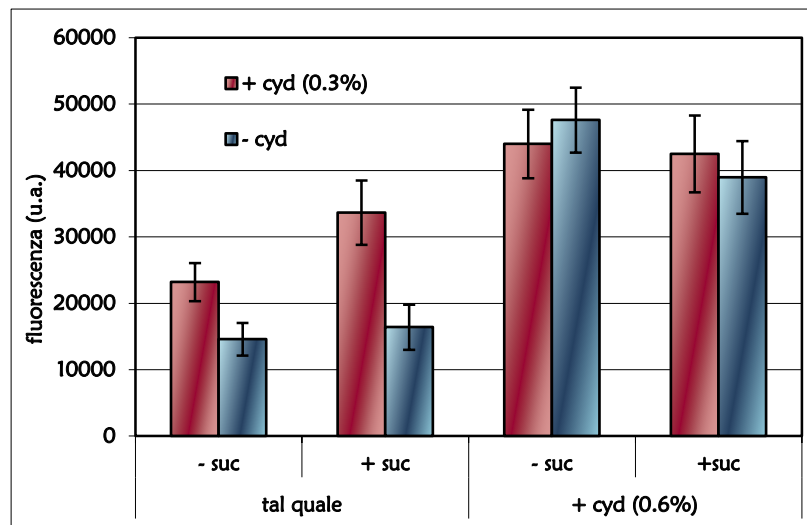


Fig. 12: Effetto della presenza di ciclodestrine nel terreno di coltura. Le β -cyd sono state aggiunte (+ cyd 0.3%) a una coltura in CCM contenente (+ suc) o privo (- suc) di saccarosio (5%). La lettura della fluorescenza è stata effettuata dopo 6 giorni di incubazione (25°C), prima (tal quale) e dopo l'aggiunta di un'ulteriore dose di β -cyd 0.3% (+ cyd 0.6%). La deviazione standard è calcolata su 3 repliche per campione.

2. INTERFERENZA NELLO STATO OSSIDATIVO DELLA CELLULA:

EFFETTO DI COMPOSTI ANTIOSSIDANTI SULLA BIOSINTESI DI AFLATOSSINA

In quanto organismi aerobi la sopravvivenza dei funghi dipende dall'ossigeno, e tuttavia essi devono confrontarsi con le conseguenze della sua presenza; prima fra tutte, la formazione di specie reattive (ROS), che oltre una certa soglia induce nella cellula una situazione di stress ossidativo. Secondo una definizione condivisa, per "stress ossidativo" si intende un "disturbo dell'equilibrio tra ossidanti e antiossidanti in favore delle specie ossidanti che porta ad un probabile danno ai costituenti cellulari" (Sies, 1991); secondo la "free radical theory of aging" proposta da Harman (1956), un eccessivo aumento di ROS altera l'equilibrio ox/redox, danneggiando sia le membrane cellulari che il metabolismo. Generalmente le cellule tollerano un basso livello di stress ossidativo, che induce la biosintesi di complessi antiossidanti (ad esempio tocoferoli, acido ascorbico e glutathione ridotto, ma anche enzimi quali catalasi, glutathione perossidasi e superossido dismutasi) la cui funzione è ristabilire l'equilibrio turbato.

Nei funghi filamentosi la risposta è ben più complessa, e coinvolge non solo la sintesi di molecole dal potere antiossidante, ma anche il potenziale di "plasticità fenotipica" del microrganismo stesso, che consente alla cellula di adattarsi e fronteggiare i cambiamenti ambientali (Caddick, 1993). Non solo: l'abbondanza relativa di specie reattive (sia dell'ossigeno che dell'azoto) rappresenta una sorta di input metabolico per numerosi processi biologici del fungo; l'estruzione dell'ifa primaria dai conidi durante la germinazione, l'instaurarsi della dominanza apicale e l'avvio del metabolismo secondario sono tutti fenomeni controllati dall'azione diretta o indiretta di ROS (Lledias *et al.*, 1999; Calvo *et al.*, 2002; Semighini and Harris, 2008). L'osservazione che la sintesi di alcuni metaboliti secondari avvenga durante particolari transizioni morfologiche e metaboliche in corrispondenza delle quali si registra un notevole accumulo di ROS è confermata da studi condotti su *Aspergillus parasiticus*, nel quale il *burst* di ROS e l'attivazione del

pathway biosintetico delle aflatossine si verificano in concomitanza del passaggio differenziativo che porta alla conidiogenesi e che può essere considerato come l'ingresso della coltura nella senescenza (Reverberi *et al.*, 2008). Biosintesi di micotossine e stress ossidativo sono dunque da considerarsi eventi strettamente correlati, forse persino inter-dipendenti. Nonostante le micotossine siano state per lungo tempo considerate “molecole di lusso” non strettamente necessarie alla sopravvivenza del fungo (Bennett, 1983), la dimostrazione che l'eccesso di ROS endogeni fungono da innesco per la sintesi di aflatossina e che consumo di ossigeno e accumulo di ROS nei ceppi tossigeni sono molto maggiori che non nei ceppi atossigeni (Jayashree and Subramanyam, 2000) porta a concludere che lo stress ossidativo sia un prerequisito per la biosintesi di questi composti, e ad avanzare l'ipotesi che uno dei ruoli giocati da essi nel panorama metabolico del fungo sia la detossificazione della cellula da una eccessiva produzione di ROS (Fanelli *et al.*, 2004).

Come già discusso, il pesante rischio sanitario rappresentato dalla diffusione di *A. flavus* e la contaminazione da aflatossine che ne consegue hanno stimolato negli anni il fiorire di un notevole numero di ricerche volte a individuare possibili strategie in grado di contenere la crescita dell'organismo e/o la produzione di micotossina da parte dello stesso. Lo stretto legame del metabolismo aflatossinico con lo stato ossidoriduttivo della cellula rappresenta pertanto un punto di interesse notevole per tutti quegli studi che mirano allo sfruttamento di composti/molecole per interferire con la biosintesi o l'accumulo della tossina; in questo senso esiste una letteratura molto vasta riguardante l'effetto inibitorio di antiossidanti (per una review completa si veda Holmes *et al.*, 2008), sia composti puri (acido ascorbico, acido ferulico, etilene) che miscele complesse (oli essenziali ed estratti naturali). Il disegno sperimentale strutturato in questa sezione affronta lo sviluppo di un sistema *in vivo* che sfrutti la risposta metabolica di *A. flavus* per la diagnosi del potere antiossidante di composti/estratti e l'analisi del loro effetto sulla biosintesi di aflatossina.

2.1 Effetto di composti puri

Prove di inibizione condotte in presenza di N-acetil-cisteina (N-ac-Cys) e acido ascorbico avevano dimostrato un certo effetto sull'accumulo di aflatossina da parte di un ceppo di *A. flavus* (Huang *et al.*, 2008); partendo da questa evidenza la metodica di coltura in micropiastra è stata impiegata per saggiare l'effetto degli stessi composti in terreno CLM (fig. 13). Tra le concentrazioni testate (1-10mM), l'N-ac-Cys è stata in grado di ridurre l'accumulo di aflatossina solo quando somministrata a 10mM; per contro, è stato osservato un abbattimento statisticamente significativo in presenza di acido ascorbico a tutte le concentrazioni (5-20mM). In particolare l'effetto più marcato si osserva nei campioni trattati con 15 e 20mM, il cui livello di AF è oltre il 70% in meno rispetto al controllo.

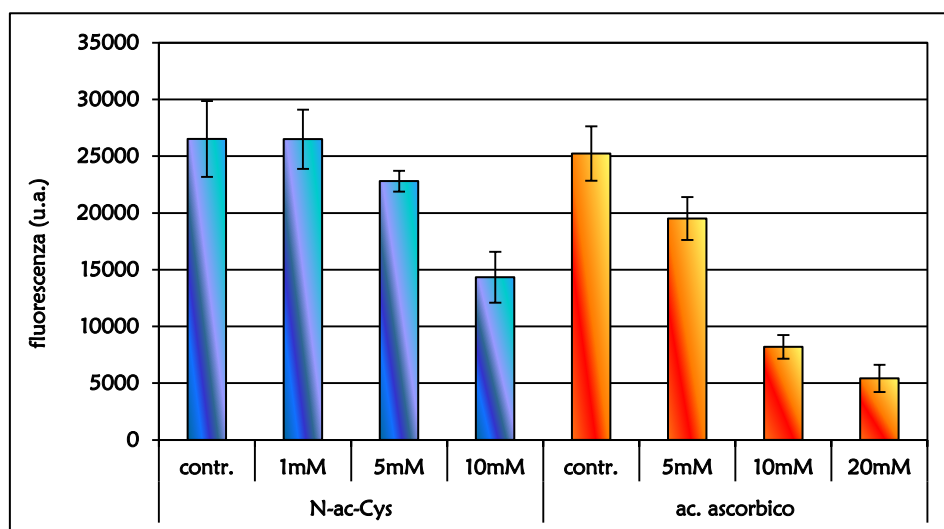


Fig. 13: Effetto di N-acetil-cisteina e acido ascorbico sull'accumulo di AF. N-ac-cys e ac. ascorbico sono stati aggiunti a colture del ceppo tossigeno Pie10+ in terreno CLM al momento dell'inoculo. La lettura della fluorescenza è stata effettuata dopo 6 giorni di incubazione (25°C). La deviazione standard è calcolata su 3 repliche per campione.

La discrepanza rispetto al dato riportato in letteratura, in cui l'abbattimento di aflatossina nei campioni trattati supera il 90%, potrebbe dipendere dalle diverse condizioni e dal mezzo di coltura utilizzato, che nello studio di Huang *et al.*

(2008) è un terreno sintetico (A&M Medium) classicamente usato per ottenere aflatossina da colture sommerse (Adye and Mateles, 1964). Definire la precisa composizione di un qualsiasi terreno a base di cocco è particolarmente difficile, poiché la ricchissima composizione chimica dell'endosperma secondario (acqua) e della polpa è influenzata sia dalla varietà che dallo stadio di maturazione del frutto; inoltre la composizione del suolo e alcuni fattori ambientali ne influenzano il profilo chimico (Yong *et al.*, 2009). In questo caso, probabilmente, il minor accumulo di aflatossina ottenuto in A&M Medium rispetto al CLM ha aumentato la forbice di abbattimento dovuto all'aggiunta di antiossidanti nel terreno.

Il tentativo di ottenere ulteriori informazioni sulla cinetica di azione di N-ac-Cys durante le diverse fasi di crescita del fungo e di biosintesi della tossina ha però portato a risultati inconcludenti. Il composto, infatti, presenta una naturale fluorescenza che interferisce con la valutazione di quella AF-specifica nei primi stadi della coltura, mascherando così un eventuale effetto esercitato dalla sostanza in questa fase. Dati interessanti sono stati invece ottenuti grazie a due diversi esperimenti in cui è stata valutata l'azione dell'acido α -lipoico (LA), un altro noto antiossidante (Packer *et al.*, 1995). L'incremento della fluorescenza di una coltura in CCM del ceppo afl^a Fri2⁺ è stata monitorata a intervalli regolari, e confrontata con la variazione di concentrazione di aflatossina nel terreno di crescita del ceppo in presenza di LA 1mM (fig. 14-A). La presenza di LA nel terreno risulta efficace nel mantenere il livello di aflatossina a valori pressoché nulli fin dopo le 97h dall'inoculo, quando la fluorescenza del controllo raggiunge le 25000u.a. (unità arbitrarie) e la fluorescenza dei trattati appena le 1800. L'ispezione visiva delle colture durante l'incubazione evidenzia un lieve ritardo nella sporificazione del micelio dei campioni trattati, indicando che l'ac. lipoico potrebbe avere un effetto negativo sulla germinazione e/o sulla fase iniziale dello sviluppo se somministrato durante i primi 2 giorni di crescita. Seguendo una coltura equivalente è stato quindi analizzato l'effetto del ritardo (65, 72, e 89h dopo l'inoculo) dell'aggiunta di antiossidante. In assenza di LA, la fluorescenza inizia ad aumentare nell'intervallo di tempo compreso tra le 65 e le 72h di

incubazione. L'aggiunta di LA a 65h arresta la produzione di aflatoossina almeno per le seguenti 35h di incubazione (fig. 14-B). Superate le 72h dall'inoculo, LA non è in grado di arrestare la biosintesi di AF; dopo 89h di crescita, la somministrazione di LA blocca completamente il rilascio della tossina nel terreno.

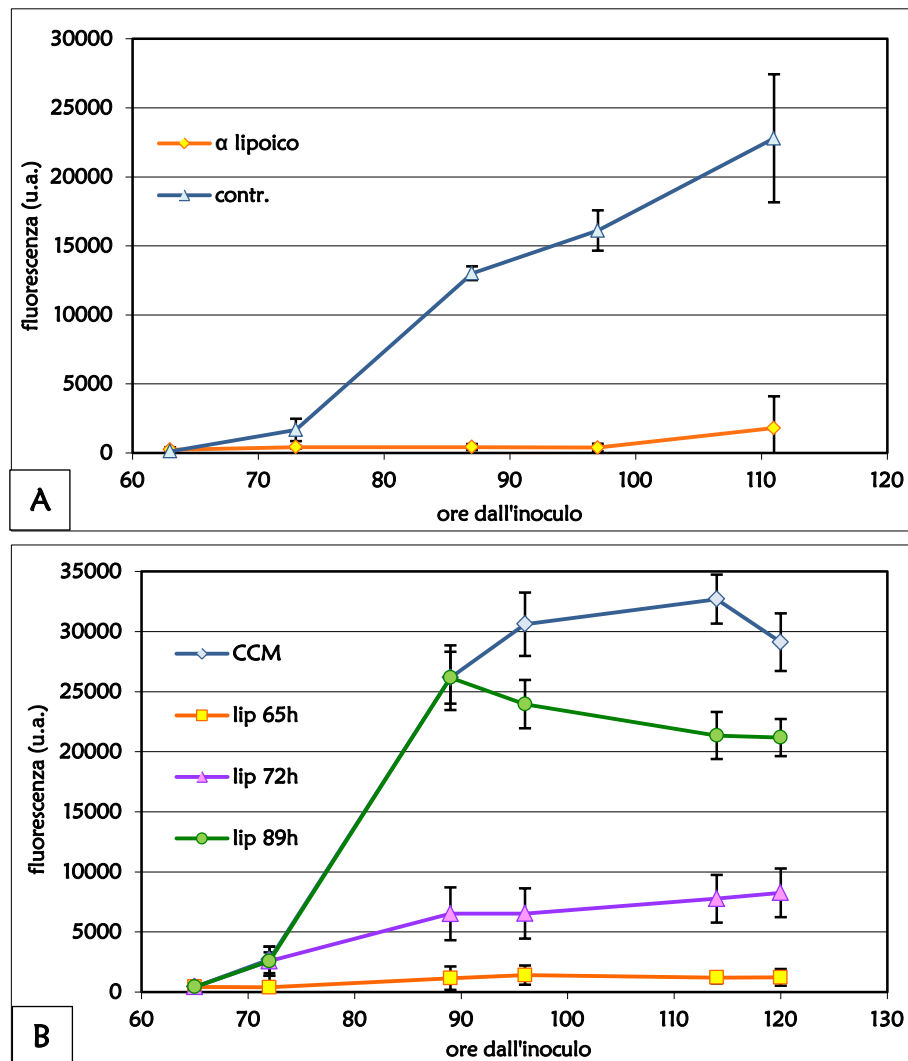


Fig. 14: Effetto dell'ac. α -lipoico sull'accumulo di aflatoossina. Conidi del ceppo tossigeno Fri2+ sono stati inoculati in CCM alla concentrazione di 2.5×10^2 spore/pozzetto. L'ac. α -lipoico è stato aggiunto al terreno alla concentrazione 1mM. La fluorescenza è stata registrata a intervalli regolari a partire dalle 63h dopo l'inoculo. **A)** Effetto della somministrazione al momento dell'inoculo. **B)** Effetto del ritardo di aggiunta. Le barre di errore verticali indicano la deviazione standard calcolata su 3 repliche per campione.

L'analisi delle cinetiche di accumulo dimostra che la capacità dell'ac. α -lipoico di prevenire la biosintesi di AF è limitata, nelle nostre condizioni sperimentali, ad un intervallo di tempo compresa tra 0 e 65h; l'aggiunta di LA a culture che hanno già iniziato a produrre tossina non è efficace nel bloccare l'accumulo, anche se la concentrazione è drasticamente abbattuta. Tuttavia, altri risultati qui non riportati suggeriscono che la forza di questo effetto probabilmente è ceppo-dipendente. Quando la somministrazione avviene nella fase tardiva del processo di biosintesi di aflatossina, invece, l'LA sembra recuperare la sua capacità di bloccare l'accumulo nel terreno. Questa complessità di effetti della sostanza nelle diverse fasi di accrescimento/biosintesi della tossina non ha attualmente una spiegazione, ma apre ovviamente la strada ad ulteriori indagini.

Una valutazione dell'effetto ritardante sulla crescita di *A. flavus* è stata condotta confrontando la velocità di germinazione e di sviluppo del micelio in terreno YES 5% liquido addizionato con LA (1mM) rispetto ad un controllo; le colture in micropiastra sono state monitorate ogni ora nell'arco compreso tra le 8h e le 18h dopo l'inoculo. Le immagini sono state acquisite dal fondo dei pozzetti con un Digital Microscope Imager Microscope Accessory (Celestron, LLC. Torrance, CA, USA) applicato all'oculare di un microscopio ottico rovesciato (fig. 15). Fin dalle prime ore, la presenza di LA nel terreno determina un ritardo visibile nella germinazione dei conidi rispetto alla coltura di controllo (fig. 15-A,B); questo ritardo si protrae per tutto il periodo di osservazione: nonostante lo sviluppo della coltura trattata prosegua e la vitalità dei conidi non sembri in alcun modo alterata dall'antiossidante, la formazione del network di micelio che si forma in assenza di LA, a parità di tempo dopo l'inoculo, è visibilmente più consistente se confrontato con quello del trattato (fig. 15-C,D,E,F). L'osservazione pertanto conferma, e probabilmente giustifica, il ritardo nella sporificazione delle colture trattate con LA negli esperimenti discussi in precedenza.

Oltre al contributo che questi dati possono fornire alla progettazione di possibili strategie per il contenimento della contaminazione da AF, l'approccio sopra descritto può essere utilizzato anche per eseguire esperimenti comparativi di

profiling utili per indagare i network di regolazione che controllano l'aflatossinogenesi (Reese *et al.*, 2011) e per identificare enzimi e geni coinvolti nella risposta a modificazioni del rapporto ossidanti/antiossidanti nella cellula.

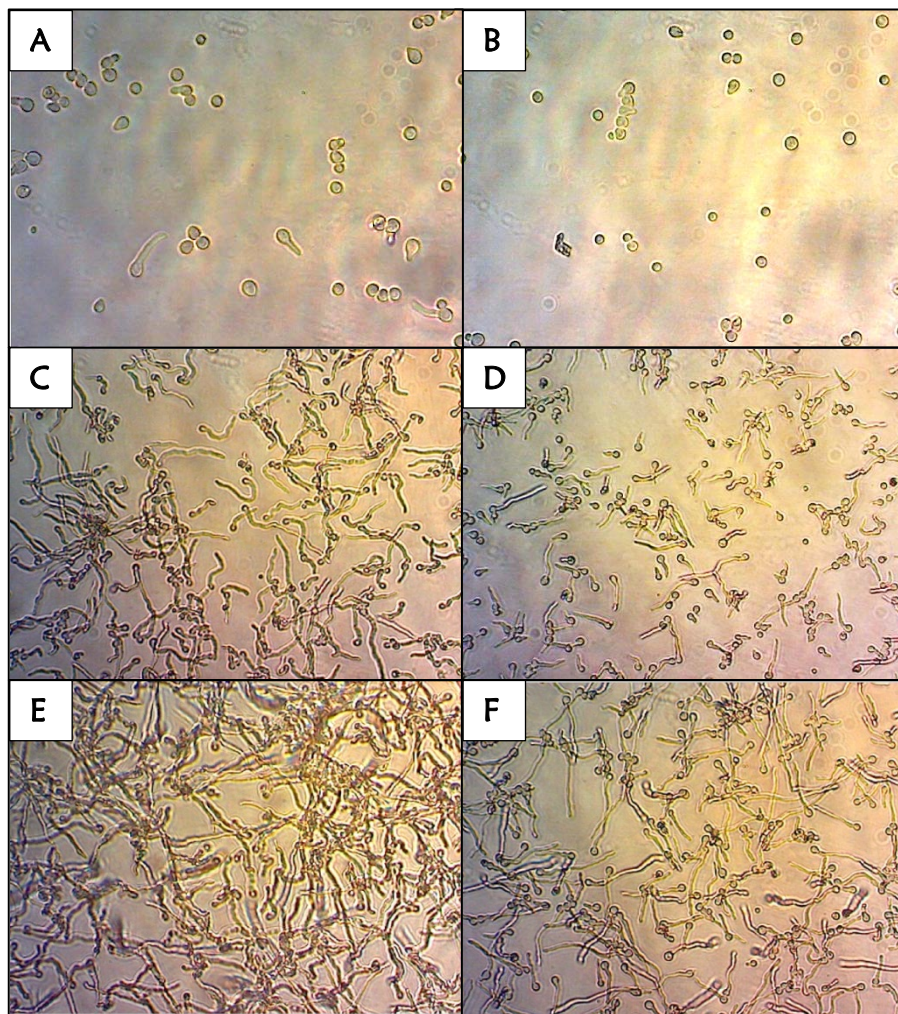


Fig. 15: Effetto dell'ac. α -lipoico sulla germinazione e sullo sviluppo di *A. flavus*. Conidi del ceppo tossigenico Fri2+ sono stati inoculati in YES 5% liquido alla concentrazione di 5×10^4 spore/pozzetto. L'ac. α -lipoico è stato aggiunto al terreno alla concentrazione 1mM (A-D-F). L'acquisizione delle immagini (A-B: 200x; C-D-E-F: 100x) è stata ottenuta dopo 10h (A-B), 15h (C-D) e 18h (E-F) dall'inoculo (25°C).

2.2 Effetto di estratti organici di piante curative

La medicina tradizionale si basa da secoli sull'uso di piante, o parti di esse, per trattare i sintomi o gli agenti eziologici di numerosissime patologie; quasi ad ogni specie vegetale è attribuito un qualche potere curativo. Le proprietà terapeutiche di molte piante sono infatti tradizionalmente note agli uomini che, fin dai primordi della civiltà, non avendo a disposizione nessun altro rimedio "terapeutico", le hanno utilizzate sulla base di osservazioni, esperienze e coincidenze come erbe curative, e come tali ci sono state tramandate. Il termine "medicina tradizionale", del resto, descrive l'insieme di conoscenze, pratiche, metodi, e credenze di una determinata popolazione, basate su osservazioni ed esperienze, trasmesse di generazione in generazione, atte a prevenire ed eliminare squilibri fisici, mentali e sociali per mantenere il benessere dei singoli individui (Istituto Superiore di Sanità). Nel corso degli anni le basi scientifiche (chimiche e biologiche) dell'attività farmacologica di numerose piante/estratti impiegati nella medicina popolare sono state confermate da studi di fitochimica e clinica moderna; inoltre, nonostante l'enorme varietà delle specie vegetali e la complessità chimica degli estratti stessi la ricerca di nuovi composti naturali biologicamente interessanti è fortemente incentivata da interessi (soprattutto economici) riguardanti non solo il settore farmaceutico, ma anche l'ambito nutraceutico e cosmetico.

Citrullus colocynthis L. Schrader è una pianta annuale, appartenente alla famiglia delle cucurbitacee, che cresce nelle zone aride e semi-aride. Originaria dell'Asia e dell'Africa tropicale, è ormai ampiamente distribuita anche nella regione fitogeografica arabo-sahariana e nelle zone desertiche del bacino del Mediterraneo (in Italia ne è nota solo una piccola popolazione situata nelle Eolie, sull'isola di Vulcano). A causa del suo contenuto ricco di glucosidi come la colocynthina, la polpa del frutto è un efficace lassativo ed un ottimo depurativo, ma vengono riconosciute proprietà farmacologiche (anti-infiammatorie, anti-diabetiche, analgesiche, abortive, anti-epilettiche, etc.) anche ad altre parti della pianta; tradizionalmente, estratti e derivati di *C. colocynthis* sono utilizzati nella

medicina popolare tunisina per il trattamento di numerose malattie: dai reumatismi all'artrite, dall'ipertensione alla bronchite, dalle mastiti fino, addirittura, al cancro. Alcuni estratti acquosi e acetonicici ottenuti da tessuti diversi di piante di *C. colocynthis* (semi, foglie, frutti e radici) provenienti dal sud della Tunisia (Mednine) hanno mostrato marcate proprietà antiradicaliche ad ampio spettro nei test di attività antiossidante *in vitro* (Marzouk *et al.*, 2010); grazie ad una collaborazione con la Dott.^{ssa} B. Marzouk del Laboratoire des Maladies Transmissibles et Substances Biologiquement Actives dell'Università di Monastir (Tunisie), abbiamo potuto testare una batteria di estratti organici, non ancora saggiati, per la capacità di interferire nell'accumulo di aflatossina in colture di *A. flavus* in ragione di una loro probabile attività antiossidante.

La procedura di coltura in micropiastre è stata quindi sfruttata per individuare eventuali effetti inibitori o modulanti da parte di concentrazioni crescenti (0-500µg/ml) di estratti di foglia e stelo, ottenuti con 4 solventi organici diversi (cloroformio, CHL; etere di petrolio, PE; etil-acetato, EA; metanolo, MET), sull'accumulo di aflatossina da parte del ceppo forte produttore Fri2+. Tra gli estratti di stelo, alla dose più bassa (50µg/ml) solo quello in cloroformio mostra un effetto, peraltro molto lieve, nel limitare la quantità di tossina nella coltura, mentre l'effetto si amplifica notevolmente alla concentrazione di 100µg/ml di tutti gli altri estratti (fig. 16-A); di tutt'altra portata si dimostra invece l'efficacia di contenimento degli stessi estratti quando somministrati alla concentrazione più alta: la presenza di 500µg/ml nel terreno è in grado di abbattere la concentrazione di aflatossina al 12% nel caso più efficace (CHL), e intorno al 50% nel caso meno efficace (MET).

Gli estratti di stelo non mostrano la stessa capacità di inibizione: nonostante alla dose di 100µg/ml tutti e quattro riescano a ridurre la concentrazione di aflatossina del 20% come osservato nel caso degli estratti di foglia, diversamente da questi la concentrazione 500µg/ml riesce a dimezzare l'accumulo di tossina (fig. x-B); risulta però curioso che contrariamente ai dati precedenti la riduzione più significativa, seppur di poco, è a carico dall'estratto in EA (riduzione del 50% per CHL e PE, del 53% per MET, del 60% per EA).

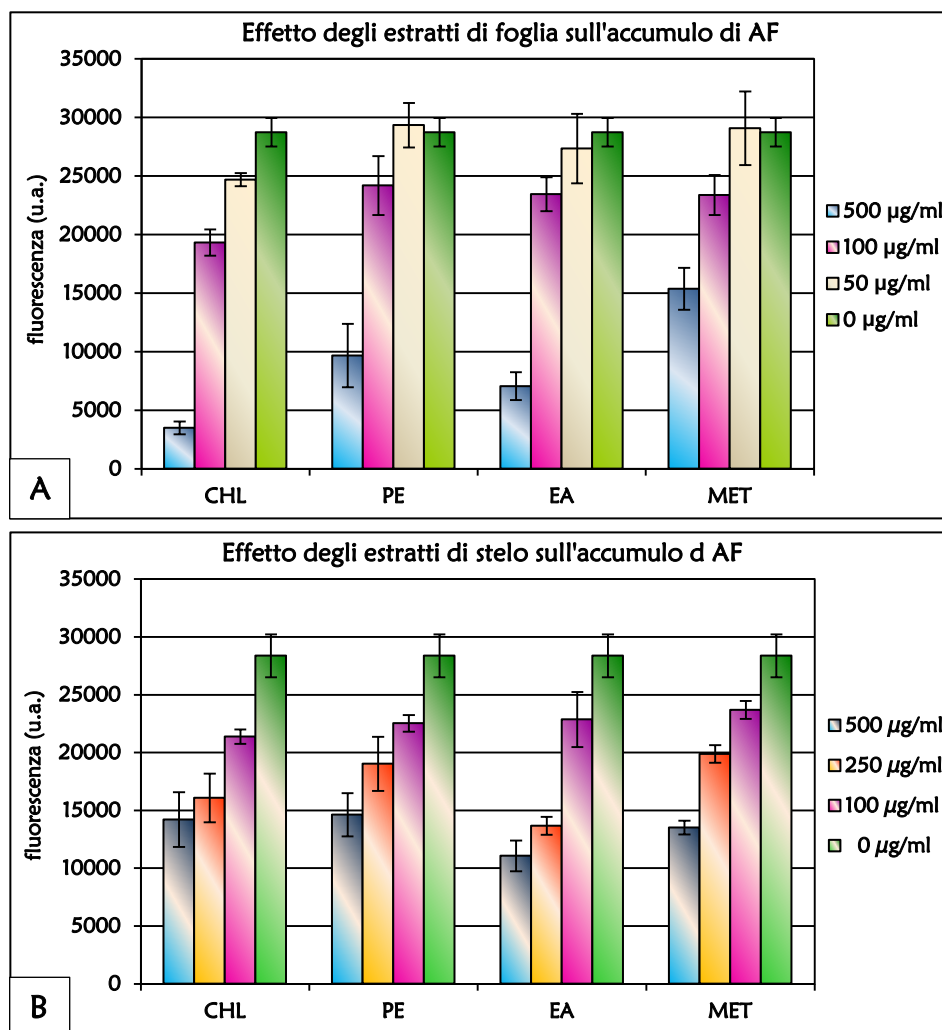


Fig. 16: Accumulo AFB in presenza di estratti organici di *C. colocynthis*. Gli estratti di **A)** foglia e **B)** stelo sono stati solubilizzati in EtOH e aggiunti, al momento dell'inoculo, ad una coltura CCM di Fri2+ in concentrazioni crescenti (0-500µg/ml w/v finali). In questo caso l'accumulo di AF è stato rilevato all'end point della coltura (146h). I valori di fluorescenza sono stati normalizzati. La deviazione standard è calcolata su 6 repliche.

Dovendo escludere le comprovate proprietà antimicrobiche di *C. colocynthis* (Marzouk *et al.*, 2009; Marzouk *et al.*, 2010; Hsouna and Alayed, 2012) come causa prima dell'effetto inibitorio osservato, *A. flavus* è stato sottoposto ad un saggio di accrescimento in terreno YES 5% in presenza di ciascun estratto alla concentrazione più alta utilizzata nelle prove di abbattimento di aflatossina. La scelta di condurre le prove di crescita in un terreno diverso da quello di cui ci si è

serviti negli esperimenti in micropiastra dipende dalla torbidità caratteristica del CCM agarizzato, che non permette l'individuazione precisa del margine di accrescimento della colonia.

campione	foglia	stelo	radice
Controllo (Yes)	0.43±0.13	0.46±0.10	0.46±0.10
Controllo (EtOH)	0.44±0.09	0.47±0.08	0.47±0.08
CHL 500µg/ml	0.44±0.11	0.45±0,11	0.45±0.13
PE 500µg/ml	0.42±0.10	0.45±0,11	0.48±0.09
EA 500µg/ml	0.46±0.08	0.39±0,15	0.43±0.08
MET 500µg/ml	0.43±0.10	0.44±0.10	0.43±0.09

Tabella 1: Effetto degli estratti organici di *C. colocynthis* sulla crescita di *A. flavus*. La crescita è riportata come accrescimento radiale (cm/giorno) di una colonia di Fri2+, misurato giornalmente sul retro della piastra di inoculo, a partire dal secondo giorno. Nel controllo (EtOH) l'etanolo è portato alla stessa concentrazione finale in cui si trova nei terreni addizionati con gli estratti. La deviazione standard è calcolata su 6 repliche.

Nessuno degli estratti saggiati, provenienti da foglia, stelo e radice, ha mostrato una attività antifungina o fungistatica apprezzabile nei confronti del ceppo aflatossigenico Fri2+ di *A. flavus* (tab. 1). Ne consegue che l'abbattimento dei livelli di aflatossina osservato non sembra dovuto ad una riduzione nella massa di micelio delle colture trattate.

Gli erboristi riferiscono spesso di preparazioni acquose ottenute principalmente da tessuti vegetali freschi, scelta legata alle tradizioni culturali e tecnologiche delle popolazioni tribali a cui ci si riferisce per l'uso etno-medico delle piante in esame. Gli estratti vegetali ottenuti con solventi organici, tuttavia, sono biologicamente molto più attivi rispetto agli estratti acquosi. L'estrazione organica permette una separazione dei principi attivi dai tessuti mediante solventi selettivi, che solubilizzano i composti con polarità simile. I prodotti così ottenuti dalle piante di interesse (o da parti di esse) sono miscele relativamente complesse di

metaboliti, di cui solo un'analisi chimica molto fine e accurata potrà in seguito determinare la reale composizione (Tiwari *et al.*, 2011). La differenza nella capacità di inibire l'accumulo di aflatossina riscontrata tra i diversi solventi organici non dovrebbe dunque sorprendere, poiché è ragionevole ritenere che, secondo polarità, i solventi abbiano solubilizzato composti differenti, il cui effetto sulla biosintesi di tossina potrebbe essere diverso. In uno studio il cui oggetto era la determinazione della composizione, in termini di fenoli e flavonoidi, di estratti di radice di *C. colocynthis*, è stato dimostrato che l'etil-acetato si è rivelato un solvente migliore per l'estrazione rispetto al metanolo (Hsouna and Alayed, 2012). È interessante notare che tra i composti fenolici principali individuati sono stati caratterizzati l'acido oleico, l'acido linoleico e l'acido ferulico, le cui proprietà antiossidanti sono state ampiamente descritte (Toda *et al.*, 1991; Graf, 1992; Lee *et al.*, 1998); questo dato collima con i risultati ottenuti in questa sede, poiché gli estratti in etil-acetato sia di foglia che di stelo sono risultati più efficienti nell'abbattere l'accumulo di aflatossina rispetto ai corrispondenti in metanolo.

Anche in questo caso la procedura in multipozzetto è stata utilizzata per seguire l'effetto degli estratti sulla cinetica di rilascio di AF in CCM da parte di *A. flavus*. In questa sede sono stati riportati solo i risultati relativi agli estratti di radice (fig. 17). Il monitoraggio della fluorescenza è iniziato dopo 68 ore dall'inoculo, quando nel terreno del controllo i valori di lettura indicavano che l'accumulo di tossina era già cominciato. Come osservato anche nel caso dell'acido α -lipoico (vedi: fig. 14), la presenza di estratto CHL nella coltura influenza negativamente la sintesi di aflatossina fin dai primi stadi della crescita, arrivando, alla concentrazione di 500 μ g/ml, a mantenere i livelli di fluorescenza vicini allo zero. Seppur non così marcato, l'effetto sembra ripetersi a tutte le concentrazioni di estratto: al termine del periodo di incubazione il dosaggio HPLC dei campioni con estratto 250 μ g/ml e 100 μ g/ml mostra un abbattimento rispettivamente del 65 e del 46% rispetto al controllo (fig. 18). Quella che le curve di fluorescenza dei trattati descrivono è l'evidente anticipazione, dalle 92 alle 75h, del raggiungimento del plateau di biosintesi dell'aflatossina (fig. 17-A). La velocità di

questo shift sembra dipendere dalla concentrazione dell'estratto. Lo stesso comportamento è stato riscontrato nei trattati con l'estratto in etil-acetato (fig. S1-B). L'estratto metanolico non sembra invece possedere un ugual potere di contenimento (fig. 17-B): a nessuna delle concentrazioni si può infatti osservare un azzeramento dell'accumulo, anzi, l'andamento e i valori di fluorescenza del trattato con 500 μ g/ml ricalcano quelli ottenuti con la concentrazione 100 μ g/ml in CHL. Concentrazioni inferiori hanno dato risultati ancora meno interessanti. L'estratto in PE ha dimostrato un comportamento intermedio (fig. S1-A).

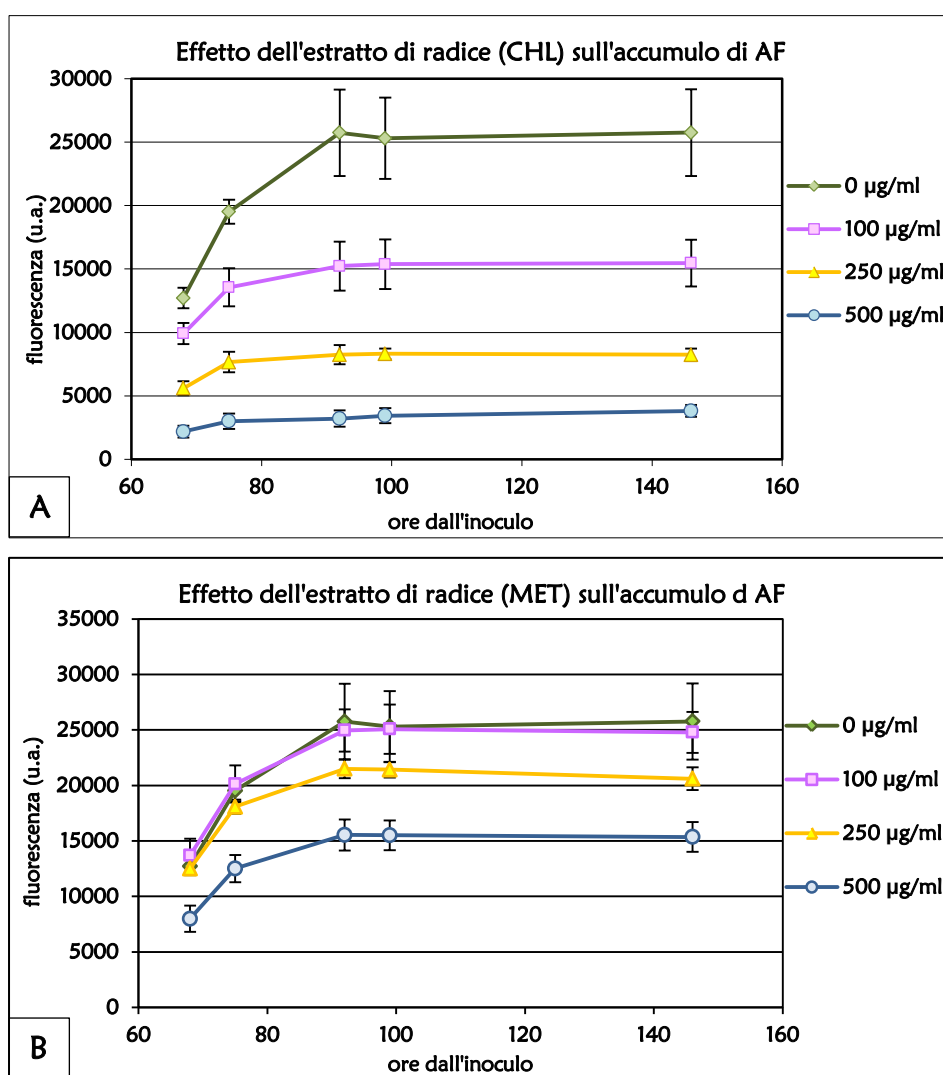


Fig. 17: Cinetica di accumulo di AF in presenza di estratti organici di radice di *C. colocynthis*. Gli estratti organici sono stati solubilizzati in EtOH e aggiunti, al momento dell'inoculo, ad una coltura CCM di Fri2+ in concentrazioni crescenti (100-500 μ g/ml w/v finali). Le curve corrispondono alla cinetica di accumulo AF in presenza degli estratti organici in **A)** cloroformio (CHL); **B)** metanolo (MET).

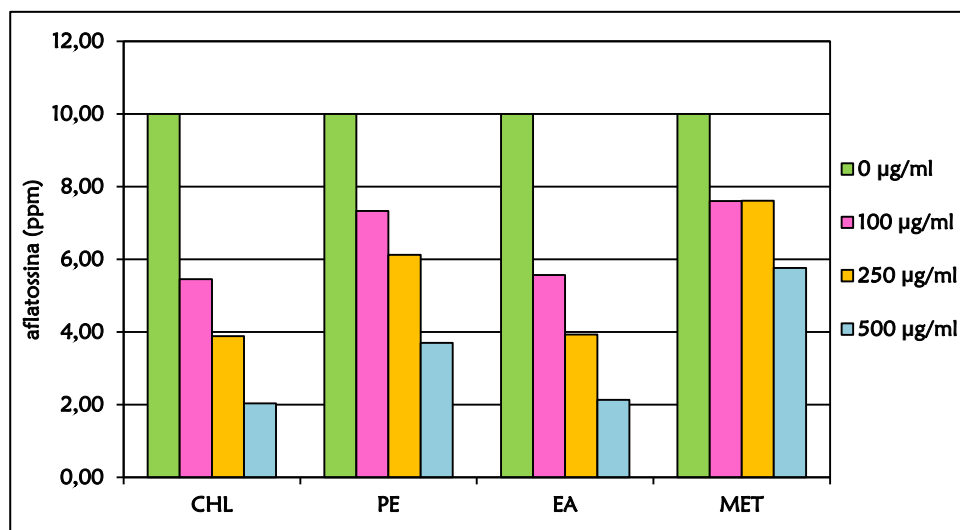


Fig. 18: Effetto di estratti organici di radice di *C. colocynthis* sull'accumulo di AFB₁. La determinazione è stata condotta con HPLC sui campioni degli esperimenti riportati in fig. 17-B; il dosaggio è stato effettuato al termine del periodo di incubazione (146h). Cloroformio (CHL), etere di petrolio (PE), etil-acetato (EA) e metanolo (MET).

Per capire se esiste un momento in cui la somministrazione dell'estratto di radice in CHL è più efficace ed individuare la finestra temporale corrispondente è stato riproposto l'esperimento di aggiunta ritardata già discusso nel caso dell'acido α -lipoico. I risultati mostrano che l'effetto inibitorio osservato nelle cinetiche di accumulo si verifica solo se la somministrazione avviene prima delle 63h dopo l'inoculo, l'aggiunta risulta invece inefficace se interviene dalle 72h in avanti (fig. 19). Questo evidenzia che affinché l'effetto delle componenti attive dell'estratto sia efficiente, queste devono essere presenti nella coltura già durante le primissime fasi dello sviluppo del micelio, forse addirittura durante la fase della germinazione. Poiché le prove di accrescimento radiale in presenza degli estratti non hanno evidenziato nessun effetto di rallentamento della crescita della colonia fungina matura, e l'ispezione visiva delle microcolture in piastra durante il periodo di incubazione non ha mostrato alcuna alterazione visibile del livello di maturazione e sporificazione delle stesse, è chiaro che se interviene una

qualche alterazione durante lo sviluppo del microrganismo questa è con molta probabilità confinata ai primissimi processi metabolici che si attivano con la germinazione dei conidi.

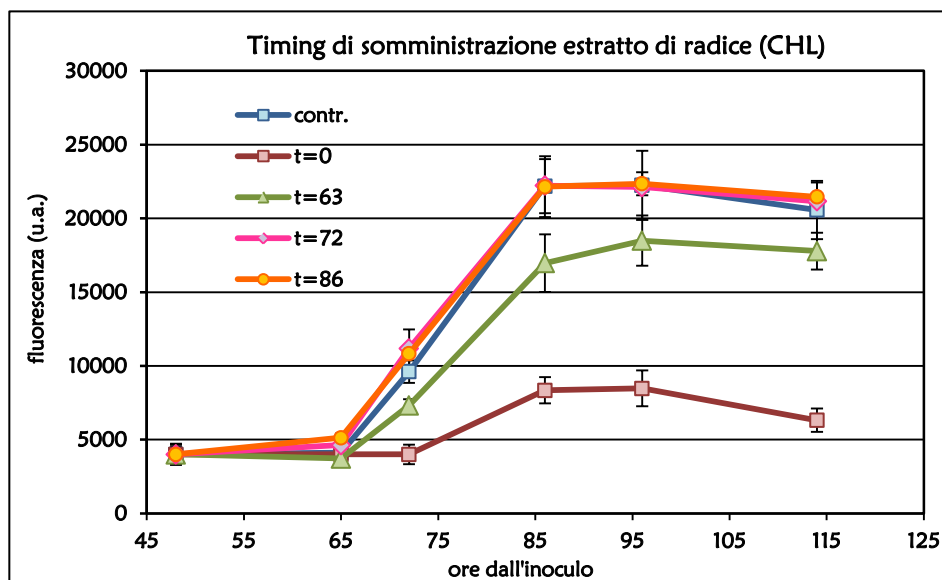


Fig. 19: Effetto del tempo di somministrazione dell'estratto CHL di radice sull'accumulo di AF. La determinazione è stata condotta su una coltura di Fri2+ in terreno CCM; gli estratti sono stati somministrati dopo 63h, 72h e 86h dopo l'inoculo. L'accumulo è stato monitorato dalle 48h alle 114h.

Tutti gli estratti dei tre tessuti (radice, stelo e foglia) mostrano una forte attività antiossidante dose-dipendente, ma i risultati sono diversi per ciascun organo a seconda dell'estratto somministrato. Tra tutti, quello metanolico è l'estratto con minor attività inibitoria verso l'accumulo di aflatossina: le nostre osservazioni *in vivo* concordano con quanto riportato da altri ricercatori per i tessuti di seme e frutto (Marzouk *et al.*, 2011), i cui estratti in metanolo hanno mostrato la minor attività antiossidante *in vitro*. *A. flavus* si è quindi dimostrato un buon sistema modello per saggiare l'attività antiossidante di estratti vegetali complessi; I risultati ottenuti, inoltre, possono concorrere a fornire una visione più completa del meccanismo di azione degli antiossidanti nei confronti di *A. flavus*, definendo

il ruolo che le sinergie tra più composti possono ricoprire nell'interferire con la biosintesi di aflatossina.

Le applicazioni potrebbero essere molteplici, soprattutto per quel che riguarda la ricerca di nuovi principi attivi. Alla base di molti farmaci di quella che viene definita la “medicina moderna” si trovano estratti naturali, come ad esempio molti antibiotici, alcuni antitumorali, vari cardiotonici ecc. Da tempo il mondo scientifico sta considerando i prodotti naturali quale potenziale approccio terapeutico alternativo e/o sinergico per il trattamento di alcune patologie croniche e acute: la ricerca è oggi rivolta soprattutto a nuove sostanze e/o composti sicuri ed efficaci contro il dolore, l'infiammazione, o in possesso di una qualche attività antimicrobica, antitumorale o immunomodulante. In particolare nell'ambito delle sostanze vegetali, i contributi acquisiti e in via di acquisizione potranno fornire, partendo dalla valutazione delle attività biologiche del fitocomplesso e dall'identificazione dei principali componenti attivi, basi utili per la sperimentazione di nuove sostanze, da usarsi sia autonomamente che in combinazione con farmaci già impiegati nella pratica clinica. Secondo il WHO Traditional Medicine Program, dei 122 composti naturali identificati fino a oggi e utilizzati come principi attivi nella farmaceutica moderna, l'80% viene utilizzato per le stesse finalità etnomediche nella medicina tradizionale. Poiché questi composti derivano in tutto da 94 specie di piante, e solo tra le Angiosperme se ne contano più di 250.000, è chiaro che il numero di potenziali farmaci ancora da scoprire è enorme.

In quest'ottica, il presente lavoro dimostra che, se impiegati nella procedura ad alta resa descritta, ceppi tossigeni di *A. flavus* possono essere utilizzati non solo come bio-indicatori del potenziale antimicrobico/fungistatico di determinate sostanze, ma anche come sistema modello per la definizione del potenziale antiossidante di composti (sia puri che in miscela) e di estratti vegetali molto complessi. Questo potrebbe rivelarsi particolarmente utile in quei laboratori in cui si effettua lo screening sistematico delle specie vegetali con lo scopo di scoprire nuove molecole bioattive.

2.3 Effetto di estratti naturali commerciali

Il mercato dei prodotti naturali è in continua espansione: solo il comparto dei prodotti a base di erbe, dispositivi medici a base vegetale e integratori erboristici è cresciuto in dodici mesi (giugno 2010 - giugno 2011) del 12,3% rispetto all'anno precedente, con un valore complessivo di mercato di circa 2,44 miliardi di € in prezzi al pubblico (Dati IMS Health Sell Out Multichannel per Farmacia, Parafarmacia e Corner GDO + stima per gli altri canali). Nel 2011 il giro di affari dei cosmetici bio e a base *natural* è stato di 365 milioni di euro, il 3,7% rispetto ai 9,2 miliardi di tutto il settore cosmetico, con una crescita del 5,5% contro l'1,1% del mercato totale. Con il brand “green” che oggi traina la scelta del consumatore, le realtà aziendali che operano nel settore della produzione di principi attivi e materie prime derivati da piante si trovano sempre più spinte ad investire nell'identificazione e nello sviluppo di nuovi principi attivi, con particolare attenzione a tutti quei composti bio-attivi che mostrano proprietà antiossidanti. Indena®, società leader a livello mondiale nel campo della produzione industriale di derivati vegetali di alta qualità, produce estratti standardizzati di piante a cui vengono tradizionalmente riconosciute proprietà terapeutiche o salutistiche, estendendosi in un mercato che spazia dal farmaceutico alla cosmetica, dal nutraceutico all'alimentare; alcuni di questi prodotti commerciali sono stati selezionati per rientrare in una batteria di test *in vitro* volti a saggiare l'effetto delle sostanze in questione sulla biologia di *A. flavus*, e in particolare sul suo metabolismo aflatossigenico.

La ratania (*Krameria triandra*, appartiene alle Krameriaceae, piccola famiglia delle leguminose) è il nome comune di un arbusto originario delle Ande boliviane e peruviane, dove trova il proprio habitat ideale tra i 900 ed i 3000 metri di altitudine. La droga, costituita dalle radici essiccate, si caratterizza per la ricchezza in tannini condensati catechinici; per questo, gode di caratteristiche astringenti e antinfiammatorie. La radice di ratania ha dimostrato *in vitro* interessanti proprietà sia battericide che protettive nei confronti del danno indotto da ROS (Carini *et al.*, 2002); l'attività antiossidante sembra dovuta alla

forte abbondanza di tannini e neolignani a basso peso molecolare (Svobodova *et al.*, 2003). Un altro estratto dalle comprovate proprietà antiossidanti è l'estratto di semi di *Vitis vinifera* (Li *et al.*, 2008). Risospensioni in etanolo di estratti acquosi essiccati di ratania (*Krameria triandra*) e semi d'uva sono state aggiunte a colture di un ceppo afla⁺ forte produttore di aflatossina, in terreno CLM, a concentrazioni crescenti (50-250µg/ml per l'estratto di semi d'uva, 100-500µg/ml per l'estratto di ratania); al termine del periodo di incubazione è stato effettuato il dosaggio dell'aflatossina sui campioni.

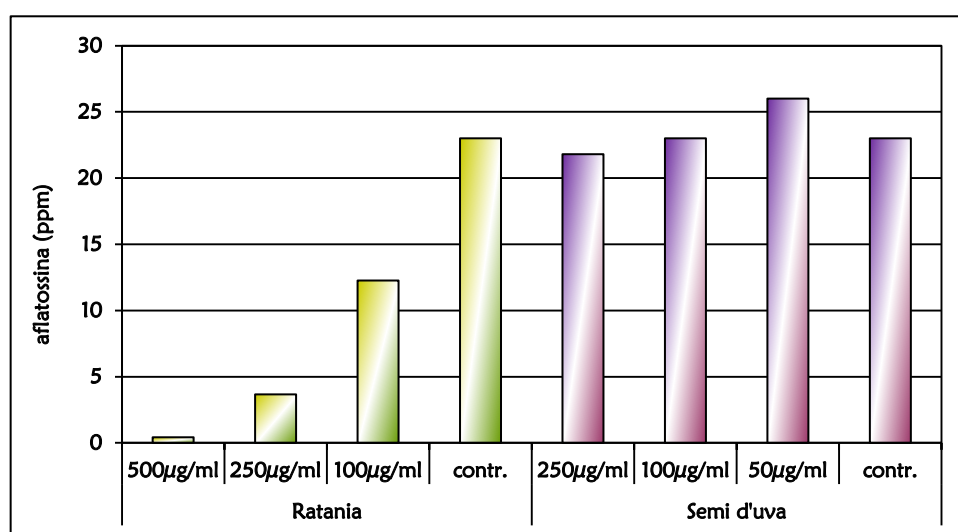


Fig. 20: Effetto degli estratti di ratania e semi d'uva sulla biosintesi di AF. Il dosaggio è stato condotto con HPLC su colture in micropiastra di Fri2+, dopo 6 giorni di incubazione a 25°C. Nel controllo l'etanolo è portato alla stessa concentrazione finale in cui si trova nei terreni addizionati con gli estratti.

L'effetto degli estratti, inizialmente scelti per le proprietà antiossidanti attribuite alla pianta d'origine, è evidentemente molto diverso (fig. 20): l'estratto di ratania abbate la concentrazione di aflatossina nelle colture in modo concentrazione-dipendente, riducendone l'accumulo dal 50% (alla concentrazione di 100µg/ml) a meno del 2% (alla concentrazione di 500µg/ml) rispetto al controllo. Al contrario, invece, l'aggiunta di estratto di semi d'uva alle

concentrazioni testate non esercita alcun effetto sulla sintesi della tossina. Nei limiti imposti dal sistema modello, mentre si può supporre che il meccanismo con cui l'estratto di ratania interferisce con il metabolismo dell'aflatossina possa essere ricondotto ad un'attività antiossidante di uno o più dei suoi componenti, l'incapacità dell'estratto di semi d'uva di raggiungere il medesimo risultato non implica che nella sua composizione chimica non vi siano principi con proprietà analoghe; il significato di questa osservazione potrebbe invece coesistere in molteplici ragioni: dalla stabilità dei principi attivi nella coltura (susceptibilità a fenomeni di ossidazione dovuti alle condizioni aerobiche), al loro grado di lipofilia e alle loro dimensioni, che possono influenzarne l'uptake nella cellula fungina. D'altra parte, se, come affermato in precedenza, è noto che durante il processo di estrazione del fitocomplesso solventi differenti estraggono classi di molecole diverse, è altrettanto noto che in ambiente alcolico i principi attivi sono molto più biodisponibili per la cellula. Per questo motivo l'analisi dell'effetto di estratto di ratania sulla cinetica di accumulo di AF in micropiastre è stata condotta in parallelo sia per estratto secco risospeso in etanolo che per estratto secco risospeso in acqua (fig. 21).

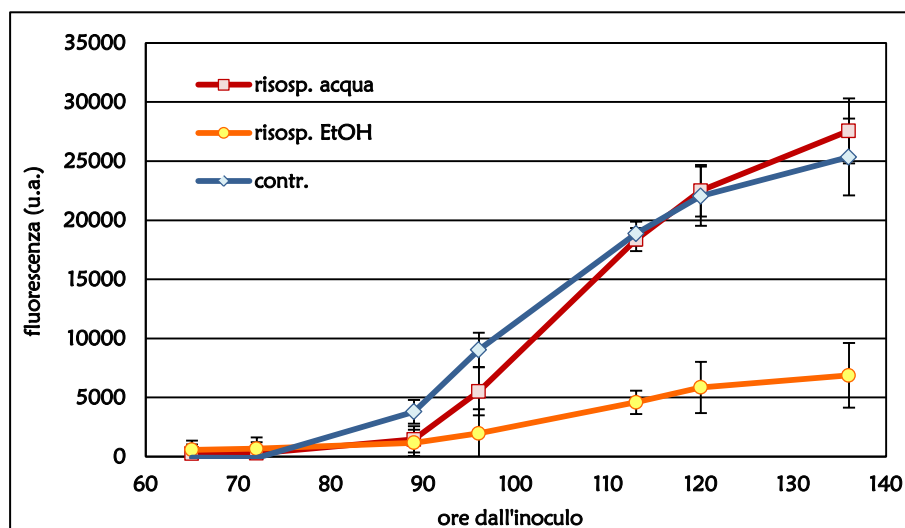


Fig. 21: Effetto di estratto acquoso secco di ratania risospeso in acqua ed etanolo sulla cinetica di accumulo di AF. La determinazione è stata condotta su una coltura di Fri2+ in terreno CCM; gli estratti sono stati somministrati alla concentrazione di 100µg/ml. L'accumulo è stato monitorato dalle 65h alle 136h di incubazione a 25°C.

Secondo le attese di una minor “efficienza” di azione, la presenza del risospeso acquoso dovrebbe determinare una situazione intermedia tra l’abbattimento del risospeso etanolic (già osservato nella prima prova di efficacia, fig 20) e il controllo non trattato; quel che si osserva, invece, è una curva di accumulo del tutto sovrapponibile al controllo: ciò indica che, qualunque sia il componente del fitocomplesso in grado di interferire con il metabolismo aflatossinico, la sua attività è compromessa dal solvente utilizzato per la risospensione (acqua). In questo senso la formulazione del terreno complesso a base di cocco potrebbe in qualche modo ostacolare il passaggio delle molecole bioattive all’interno del microrganismo: il solvente alcolico potrebbe infatti risultare più efficace nel veicolare il principio attivo attraverso la componente lipidica del CCM, favorendone l’ingresso nelle cellule del micelio.

3. ANALISI DELLA COMPETIZIONE INTRASPECIFICA

Le strategie di biocontrollo che sfruttano l'azione competitiva di ceppi atossigenici di *Aspergillus flavus* si sono dimostrate un metodo efficace per il controllo della contaminazione da aflatossine in coltivazioni come arachidi, mais e semi di cotone. La selezione di ceppi da impiegare come biocompetitori non è semplice, in quanto è difficile valutarne l'efficienza senza costose prove in campo. La selezione di buoni competitori non è semplice, poiché dipende dalla valutazione precedente di diversi fattori che interagiscono tra loro, condizionando la fitness del fungo nella relativa nicchia ecologica. Tuttavia, con esperimenti di ricostruzione in laboratorio è possibile non solo studiare i meccanismi biologici alla base dell'efficacia competitiva, ma anche ottenere indicazioni preliminari sulle potenziali performances dei ceppi nei confronti dell'ambiente in cui dovrà inserirsi. Le simulazioni di competizione intraspecifica *in vitro* descritte in letteratura fanno riferimento a colture sospese (Wicklow, 2007), in YES liquido o in terreno agarizzato (Chang *et al.*, 2007); per la stima dell'efficienza di abbattimento dell'aflatossina esse necessitano però di analisi quantitative (HPLC o TLC), per le quali è necessario estrarre la tossina e processare i campioni secondo procedure che richiedono tempo, solventi e/o specifiche forniture usa e getta dedicate (ad esempio colonnine di immunoaffinità). Questo rappresenta un notevole svantaggio se l'obiettivo è screenare un'intera popolazione di *A. flavus* alla ricerca di un buon competitore da proporre come bio-pesticida. La possibilità di progettare in una sola piastra multipozzetto intere "matrici di competizione", ossia una serie di colture parallele costituite da co-inoculi di n ceppi *afla*⁺ con n ceppi *afla*⁻, e di poter valutare il potenziale competitivo misurando la differenza di fluorescenza rispetto ai controlli fornisce pertanto uno strumento decisamente importante. La metodica può essere anche più banalmente applicata alla diagnosi di aflatossigenicità, che generalmente segue le procedure di identificazione e classificazione degli isolati naturali; in questo senso le condizioni sperimentali

della coltura in micropiastra sono particolarmente utili per individuare quei ceppi lento-produttori che possono sfuggire alla diagnosi classica di tossigenicità in terreno CAM (Degola *et al.*, 2009).

3.1 Test di competitività *in vitro*: la selezione dei buoni competitori

Con lo scopo di individuare un ceppo naturale di *A. flavus* da proporre come candidato per la formulazione di un bio-pesticida è stato valutato il potenziale biocompetitivo di isolati atossigenici, residenti sulle coltivazioni di mais della Valle del Po, nel ridurre l'accumulo di aflatossina da parte di ceppi produttori sia di collezione che provenienti dalla stessa popolazione microbica dei ceppi aflatossigenici. Da lotti di mais provenienti dalle campagne maidicole 2009 e 2010 sono stati isolati più di 140 ceppi di *A. flavus*, identificati secondo le chiavi morfologiche della micologia classica (Pitt and Hocking, 1997) e caratterizzati per aflatossigenicità, velocità di accrescimento (radial growth) e diametro degli sclerozi (appartenenza alla classe L o S). Sfruttando la procedura di coltura e diagnosi di fluorescenza in micropiastra sono state costruite diverse matrici di competizione che hanno permesso di stabilire, per ognuno degli isolati aflatossigenici, l'efficacia di contenimento dell'accumulo di aflatossina da parte del più alto numero possibile di ceppi aflatossigenici. Per confronto è stato affiancato il ceppo aflatossigenico B507 (per gentile concessione del Dr. K.C. Ehrlich), che condivide la stessa lesione genetica con il ceppo AF36 ed è già registrato come agente di bio-controllo negli Stati Uniti, e il ceppo di collezione aflatossigenico MAM13 (per gentile concessione del Dr. G. Criseo). Il livello di abbattimento viene evidenziato dalla differenza tra il valore di fluorescenza dei controlli positivi e il valore di fluorescenza delle colture miste.

In un classico esempio di matrice di competizione, 12 isolati aflatossigenici mostrano efficienze di contenimento molto diverse nei confronti dei due ceppi produttori considerati (fig. 22).

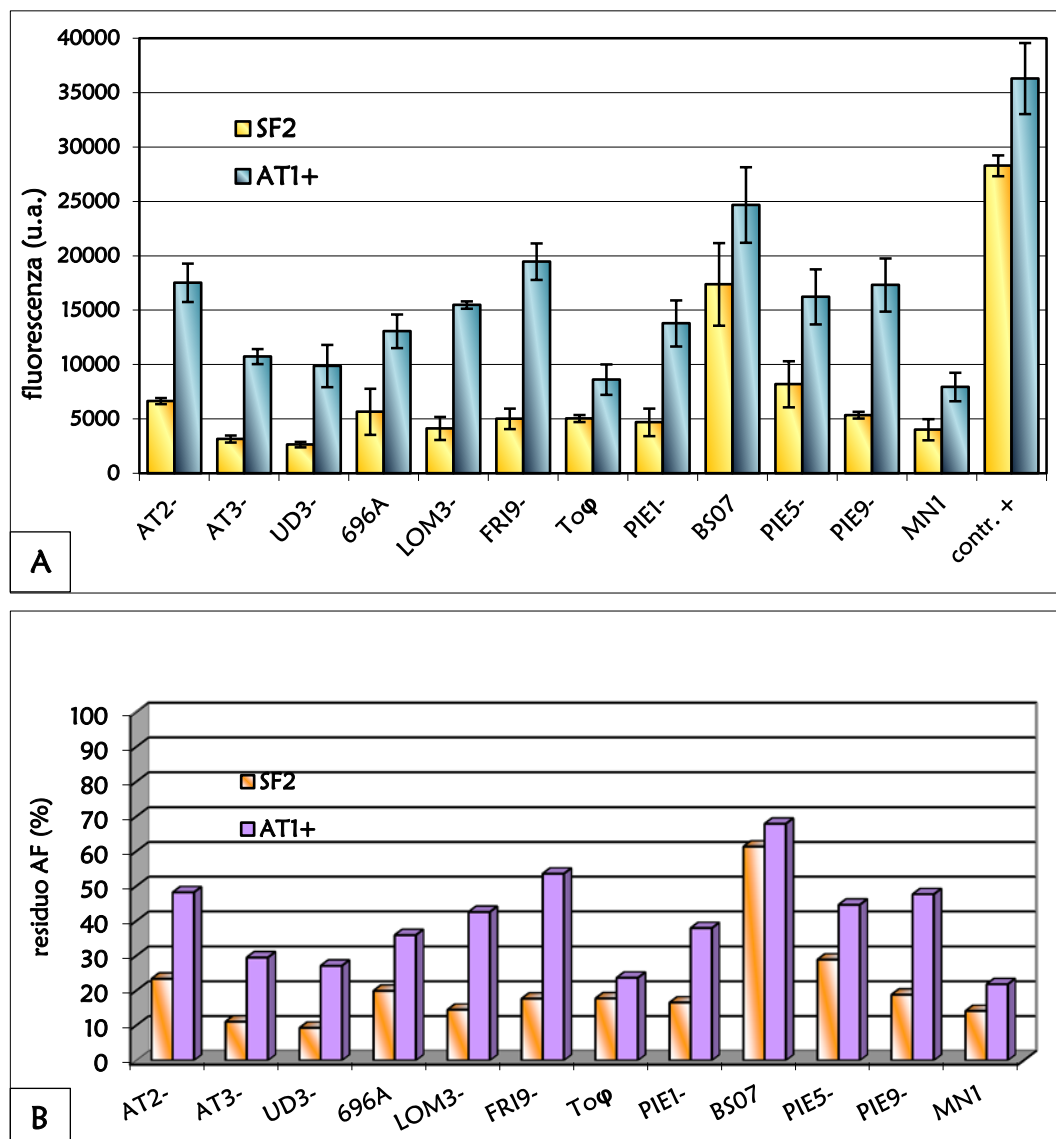


Fig. 22: Matrice di competizione. Due ceppi aflatoxigenici (il ceppo di collezione SF2 e il ceppo AT1+ isolato da mais proveniente dal Piemonte) sono messi alla prova in terreno CLM contro 12 isolati aflatoxigenici negativi provenienti da diverse zone geografiche. Nelle colture miste i conidi sono inoculati nel rapporto di 1:1, alla concentrazione finale di 10^3 spore/pozzetto ($200\mu\text{l}$ di coltura). La concentrazione delle spore nei relativi controlli è pari a 5×10^2 spore/pozzetto. La lettura della fluorescenza avviene dopo 6 giorni di incubazione a 25°C . La deviazione standard è calcolata su 3 repliche per campione. **A)** Confronto tra i livelli (normalizzati) di lettura delle competizioni e i relativi controlli. **B)** Stima dell'aflatossina residua nelle colture miste calcolata come percentuale di fluorescenza rispetto ai controlli.

L'osservazione che tra questi B507 si comporti come il peggiore sostiene l'esigenza di selezionare i buoni competitori da applicare ad una certa zona geografica all'interno delle popolazioni di *A. flavus* residenti nella stessa area agricola, poiché è possibile che la fitness di un ceppo proveniente da una determinata nicchia sia insufficiente a garantirne l'efficacia una volta inserito in un contesto ecologico diverso. All'interno della batteria di isolati testati almeno 3 sono in grado di competere con SF2 con un'efficienza tale da ridurre l'accumulo di tossina del 90% (fig. 22-B). Tuttavia, solo 2 (TOφ e MN1) di essi ottengono un contenimento pari o superiore all'80% con entrambi i ceppi afl^a (fig. 22-B). La variabilità del potenziale di biosintesi da parte di SF2 e AT1+ sembra riflettere la variabilità del potenziale competitivo dei ceppi afl⁻, suggerendo una relazione tra l'efficienza di abbattimento del competitore e il livello di aflatossina prodotta dal ceppo afl⁺; anche se non può ancora essere completamente esclusa, i risultati dei numerosissimi test di competitività *in vitro* analizzati tendono a farci scartare questa ipotesi, almeno per quanto riguarda gli isolati della nostra ceppoteca. Durante lo screening condotto sulle popolazioni di *A. flavus* isolate da colture di mais del nord (Trentino, Veneto, Piemonte, Emilia Romagna, Friuli, Lombardia) e del sud Italia (Puglia, Sardegna) solo TOφ e MN1 si sono dimostrati efficaci nell'abbattere pesantemente l'accumulo di aflatossina da parte di quasi tutti gli isolati afl⁺ testati. E' interessante sottolineare che nonostante dal lotto di granella proveniente dalla provincia di Torino siano stati recuperati diversi isolati afl⁻, TOφ è l'unico a possedere un tale potenziale competitivo.

L'efficienza nell'abbattere la contaminazione determinata dalla presenza sulle colture di più ceppi positivi è senz'altro legata alla capacità di un singolo ceppo negativo di competere con il maggior numero possibile di isolati. Anche se auspicabile, è tuttavia poco plausibile che un solo ceppo sia in grado di fronteggiare efficacemente l'intera popolazione di *A. flavus* residente su una particolare coltivazione, ed è ancor meno plausibile che sia in grado di competere con la stessa efficacia contro ceppi di regioni diverse e lontane tra loro. Una risposta a questo problema potrebbe venire dall'uso di miscele di buoni competitori, che potrebbero garantire un spettro maggiore di azione. Per

valutare la possibilità che alcuni isolati possano ampliare lo spettro di competitività di TO ϕ e, nel caso, se sussiste un effetto sinergico, è stata costruita una matrice di competizione per confrontare l'efficienza di abbattimento di miscele di TO ϕ con gli isolati Fri7 (un isolato aflu- che aveva mostrato prestazioni migliori, rispetto a TO ϕ , nel contrastare la produzione di tossina da parte di alcuni ceppi aflu+), e Fri10 (che ha mostrato un profilo di competizione in parte sovrapponibile a quello di TO ϕ). I risultati (non mostrati in questa sede) evidenziano che utilizzando le miscele spesso non vi è un guadagno significativo rispetto alle corrispondenti competizioni singole. L'osservazione di alcune eccezioni, in cui il livello di abbattimento ottenuto con la miscela è effettivamente maggiore rispetto a quello ottenuto con i singoli negativi, porta a concludere che se un effetto sinergico tra i ceppi aflu- non è una regola generale, potrebbe esistere un qualche fattore ceppo-dipendente che migliora la resa dell'associazione tra competitori. Questa analisi rimanda ai dati ottenuti da alcuni autori di una possibile sinergia dipendente dalla capacità dei ceppi di formare o meno eterocarionti stabili (Wicklowsky and Horn, 2007).

3.2 Effetto della concentrazione di spore e del rapporto aflu+/aflu- sull'efficienza biocompetitiva.

Tra le ipotesi avanzate circa il meccanismo responsabile degli effetti della competizione intraspecifica in *A. flavus*, quella più accreditata giustifica l'abbattimento di aflatossina come il risultato di una fitness più vantaggiosa del ceppo competitore rispetto al ceppo produttore; il conflitto da parte dei due per i nutrienti del substrato porterebbe ad un maggior sviluppo del competitore, tradotto in una esclusione competitiva del ceppo aflu+. Nel caso del buon competitore TO ϕ , i dati di accrescimento non evidenziano una velocità significativamente più elevata di crescita radiale del micelio rispetto ai ceppi produttori. Una simulazione di competizione per le risorse del terreno è stata ottenuta realizzando esperimenti di co-inoculo sia in solido (CAM) che in liquido

(CLM). L'interferenza del ceppo afl⁻ nella produzione di aflatossina varia a seconda della concentrazione di spore e del rapporto afl⁺/afl⁻ nell'inoculo iniziale (fig. 23). Alla concentrazione più alta di spore considerata (10^4 conidi/pozzetto), il rapporto di abbondanza relativa afl⁺/afl⁻ (1:1, 2:1 e 4:1) non influenza in modo significativo l'efficacia del contenimento dell'aflatossina da parte di TO ϕ . Al contrario, la concentrazione di spore del co-inoculo condiziona il livello di interferenza del ceppo afl⁻ sulla produzione della tossina; questo effetto viene aggravato quando il rapporto afl⁺/afl⁻ aumenta. Il decremento della concentrazione complessiva di conidi (da 10^4 a 10^3 spore/pozzetto, e ancora più significativamente a 10^2) influisce negativamente sulla capacità del ceppo afl⁻ di contenere l'accumulo di aflatossina accumulata da SF2; l'effetto è ancora più evidente quando il rapporto di abbondanza afl⁺/afl⁻ aumenta. La concentrazione di 10^3 spore/pozzetto si è dimostrata essere la più bassa efficiente.

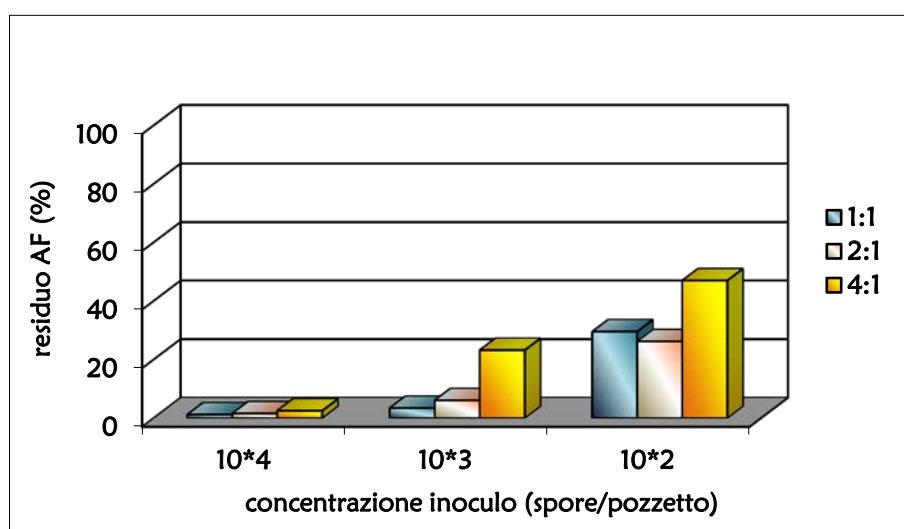


Fig. 23: Effetto della concentrazione e del rapporto afl⁺/afl⁻ sull'efficienza competitiva. Spore di TO ϕ e SF2 sono state co-inoculate in CLM a concentrazioni (10^4 , 10^3 e 10^2 conidi/pozzetto) e rapporti diversi (1:1, 2:1 e 4:1), e incubate a 25°C. L'emissione della fluorescenza è stata registrata dopo 6 giorni. L'abbattimento di aflatossina è riportato come percentuale rispetto alla fluorescenza nel controllo.

Per meglio valutare l'importanza dell' "affollamento" delle spore, e quindi del contatto tra afla⁺ e afla⁻, durante la germinazione e nelle fasi successive dello sviluppo, è stato analizzato l'effetto della distanza all'interno di coppie di spore singole inoculate con un micromanipolatore in terreno CAM. Sia quando le due spore della coppia si trovano abbastanza lontane da impedire qualunque contatto prima della germinazione (tra i 30 e 200 μm di distanza), sia quando sono a messe a contatto, si sviluppa un'unica colonia mista con una duplice morfologia (fig. 24-A); esponendo la piastra al transilluminatore UV, l'aflatossina rilasciata si manifesta come un alone di fluorescenza in corrispondenza del settore di colonia originato dalla spora afla⁺ (fig. 24-B). La particolare forma a luna crescente dell'alone indica che la maggior parte della micotossina resta confinata verso la periferia della colonia. Al contrario, quando due o tre spore afla⁻ sono co-inoculati in stretto contatto con una singola spora del ceppo afla⁺ (fig. 24-C) la riduzione della dimensione dell'area fluorescente indica che l'effetto inibitorio sull'accumulo di aflatossina aumenta notevolmente. In alcuni casi, addirittura, invece di un settore si osserva solo qualche spot sparso (fig. 24-D).

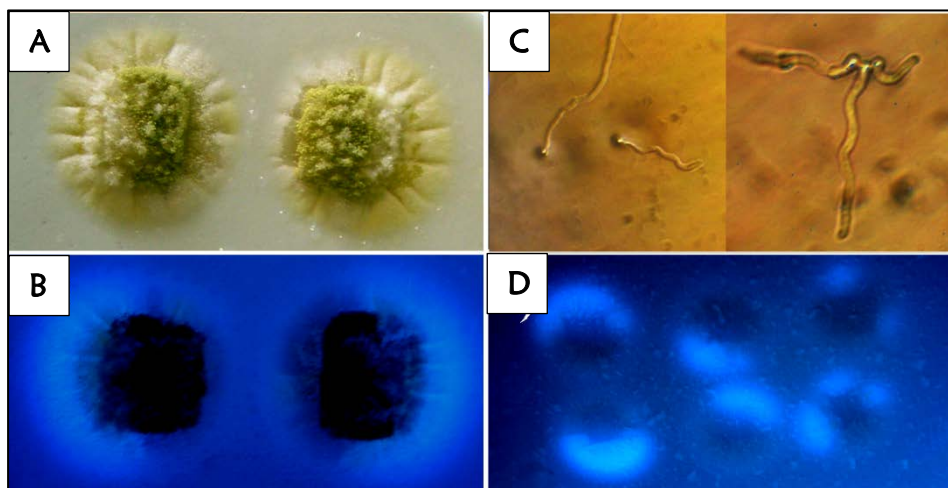


Fig. 24: Effetto della concentrazione e del rapporto afla⁺/afla⁻ sull'efficienza competitiva. Spore di TO ϕ e SF2 sono state co-inoculate in CLM a concentrazioni (10^4 , 10^3 e 10^2 conidi/pozzetto) e rapporti diversi (1:1, 2:1 e 4:1), e incubate a 25°C. L'emissione della fluorescenza è stata registrata dopo 6 giorni. L'abbattimento di aflatossina è riportato come percentuale rispetto alla fluorescenza nel controllo.

3.3 Effetto del tempo di inoculo e cinetica di accumulo in competizione

Un altro parametro considerato critico per un abbattimento efficiente è il momento dell'inoculo del competitore (Brown *et al.*, 1991). Sono stati pertanto progettati esperimenti in cui l'inoculo del ceppo afla⁺ SF2 e del ceppo afla- TOφ vengono ritardati di 9, 12 e 16 ore rispetto all'inoculo del rispettivo competitore, variando inoltre sia il rapporto afla⁺/afla- (1:1 e 1:4) che la concentrazione totale dell'inoculo (10² e 10⁴; dato non riportato). E' stato osservato che l'accumulo di aflatossina nel terreno aumenta all'aumentare del ritardo di inoculo del ceppo afla-, se confrontato con una competizione in cui l'inoculo è contestuale. Viceversa, se è il ceppo produttore ad essere inoculato in ritardo rispetto al negativo l'abbattimento della concentrazione di tossina si verifica ad ogni tempo preso in considerazione. Per quanto riguarda il rapporto tra i due ceppi e la concentrazione dell'inoculo, si osserva nel primo caso un abbassamento dell'efficacia competitiva quando il rapporto afla⁺/afla- di 4:1 è associato alla concentrazione più bassa (10² spore/pozzetto), mentre nel secondo l'effetto di abbattimento è particolarmente evidente proprio nelle stesse circostanze. Infatti la riduzione di aflatossina quando l'inoculo del ceppo positivo viene ritardato di 9 ore corrisponde al 50% della quantità accumulata nel co-inoculo, ma presenta una diminuzione di ben 10 volte quando il ritardo raggiunge le 12 e le 16 ore.

Chiariti alcuni dei parametri che influenzano l'inibizione dell'accumulo di aflatossina nel ceppo afla⁺ è stata analizzata la cinetica di accumulo durante una competizione intraspecifica. La possibilità di osservare in tempo reale l'andamento della coltura può infatti definire definitivamente l'evoluzione del processo inibitorio del competitore sull'accumulo di AF, stabilendo se questo si manifesta come raggiungimento precoce di un plateau di fluorescenza più basso oppure con una curva costituita da valori inferiori ma in tutto e per tutto analoga a quella del ceppo produttore. Il disegno sperimentale è stato strutturato in modo da poter seguire una competizione tra TOφ e SF2 in CCM effettuando letture ad intervalli di circa 3 ore dalle 47 alle 97h dopo l'inoculo. L'inizio dell'accumulo si registra nella frazione di tempo compresa tra 56 e le 65h sia

nella coltura mista che nella coltura singola di SF2 (fig. 25); un aspetto interessante riguarda l'andamento della curva di accumulo durante la competizione: infatti si può osservare che la forbice tra la curva di accumulo del ceppo afla⁺ e quella della miscela dei due ceppi afla⁺/afla⁻ comincia a formarsi già durante le primissime fasi di produzione di tossina, mantenendosi poi per tutta la durata dell'osservazione. Quello che si osserva quindi non è il raggiungimento precoce di un plateau dopo un primo incremento, bensì una costante inibizione della produzione di tossina.

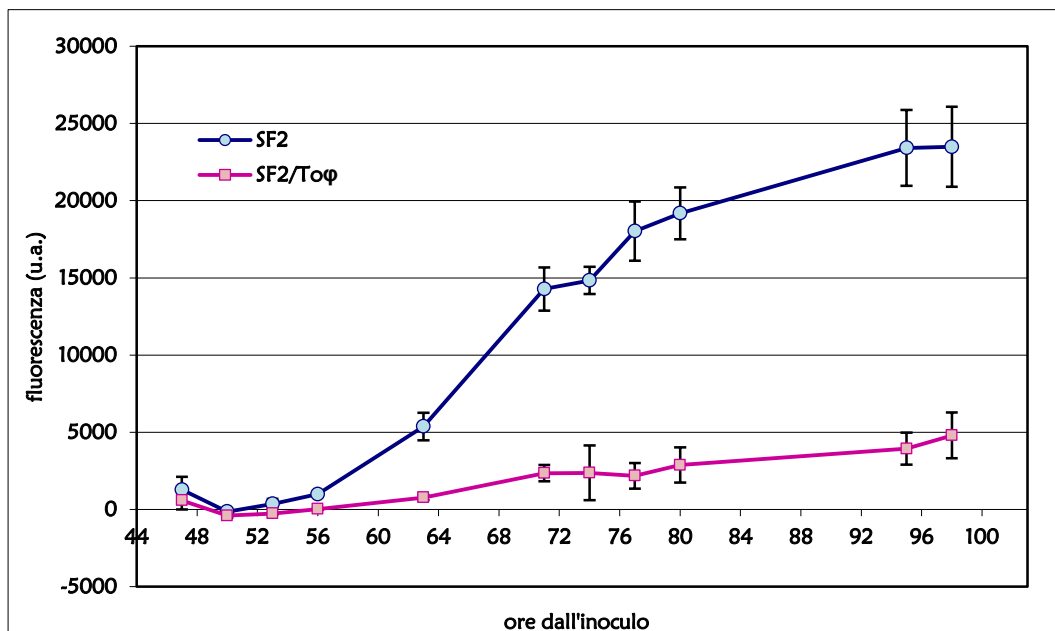


Fig. 25: Cinetica di accumulo di aflatossina durante competizione intraspecifica. L'incremento di fluorescenza di una coltura del ceppo afla⁺ SF2 in CCM viene confrontato con una coltura mista TOφ/SF2, inoculati nel rapporto di 1:1, alla concentrazione finale di 10³ spore/pozzetto (200μl di coltura). La concentrazione delle spore nei relativi controlli è pari a 5x10² spore/pozzetto. La deviazione standard è calcolata su 6 repliche per campione.

3.4 Prove di ricostruzione su matrice e applicazione in campo

Per appurare se l'efficacia dimostrata dai due isolati naturali TO ϕ e MN1 nell'abbattere l'accumulo di aflatossina in terreno CLM (e CCM) viene mantenuta anche in presenza di altri substrati, il loro potenziale competitivo è stato messo alla prova sia in terreno sintetico YES 15% (liquido), il mezzo di coltura standard per la massima produzione di tossina, sia in esperimenti di ricostruzione su matrice naturale (granella di mais); nel secondo caso le colture sono state incubate ad una temperatura maggiore (28°C invece di 25°C), più vicina alle condizioni climatiche normalmente presenti in campo e nei siti di stoccaggio. Il dosaggio dell'aflatossina accumulata nel terreno delle co-infezioni (YES) testimoniano un abbattimento rispetto al controllo di oltre il 95% sia ad opera di MN1 che del ceppo B507, utilizzato come controllo. La presenza di TO ϕ nella coltura mista contiene l'accumulo di tossina da parte del ceppo produttore addirittura allo 0.5% (tabella 2).

Competizioni (liquido) ^a	in	YES	Concentrazione AFB ₁ (ppb)
SF2			7550±20.7
MN1			<LOD
TO ϕ			<LOD
SF2/B507			309.5±9.3
SF2/MN1			355.6±10.0
SF2/TO ϕ			40.1±0.9
Competizioni su granella ^b			
SF2			11.6±8.5
SF2/MN1			22.7±5.1
SF2/TO ϕ			2.3±0.1

Tabella 2: Determinazione HPLC del contenuto in AFB₁. La concentrazione di aflatossina è espressa come media di 5 repliche $\pm$ deviazione standard. LOD = 0.05ppb. **a:** colture in YES 15% liquido incubate a 25°C per 12 giorni. Nei co-inoculi i due ceppi sono presenti in rapporto 1:1. **b:** competizioni su chicchi di mais incubate 14g a 28°C; nei co-inoculi i dei due ceppi sono in rapporto 3:1 a favore del ceppo afla-.

Il risultato non si conferma però nelle competizioni su matrice naturale: infatti, se l'azione di TO ϕ riesce efficientemente ad inibire l'accumulo di aflatossina da parte di SF2 fino ad un residuo del 20%, neanche un rapporto di 3:1 a suo favore riesce a consentire al ceppo MN1 una qualunque efficacia competitiva.

A seguito delle evidenze ottenute dalle numerose prove in micropiastre, questo risultato rafforza la posizione del ceppo TO ϕ come potenziale agente di biocontrollo da includere nella formulazione di un bio-pesticida utile al trattamento di coltivazioni di mais, ed eventualmente anche di altri tipi di colture. Nonostante il dato di abbattimento su matrice naturale possa in qualche modo assicurare sulla reale efficacia del ceppo nell'ambiente naturale, è stata già discussa la possibilità che ceppi dimostratisi buoni competitori in condizioni controllate non riescano a mantenere la stessa efficacia una volta inseriti in un ecosistema complesso. Per questo motivo la definizione di un buon competitore non può prescindere dal riscontro in campo. L'efficienza competitiva del ceppo TO ϕ è stata messa alla prova con una serie di test concepiti per analizzare il suo comportamento su colture di mais. Con la collaborazione di Aziende del settore mangimistico sono stati progettati e realizzati tre campi sperimentali nell'arco delle tre campagne maidicole corrispondenti agli anni 2010, 2011 e 2012 rispettivamente.

Simulazione della competizione (Granarolo, BO. Campagna 2010)

In quanto preposto alla ricostruzione di una competizione, nella preparazione del primo campo il disegno sperimentale è prevista l'induzione dell'infezione sia da parte di un ceppo positivo (SF2) che da parte del ceppo competitore. L'area trattata ha una superficie di circa 100mq, per un totale di 90 piante, ed è suddivisa in 9 blocchi da 10 piante ognuno; i blocchi sono randomizzati in modo tale che piante trattate con lo stesso ceppo non si trovino vicine. Tre blocchi (30 piante) sono stati trattati con il solo ceppo afla- (TO ϕ), 3 con il solo ceppo afla⁺ e 3 con entrambi i ceppi (fig. 26). Il momento dell'applicazione è stato scelto sulla base di quanto riportato da letteratura nel caso di prove analoghe, ed è stato fissato nel periodo della prime estrusione delle setole dal corpo delle spighe

(Dorner, 2004; Dorner, 2009); nello specifico, l'applicazione è avvenuta durante la prima settimana di luglio. Le sospensioni sporali utilizzate per l'inoculo sono state recuperate il giorno precedente da colture fresche e mantenute overnight a 4°C. La somministrazione è stata effettuata con una doppia nebulizzazione manuale, mediante vaporizzatore spray, sulle setole di ogni singola spiga; è stato calcolato che il volume di una singola vaporizzazione corrisponde a 750µl. La raccolta, fissata al raggiungimento di un'umidità relativa della granella compresa tra il 20 e il 18% (secondo le condizioni climatiche del periodo, all'incirca 60 giorni dopo l'estrusione delle setole), è stata effettuata manualmente, così come la sgranatura. I campioni dei 3 blocchi trattati con la stessa sospensione sporale sono stati mescolati insieme prima di effettuare il dosaggio delle aflatossine tramite HPLC.



Fig. 26: Schema di inoculo del campo sperimentale 2010. Per i controlli SF2 e TO ϕ : 100ml di sospensione 10⁶ spore/ml. Per il co-inoculo: 100ml di una miscela, sempre alla concentrazione di 10⁶ spore/ml, costituita da 75ml di sospensione del ceppo afla- e 25ml della sospensione del ceppo afla⁺.

Nei campioni trattati con la sospensione mista, il competitore TO ϕ ha abbattuto l'accumulo di aflatossina (AFB₁+AFB₂) del 97% rispetto ai controlli trattati col solo ceppo tossigeno (tabella 3). L'analisi dei controlli vicino e lontano è servita per escludere la presenza di nuclei di infezione di *A. flavus* (o di *A. parasiticus*) nelle vicinanze dell'area trattata che avrebbero potuto alterare il livello di

contaminazione dei campioni e/o interferire con l'azione competitiva del ceppo afla-.

Campione	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
SF2/TOφ	1.6±0.1	< LOD	< LOD	< LOD
SF2	44.0±0.7	1.8±0.3	< LOD	< LOD
TOφ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Contr. vicino	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Contr. lontano	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Tabella 3: Determinazione HPLC del contenuto in AF nei campioni del campo sperimentale 2010. Controllo vicino: materiale prelevato al di fuori dell'area trattata ma a meno di 5 metri da essa. Controllo lontano: materiale prelevato a 100 metri dal margine dell'area trattata. La concentrazione di aflatossina è espressa come media di 5 repliche ± deviazione standard. LOD = 0.05ppb.

Competizione con ceppi aflatossigeni autoctoni (Altedo, BO. Campagna 2011)

Le strategie di biocontrollo basate sull'uso di funghi generalmente prevedono applicazioni di semi di cereali pre-colonizzati, pellets di alginato, o granuli di amido gelatinizzato ai quali l'agente di biocontrollo è stato fissato in qualche modo (Lewis *et al.*, 1998; Honeycutt and Benson, 2001; Dorner, 2008). Tra alcune delle formulazioni di successo, un prodotto simil-pasta (Pesta®) e una formulazione a base di orzo rivestito (Afla-Guard®) hanno dimostrato una buona efficacia nel veicolare ceppi atossigeni di *A. flavus* così come altri funghi dedicati al biocontrollo (Connick *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2007; Dorner, 2008). Recentemente è stato proposto un sistema di inclusione di propaguli del ceppo atossigeno di *A. flavus* NRRL30797 (conosciuto anche come K49) in una formulazione granulare costituita dalla bioplastica commerciale Mater-Bi® (Novamont S.p.A., Novara, Italy), che però deve essere ancora validato su larga scala (Accinelli *et al.*, 2009). Tuttavia, mentre l'applicazione al suolo (granuli o semi) è funzionale per ridurre la contaminazione da aflatossina in determinate coltivazioni, la somministrazione diretta dell'agente di biocontrollo sulla superficie delle strutture riproduttive della pianta potrebbe rivelarsi un sistema

più efficiente per il mais. Affinchè il ceppo competitore colonizzi proficuamente la porzione della pianta soggetta all'attacco del patogeno, cioè la spiga, nel caso di applicazioni al suolo è necessario un inoculo elevato (Dorner *et al.*, 1999). In caso di applicazione a spruzzo diretto questo requisito può essere superfluo, poiché una modalità di somministrazione dall'alto garantisce l'arrivo dell'agente di controllo direttamente a destinazione. Studi condotti sul campo che hanno confrontato la capacità di colonizzazione di un ceppo atossigeno di *A. flavus* e la sua efficacia bicompetitiva quando applicato come inoculante del suolo o come spray diretto, hanno dimostrato che nei trattamenti aerei la contaminazione da aflatossine viene ridotta del 97%, contro l'abbattimento del 65% ottenuto dai trattamenti al suolo (Lyn *et al.*, 2009). L'uso granuli per il controllo aflatossine in mais pone altri inconvenienti: ad esempio, l'applicazione di una matrice solida può essere difficile (se non impossibile) quando il raccolto è in una fase avanzata dello sviluppo, oppure fattori ambientali e climatici, quali vento, pioggia e umidità possono limitare o ritardare la dispersione dei conidi dalla sorgente granulare nel terreno agli organi aerei del mais; infine, il rischio associato ad una eventuale esposizione prolungata all'elevata concentrazione di conidi di *A. flavus* nell'aria, derivanti dalla sporulazione continua sulle particelle applicati a livello del suolo, può sollevare questioni di salute e sicurezza.

Per tutti questi motivi, e per una maggiore praticità, nella realizzazione del campo sperimentale 2011 la somministrazione è stata fatta coincidere con il trattamento antipirale. Diversamente dal precedente, lo scopo di questo è saggiare l'efficienza competitiva di TOφ nei confronti di ceppi produttori di tossina appartenenti alla popolazione microbica già residente sulla coltura di mais. Per l'allestimento del campo è stata scelta un'area coltivata a mais classe 600 a ciclo medio (DKC60-40, Decal, Monsanto), con una distanza tra i filari pari a 70cm. L'area è stata suddivisa in due settori: il trattato, largo quanto l'apertura dei bracci del trampolo utilizzato per la somministrazione, è stato nebulizzato con una sospensione sporale di TOφ (10^6 spore/ml). Il prodotto commerciale antipirale "CORAGEN powered by Rynaxypyr®" (principio attivo: chlorantraniliprol. Dupont) è stato diluito nel serbatoio del trampolo

nella proporzione di 125ml in 400l di acqua. Il settore di controllo è stato nebulizzato con la sola soluzione antipiralide. La raccolta, anch'essa meccanizzata, è stata effettuata al raggiungimento del 18% di umidità della granella, e il campionamento è stato condotto secondo le procedure standard previste dal protocollo di intesa sottoscritto da organizzazioni professionali agricole, stoccatrici privati, cooperative e rappresentanti dei trebbiatori, concordato con la Regione Emilia Romagna e rinnovato annualmente. Nello specifico, sono stati raccolti 100 campioni da 100gr l'uno, per un totale di 10kg di granella, direttamente dal flusso in uscita dalla trebbiatrice; questo è stato fatto sia per il trattato che per il controllo. Dai due campioni di 10kg sono stati poi casualmente ricavati due sottocampioni di 1kg, da cui è stata estratta e dosata l'aflatossina. I risultati (tabella 4) mostrano che, nonostante il livello di tossina presente nel controllo non superi i limiti di legge previsti, la quantità di AF presente nel trattato è stata comunque azzerata dall'azione contenitiva di TOφ.

Campione	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Trattato	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Controllo	1.2±0.09	< LOD	< LOD	< LOD

Tabella 4: Determinazione HPLC del contenuto in AF nei campioni del campo sperimentale 2011. Controllo: materiale proveniente da una zona della coltura trattata solo con antipiralide, a 100m dall'area di applicazione del competitor. La concentrazione di aflatossina è espressa come media di 5 repliche ± deviazione standard. LOD = 0.05ppb.

Le problematiche legate alla gestione del campo sperimentale (distanza del sito, coordinamento con il terzista responsabile del trattamento antipiralide) non hanno consentito l'utilizzo di sospensioni sporali fresche; per questa ragione le sospensioni sono state preparate il giorno prima e conservate a 4°C fino al momento dell'uso (overnight). La risposta competitiva del ceppo potrebbe in qualche modo essere inficiata dal periodo a bassa temperatura; un test di

competitività *in vitro* nei confronti di due ceppi afl^a (SF2 e TN3+) è servito a confermare che la capacità di contenimento di una sospensione sporale conservata non è inferiore a quella di una sospensione fresca, anzi, sembra quasi che l'abbassamento della temperatura prolungato per diverse ore abbia leggermente migliorato le performances sia del ceppo competitore nell'inibire l'accumulo di tossina nelle colture miste, sia dei ceppi afl^a SF2 e TN3+ nell'accumularne (fig. 27).

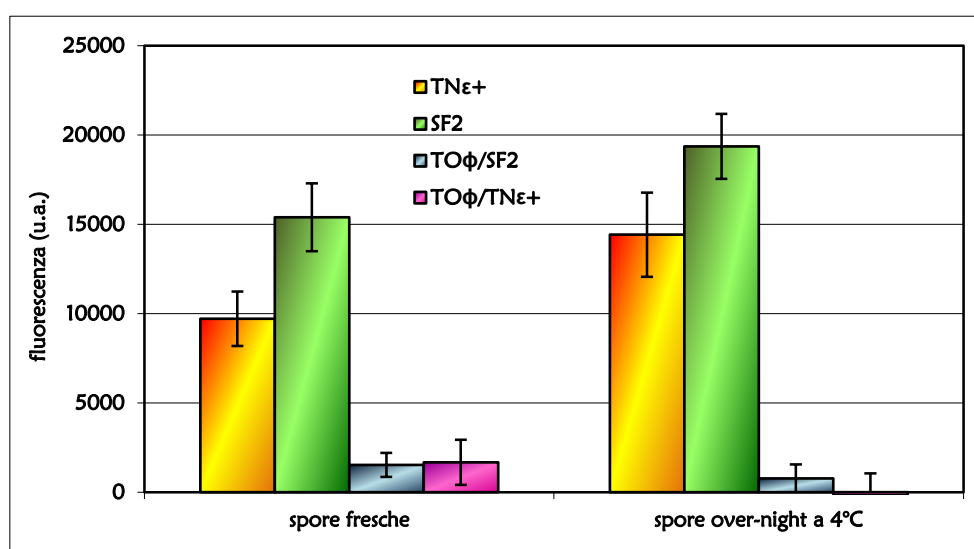


Fig. 27: Confronto di competitività tra spore fresche e conservate. Test di competizione in CLM. Nei co-inoculi i ceppi sono presenti nel rapporto 1:1, ad una concentrazione finale di 10^3 spore/pozzetto. La lettura della fluorescenza è stata effettuata dopo 6 giorni di incubazione a 25°C, e i valori sono normalizzati per la fluorescenza basale delle colture di TOφ corrispondenti. Deviazione standard calcolata su 6 repliche per campione.

Prove complementari su eventuali effetti del principio antipirale sullo sviluppo di *A. flavus* hanno dimostrato che l'accrescimento radiale di TOφ e di SF2 in presenza di Rynaxypyr® non è significativamente diverso (dato non riportato). Un'ultima prova è stata condotta per simulare eventuali effetti del Rynaxypyr® sulla colonizzazione delle cariossidi da parte del fungo: è stato dunque seguito giornalmente l'avanzamento dell'infezione su cariossidi con una miscela di conidi e principio antipirale alla stessa concentrazione finale dei trattamenti in

campo). Abbiamo potuto constatare che non solo la colonizzazione della superficie dei semi non è stata in alcun modo limitata dalla presenza del Rynaxypyr®, ma addirittura ne è stata palesemente accelerata (fig. 28). L'ipotesi più plausibile è che nella formulazione del prodotto siano presenti tensioattivi il cui scheletro carbonioso viene utilizzato dal fungo come fonte di carbonio. Dimostrato che l'applicazione di TOφ come sospensione sporale è efficace nell'abbattere la contaminazione da aflatossina anche quando effettuata con una dispersione aerea sulla superficie della coltura (trampolo), l'osservazione che la presenza del principio antipiraleide (o quantomeno di quello in questione), nelle condizioni descritte, non comporta un rallentamento della crescita o della diffusione di *A. flavus* assume un'importanza strategica significativa: i costi e le tempistiche legate ai trattamenti in campo a base di fitofarmaci fanno sì che la possibilità per un bio-pesticida non solo di sfruttare i mezzi agricoli già in uso, ma di poter anche essere somministrato contestualmente (e con lo stesso processo tecnologico) ad altri prodotti, si traduce in un vantaggio commercialmente e produttivamente competitivo nei confronti di altre strategie. Al momento è in corso una valutazione *in vitro* di eventuali interferenze del principio antipiraleide nel potenziale di contenimento di TOφ.



Fig. 28: Effetto del Rynaxypyr® sullo sviluppo di *A. flavus*. Alcune cariossidi di mais sterilizzate in autoclave, vaporizzate con una soluzione di principio antipiraleide, alla stessa concentrazione utilizzata per il trattamento del campo, inoculate con 10^2 conidi/ml di una sospensione sporale del ceppo afla- TOφ e incubate a 28°C per 10 giorni. A sinistra: trattato con Rynaxypyr®. A destra: controllo.

Formulazione e applicazione di un prototipo di bio-pesticida (campagna 2012)

In collaborazione con una nota azienda del settore fitofarmaci è attualmente in corso la produzione e l'ottimizzazione di un prototipo di bio-pesticida. Lo scopo è realizzare un prodotto commerciale a base di propaguli del ceppo TOΦ, ottenendo una formulazione applicabile in campo attraverso dispersione aerea tramite trampoli (o altro mezzo semovente). In ragione di difficoltà derivanti dall'ottenimento, dalla gestione e dalla shelf-life di un prodotto liquido, la formulazione attuale prevede una miscela di una matrice microparticolata e conidi, conservabile a secco e solubilizzabile nei serbatoi del trampolo al momento dell'uso. Per non violare la normativa sulla tutela della privacy e della proprietà industriale non è possibile approfondire in questa sede né la composizione della matrice solida né la procedura con la quale essa viene ottenuta. Nel corso della campagna maidicola 2012 il prototipo è stato somministrato a 4 appezzamenti coltivati a mais in altrettante località dislocate tra l'Emilia e la Lombardia. I risultati restituiti dalle analisi preliminari (qui non riportati) non hanno riportato alcun effetto attribuibile ad un contenimento della contaminazione ad opera del prodotto, ma va sottolineato che nonostante l'andamento climatico abbia favorito una impennata nei livelli di contaminazione da aflatossina della stragrande maggioranza dei raccolti della stagione nella Pianura Padana, i controlli provenienti dai non trattati risultano anch'essi privi di tossina.

Altre prove saranno condotte durante la prossima stagione, accompagnate da test di recovery del ceppo per monitorare la diffusione del prodotto nelle aree adiacenti a quelle trattate.

3.5 Effetto della degenerazione sulla competizione

Sotto il profilo commerciale un'efficacia prolungata del bio-pesticida, che garantisca una "copertura" delle colture il più a lungo possibile contro l'attacco delle specie tossigene, è altrettanto interessante che la necessità degli operatore

del settore agricolo di continuare ad acquistare il prodotto stesso. E' dimostrato che l'applicazione del bio-pesticida modifica la composizione della popolazione di *A. flavus* del suolo, arricchendola significativamente in individui appartenenti al ceppo aflatossigenico (Dorner and Lamb, 2006); tuttavia da tempo è noto il fenomeno che porta isolati naturali a perdere diverse caratteristiche morfologiche e fisiologiche quando tenuti per lungo tempo sotto una determinata pressione selettiva. Nel caso di *A. flavus*, individui tossigeni sono soggetti a completa degenerazione del potenziale aflatossigenico se artificialmente propagati da una coltura all'altra per 20 generazioni o anche meno (Horn and Dorner, 2002; Chang *et al.*, 2007). Studi condotti nel nostro laboratorio hanno confermato che anche la propagazione su matrice naturale provoca, nei ceppi afl^a+, una riduzione del potenziale tossigenico, provando che una situazione analoga potrebbe verificarsi anche in campo. Nel caso dei ceppi afl⁻, questo potrebbe significare una riduzione della capacità competitiva. La risposta a questi interrogativi non è di secondaria importanza, poiché nel caso di un bio-pesticida sarebbe importante sapere se e dopo quanto tempo di permanenza nell'ambiente (e dopo quanti cicli vitali completati sulla coltura) la sua capacità di contenere l'accumulo di aflatossina potrebbe essere compromessa. Se ciò possa accadere anche a TOΦ e il numero di generazioni eventualmente necessarie è stato verificato sottoponendo il ceppo ad una serie di propagazioni artificiali su cariossidi di mais per diverse generazioni, dove per "generazione" si intende un intero ciclo vegetativo dalla germinazione delle spore dell'inoculo alla completa sporificazione della coltura; la simulazione dell'alternanza dei cicli vegetativi è stata ottenuta con il trasferimento seriale dei conidi di volta in volta recuperati dalle colture cresciute a 28°C e filtrate prima dell'inoculo successivo per eliminare frammenti di micelio. L'utilizzo della matrice naturale ha lo scopo di riprodurre, per quanto possibile, una situazione reale di propagazione in campo. Sospensioni sporali di tutte le generazioni sono state recuperate e conservate, ma solo alcune rappresentative sono state utilizzate nei test di competizione contro due ceppi afl^a (SF2 e Fri8+).

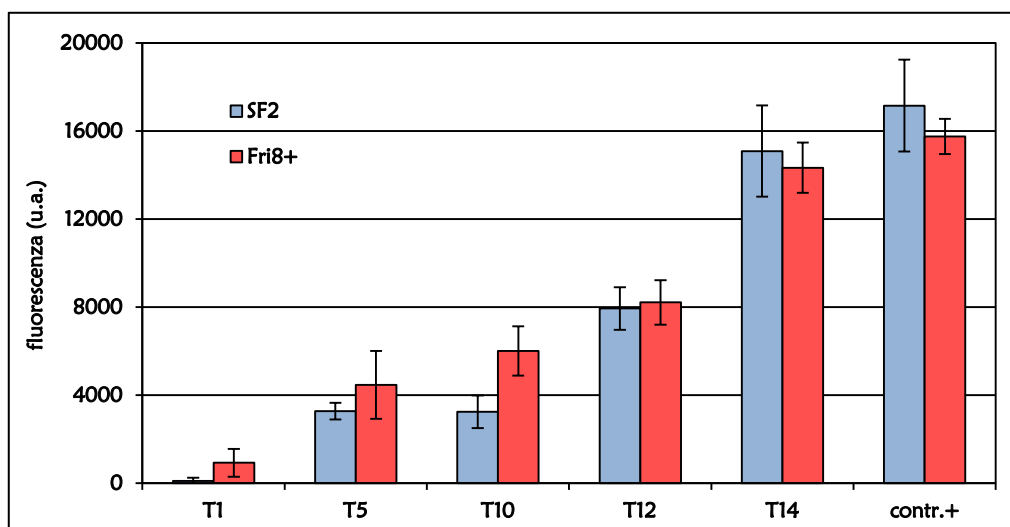


Fig. 29: Confronto di competitività tra generazioni successive di TO ϕ . Test di competizione in CLM. Nei co-inoculi i ceppi sono presenti nel rapporto 1:1, ad una concentrazione finale di 10^3 spore/pozzetto. La lettura della fluorescenza è stata effettuata dopo 6 giorni di incubazione a 25°C, e i valori sono normalizzati per la fluorescenza basale delle colture di TO ϕ corrispondenti. Deviazione standard calcolata su 6 repliche per campione.

Nonostante le differenze di abbattimento nei confronti dei due ceppi produttori, l'andamento dell'efficienza competitiva di TO ϕ rivela un progressivo peggioramento all'aumentare delle generazioni, fino alla completa perdita del potere di contenimento che si raggiunge alla quattordicesima generazione (fig. 29). I dati qui discussi dimostrano però che anche dopo 12 generazioni TO ϕ è comunque in grado di dimezzare la concentrazione di aflatossina accumulata dai ceppi SF2 e Fri8+.

3.6 Caratterizzazione genetica dei buoni competitori

In assenza di una chiara comprensione degli effetti a lungo termine dell'applicazione di ceppi non-tossigeni di *A. flavus* o di altri agenti di biocontrollo, è necessario avere gli strumenti per poter condurre un ampio monitoraggio successivo all'immissione del microrganismo nell'ambiente. Nel caso dei ceppi attualmente impiegati come bio-pesticidi sulle colture di mais, cotone e arachidi (AF36, AflaGuard®, K49) la tracciabilità degli stessi è affidata all'identificazione del gruppo di compatibilità vegetativa (VCG) o, come suggerito più recentemente, ad un metodo basato sul pirosequenziamento (Das *et al.*, 2008) sviluppato per identificare singoli polimorfismi nucleotidici (SNPs) nel ceppo AF36. Il notevole costo iniziale delle attrezzature necessarie per il pirosequenziamento sarebbe comunque favorevole rispetto all'enorme sforzo per identificare il VCG degli isolati recuperati dall'area di monitoraggio. Un metodo ben più conveniente e rapido è quello basato su nested-PCR DNA che individua una delezione nella sequenza di un gene, e poiché l'approccio bio-competitivo si basa sull'uso di ceppi incapaci di accumulare tossina generalmente la lesione genetica target riguarda uno dei geni del cluster aflatossinico, come nel caso dell'agente di biocontrollo AF051 (Jiang *et al.*, 2009). Alla base di ogni strategia di monitoraggio che intenda sfruttare la diversità genetica del bio-competitore deve pertanto sussistere una profonda conoscenza di quelle che sono le caratteristiche molecolari uniche del competitore stesso.

L'integrità del cluster aflatossinico di TO ϕ è stata analizzata con una tecnica di PCR multiplex già descritta come metodo rapido per ottenere il profilo aflatossinico di isolati di *A. flavus* (Degola *et al.*, 2007); il DNA genomico è stato amplificato con batterie di primers specifici per 7 geni strutturali (*aflC*, *aflD*, *aflH*, *aflJ*, *aflM*, *aflN* e *aflP*) e per il gene regolatore *aflS*. Il profilo di amplificazione di TO ϕ mostra differenze sostanziali con i profili ottenuti dall'amplificazione del DNA dei due isolati afl⁻ MN1 e 696A, e del ceppo afl⁺ di collezione MAM13 (fig. 30-B). Oltre a individuare caratteristiche genetiche specifiche dei 3 afl⁻, la diversa distribuzione delle delezioni permette di escludere l'ipotesi di un'origine

clonale dei tre ceppi, isolati da popolazioni di *A. flavus* molto distanti (TO ϕ da granella di mais proveniente dalla provincia di Torino, MN1 da grano tenero biologico proveniente dalla provincia di Mantova, 696A da farina di mais proveniente dall'Est Europa) ma tutti, con alcune differenze, buoni competitori. Il ceppo atossigenico NRRL 18543, noto anche come AF36, è registrato negli Stati Uniti come biopesticida dal 1992 (brevetto n° 5171686), definito legalmente come “A biologically pure culture of *Aspergillus flavus* having the identifying characteristics of strain NRRL 18543, wherein said identifying characteristics include the ability to inhibit aflatoxin production by native aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* and hence reduce aflatoxin contamination of agricultural commodities” [7]. La quasi totalità dei geni del pathway biosintetico di AF36 sono intatti (Cotty and Bhatnagar, 1994); la causa della sua non-aflatossigenicità risiede nella presenza di un polimorfismo (SNP) nel gene *aflC*, una mutazione a carico del nucleotide 591: la sostituzione di un'adenina con una guanina introduce un codone di stop che comporta una preterminazione del tradotto e la formazione di un enzima non funzionante (Ehrlich and Cotty, 2004). Il risultato è un ceppo in possesso di un profilo di espressione perfettamente compatibile con quello di un ceppo produttore di aflatossina, sebbene in realtà esso sia incapace di accumularla. La presenza dello SNP appena descritto è una delle caratteristiche individuate come marcatori di identificazione del ceppo a scopo brevettuale. In mancanza di evidenze precise circa l'associazione di un determinato background genetico al potenziale biocompetitivo, abbiamo voluto verificare se nel caso di TO ϕ questo potesse accompagnarsi alla presenza dello stesso polimorfismo presentato da B507, un ceppo di *A. flavus* appartenente allo stesso VCG di AF36 e in possesso del medesimo SNP nel gene *aflC*.

L'uso di una coppia di primers specifica per l'individuazione del polimorfismo in questione è stata utilizzata per amplificare il DNA genomico di B507 (lanes 1 e 5) e di TO ϕ (lanes 2 e 6), 696A (lanes 3 e 7) e MN1 (lanes 4 e 8) (fig. 30-A). Nessuno dei 3 isolati presenta segnali di amplificazione in corrispondenza del prodotto target, togliendo forza all'ipotesi di una relazione univoca tra la non

funzionalità del prodotto genico di *aflC* e l'efficienza competitiva da parte di ceppi *afla*- di *A. flavus* nel contenere l'accumulo di aflatossina.

Lo sviluppo di procedure diagnostiche per l'interpretazione di caratteristiche genotipiche è particolarmente importante se riferito alla possibilità di identificare in maniera indiscutibile varietà/specie/isolati soggetti a brevetto. Ad esempio, lo studio dei microsatelliti (tandem di brevi sequenze di DNA di 1-6 coppie di basi, ipervariabili, codominanti e multialleliche, distribuite in tutto il genoma eucariotico e rilevabili mediante reazione a catena della polimerasi) ha contribuito in maniera significativa alla caratterizzazione inter e intraspecifica di specie di interesse agrario o biotecnologico, permettendo di individuare e definire marcatori molecolari sfruttati poi come "impronta genetica" del microrganismo di interesse; nel caso di *A. flavus*, Grubisha e Cotty (2009) descrivono 24 marcatori microsatelliti sviluppati per valutare la diversità genetica e la ricombinazione all'interno di gruppi di compatibilità diversi.

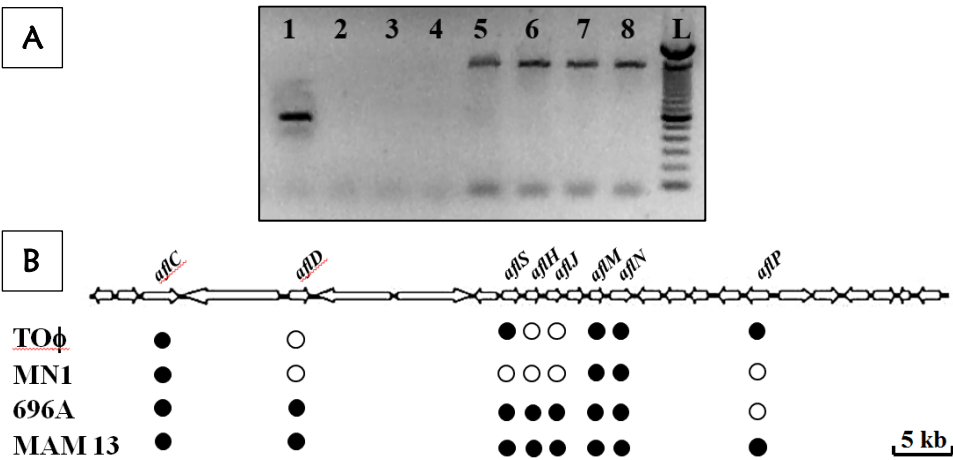


Fig. 30: Caratterizzazione molecolare di TOφ. **A)** Individuazione del polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) nel gene *aflC* caratteristico di AF36. DNA genomico di BS07, TOφ, 696A e MN1 amplificato con i primer pksA-F36 e pksA-Rev (lanes 1-4 rispettivamente; dimensioni prodotto di amplificazione: 504bp) e con una coppia di primers per β-tubulina come controllo di amplificazione (corsie 5-8 rispettivamente; dimensioni prodotto di amplificazione: 1406bp). L: 100bp ladder. **B)** Profilo di amplificazione del cluster aflatossinico di TOφ confrontato con quello degli isolati atossigenici MN1 e 696A, e del ceppo *afla*⁺ MAM13. Cerchi pieni: presenza di amplificato. Cerchi vuoti: nessun prodotto di PCR.

La variabilità genetica di specie aflatossigeniche può essere ottenuta anche utilizzando tecniche di RAPD-PCR (Yuan *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 2009; Khodadadi *et al.*, 2011); la semplicità di esecuzione della procedura e la disponibilità di un set di primers già testati per la differenziazione di isolati di *A. flavus* hanno fatto propendere per l'utilizzo di analisi RAPD per l'individuazione di un profilo genetico caratteristico del buon competitore TOφ. Il profilo molecolare ottenuto è stato confrontato con quelli di ceppi, produttori e non produttori di aflatossina, isolati sia da campioni di mais provenienti da aree geografiche diverse, che da campionamenti effettuati in anni diversi (fig. 31).

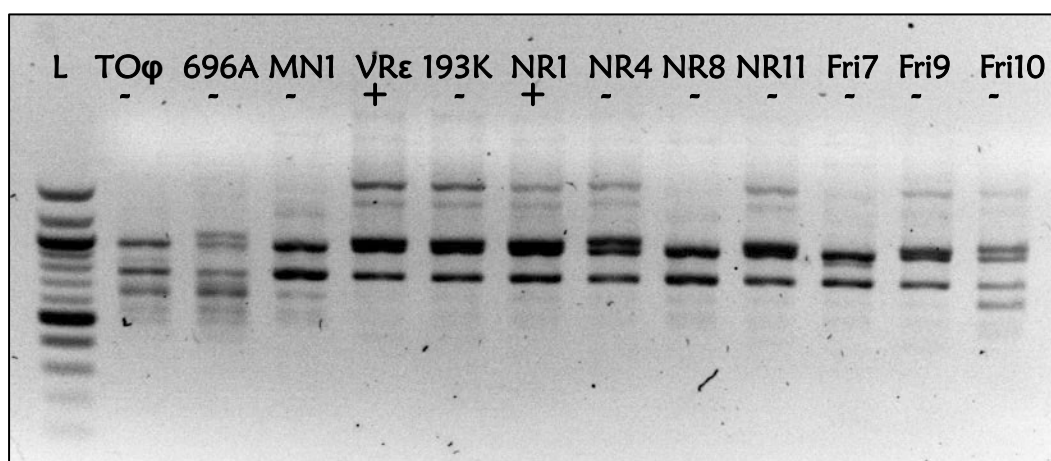


Fig. 31: Caratterizzazione del profilo RAPD di TOφ. DNA genomico degli isolati di *A. flavus* riportati in figura è stato amplificato con il primer 842 (vedi: sezione Materiali e Metodi). L : 100bp Ladder. + : isolato aflatox+. - : isolato aflatox-.

La prima considerazione riguarda il fatto che la maggior parte dei profili elettroforetici ottenuti può essere raggruppata per numero e distribuzione delle bande di amplificazione, e che isolati positivi e negativi appartengono allo stesso gruppo; la seconda considerazione, invece, riguarda l'unicità dei pattern di amplificazione dei 3 ceppi buoni competitori rispetto a tutti gli altri. Da questa evidenza otteniamo nuovamente la conferma che TOφ, MN1 e 696A sono

individui diversi tra loro. Le differenze presenti nelle loro impronte genetiche sembrano talmente specifiche da poter risultare interessanti per la tracciabilità del bio-pesticida.

4. COMPETIZIONE INTERSPECIFICA

Nonostante la comprovata efficacia di strategie di contenimento dell'aflatossina che ricorrono all'applicazione di ceppi non tossigeni di *A. flavus*, permangono i dubbi legati all'eventuale scambio di materiale genetico degli stessi agenti di biocontrollo con ceppi aflatoxigenici indigeni delle zone di intervento, o (nel caso di atossigenicità determinata da mutazioni puntiformi nei geni del cluster aflatossinico) a fenomeni di reversione. Se gli studi a monte dell'approvazione di biopesticidi come AflaGuard® e AflaSafe®, che hanno monitorato la diffusione e la persistenza dei ceppi nell'ambiente e la loro stabilità genetica, rassicurano su questo punto, la scoperta di stadi sessuali criptici in *A. flavus* e *A. parasiticus* contribuisce a sollevare obiezioni da più parti circa la sicurezza dello spargimento massivo di questi microrganismi su vaste aree interessate da colture destinate all'alimentazione. L'impiego di specie (e non di isolati) del tutto incapaci di accumulare micotossine, invece, è ritenuta da molti l'evoluzione auspicabile di suddette strategie. E' stata già discussa la relazione biologica che intercorre tra *A. flavus* e *A. oryzae* (vedi: sezione Introduzione): anche se i dettagli della relazione genetica tra *A. oryzae* e *A. flavus* rimangono poco chiari, le due specie sono vicine al punto che tutti i ceppi di *A. oryzae* sono considerati da alcuni come varianti naturali di *A. flavus* modificatisi in conseguenza di anni di selezione dovuta all'uso nei processi di fermentazione degli alimenti. Eppure, mentre isolati naturali di *A. flavus* sono facilmente produttori di aflatossine e altre micotossine, non sono noti casi di ceppi di *A. oryzae* in grado di accumulare tossina. Certo è che l'esperienza di un impiego sicuro di questa specie "addomesticata" è straordinariamente ben consolidata da applicazioni nell'industria alimentare susseguitesesi per centinaia di anni. Come "koji mold" è necessaria per la fermentazione di bevande e salse tradizionali (sakè, miso, salsa di soia), ma viene utilizzata anche per la produzione di integratori alimentari e probiotici destinati al bestiame.

Dati relativi alla reale potenzialità di biocontrollo nel confronti della contaminazione da aflatossina non sono disponibili, tuttavia ceppi appartenenti alle specie *A. oryzae* e *A. sojae* sono oggetto di deposito brevettuale negli Stati Uniti proprio con questo scopo [9]. Diversi sono gli esempi di competizione interspecifica relativamente alla problematica aflatossina, e che prevedono l'uso di lieviti, batteri, batteri lattici (Tsitsigiannis *et al.*, 2012); tuttavia il vantaggio principale nel rivolgersi ad una specie filogeneticamente molto vicina alle specie tossigene che interessa sconfiggere risiede senz'altro nella possibilità di occupare la stessa nicchia ecologica: se infatti la teoria dell'esclusione competitiva o del consumo dei nutrienti è valida, più l'habitat del microrganismo target è sovrapponibile a quello dell'agente di biocontrollo, maggiori sono le chances di quest'ultimo di prevalere sul primo.

4.1 Isolamento e caratterizzazione di nuovi ceppi provenienti dal Madagascar

La Riserva Naturale di Lokobe, una delle rare località dove la foresta originale di Sambirano esiste ancora, è situata nel Sud-Est dell'Isola di Nosy Be (in malgascio "Isola Grande"), nel nord del Madagascar (GPS : 13° 23'- 13° 25' latitudine Sud; 48° 18' e 48° 20 longitudine Est). Zona di interesse coloniale già dal 1913 e dichiarata Riserva Naturale Integrale nel 1927, dal 1966 il Governo del Madagascar si è formalmente impegnato per la salvaguardia e la preservazione della sua biodiversità; il Madagascar National Parks ha recentemente richiesto la modifica della denominazione a Parco Naturale, ma attualmente la Riserva è ancora definita "integrale": di conseguenza l'accesso ad essa è limitato, se non per motivi di studio o di gestione, a pochissimi individui. Il clima è tipo tropicale, caldo e umido con una media di 2,250 mm di precipitazioni l'anno; la stagione secca va da giugno ad agosto, e la temperature oscillano dai 31°C ai 21°C per una media annuale di 26°C.

Da un lotto di mais campionato direttamente dalle scorte alimentari dell'unico villaggio presente all'interno della Riserva è stata isolata una popolazione di

Aspergillus, con lo scopo di ottenere isolati naturali di *A. flavus* da testare come outgroup nelle matrici di competizione: l'arricchimento della varietà dei ceppi è infatti funzionale sia all'individuazione di nuovi buoni competitori che per testare l'efficacia dei buoni competitori già caratterizzati contro ceppi di *A. flavus* provenienti da zone agricole anche molto distanti. La caratterizzazione dei ceppi è stata effettuata secondo i parametri dell'aflatossigenicità in CLM, della velocità di accrescimento (radial growth) e del diametro degli sclerozi (appartenenza alla classe L/S); la classificazione è stata condotta secondo le chiavi di identificazione morfologica previste dai manuali di micologia (Pitt and Hocking 1997; Frisvad *et al.*, 2004), sfruttando anche tecniche di microscopia a contrasto di fase e interferenziale per l'analisi delle strutture riproduttive. Da 10 subcampioni rappresentativi sono stati recuperati 29 isolati appartenenti alla sezione Flavi, di cui 23 classificati come appartenenti alla specie *A. flavus*; dei 16 sottoposti al test di aflatossigenicità solo 4 sono risultati afla⁺. Tutti i ceppi capaci di produrre sclerozi fra quelli analizzati per questo tratto si sono dimostrati appartenere alla classe L.

L'identificazione dei 6 isolati restanti è stata fin da subito incerta, poiché se al momento dell'isolamento su DRBC la colorazione dei conidi si presentava verde-parrot come quella caratteristica di *A. flavus*, una volta trasferiti sui terreni CYA, MEA e CY20S essa virava al marrone (fig. 32). Subculture di questi isolati sono state inviate alla Mycotheca Universitatis Taurinensis (MUT) dell'università di Torino, insieme ad alcuni ceppi di *A. flavus* (Lok22+: MUT356; SF2; TOφ), per l'identificazione molecolare sulla base di marcatori genetici specifici quali regioni ITS e la sequenza del gene codificante per la calmodulina. I risultati delle analisi delle sequenze hanno definitivamente classificato gli isolati Lok02 (MUT303), Lok07 (MUT321), Lok19 (MUT330) e Lok26 (MUT392) come *Aspergillus tamarii*. Sorprendentemente l'isolato Lok18 (MUT322), inizialmente identificato come *A. flavus* e mandato anch'esso ai laboratori del MUT come controllo di specie interno alla popolazione microbica isolata dal mais malgascio, è stato in quella sede re-identificato come *Aspergillus oryzae*.

A. oryzae è considerato da alcuni esperti come una variante addomesticata di *A. flavus* (Kurtzman *et al.*, 1986). Sotto la pressione selettiva impressa dal mantenimento per lungo tempo in determinate condizioni di coltura funzionali all'impiego industriale, i ceppi di *A. oryzae* sembrano essere stati spinti verso una sporulazione ridotta, un micelio più aereo e l'assenza di strutture di sopravvivenza come sclerozi; anche la perdita della capacità di accumulare aflatossina potrebbe essere interpretata, se considerata come una sorta di vantaggio competitivo, come l'adattamento ad un ambiente privo degli input che hanno portato altre specie a mantenere attiva questa via biosintetica. Una errata identificazione di nuovi isolati ottenuti da colture non adeguate è sempre una possibilità, dal momento che le principali differenze morfologiche tra le due specie sembrano dipendenti delle condizioni di cultura.

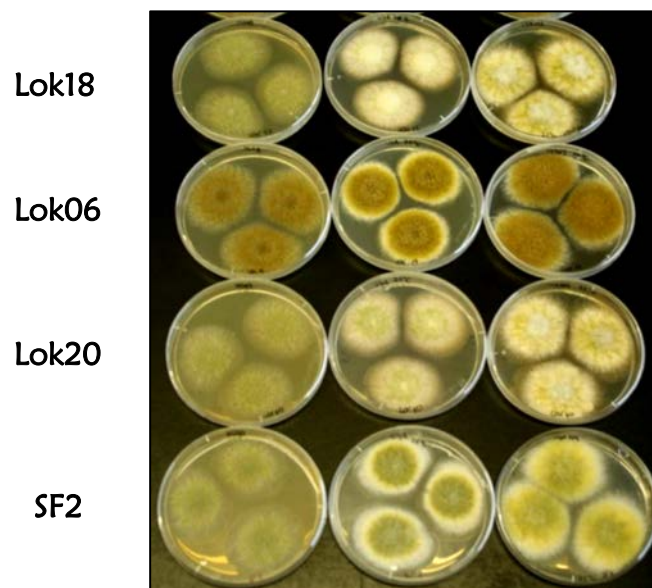


Fig. 32: Confronto colturale tra isolati di *Aspergillus sez. Flavi* provenienti dalla Riserva di Lokobe (Madagascar). Gli isolati da granella di mais sono confrontati con un ceppo di *A. flavus* (SF2). Da sinistra a destra: terreno CYA, MEAB e CY205. Colture di 7 giorni a 25°C.

4.2 Test di competitività *in vitro*

Il potenziale competitivo dell'isolato Lok18 nel contenere l'accumulo di aflatossina è stato paragonato all'efficienza di TO ϕ nei confronti di isolati afla⁺ provenienti da aree molto lontane fra loro. In un esempio di matrice di competizione (fig. 33) con ceppi tossigeni provenienti dalla Polonia (Pol10+, Pol13+), dall'Emilia Romagna (Emi10+, 3A+), dal Veneto (Ven4+) e dalla stessa popolazione isolata dal mais di Lokobe (Lok11+, Lok20+, Lok22+), l'isolato di *A. oryzae* si è dimostrato altrettanto (se non addirittura più) efficace di TO ϕ nell'inibire la sintesi di tossina. Osservazione interessante è l'effetto di contenimento che Lok18 esercita sugli isolati afla⁺ provenienti dal suo stesso lotto di mais, che risulta complessivamente maggiore rispetto a quanto ottenuto nella competizione con isolati afla⁺ di aree diverse.

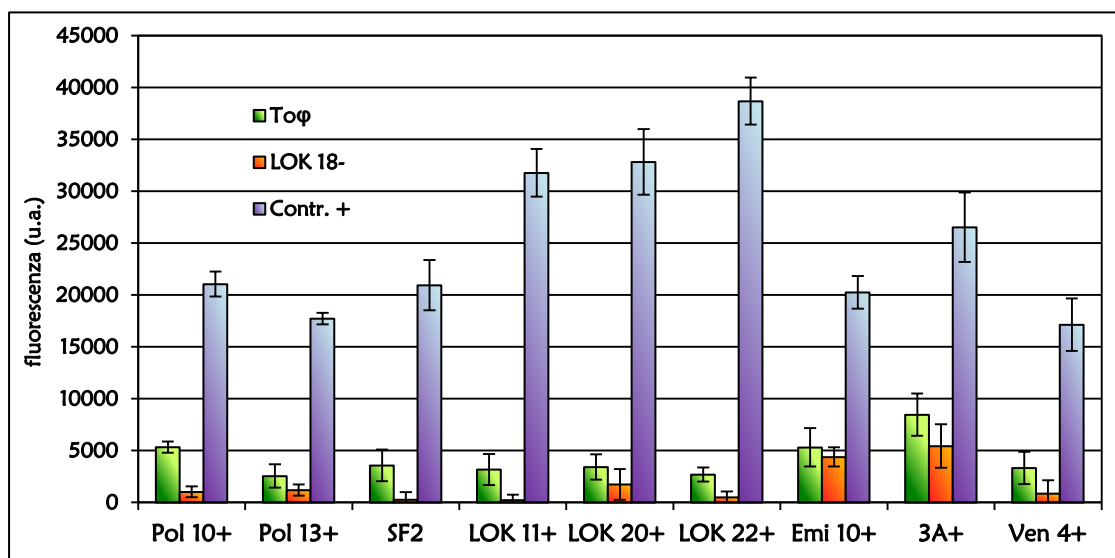


Fig. 33: Matrice di competizione: confronto tra TO ϕ e Lok18. I due ceppi afla⁻ sono messi alla prova in terreno CLM contro 9 isolati afla⁺. Nelle colture miste i conidi sono inoculati nel rapporto di 1:1, alla concentrazione finale di 10³ spore/pozzetto (200 μ l di coltura). La concentrazione delle spore nei relativi controlli è pari a 5x10² spore/pozzetto. La lettura della fluorescenza avviene dopo 6 giorni di incubazione a 25°C, i valori sono normalizzati per il valore della fluorescenza basale delle colture afla⁻ corrispondenti. La deviazione standard è calcolata su 3 repliche per campione.

Riuscire ad includere un isolato di *A. oryzae* nei test di competitività in micropiastra è un risultato rilevante di per sé; uno dei limiti della procedura di coltura/rilevamento consiste nel rischio di sovrastima/sottostima della fluorescenza se nel terreno sono presenti composti autofluorescenti o schermanti rispettivamente: non è infatti garantito che se ceppi atossigeni di *A. flavus* non rilasciano metaboliti con le suddette caratteristiche durante la crescita, la stessa cosa si verifichi per specie vicine ma comunque diverse come *A. oryzae* o *A. sojae*. Questo risultato è dunque doppiamente positivo, poiché dimostra contemporaneamente un ottimo potenziale competitivo di un isolato di *A. oryzae* rispetto alla biosintesi di aflatossina *in vitro* da parte di ceppi tossigeni e l'applicabilità della metodica ad alta resa per analizzare popolazioni di *Aspergilli* più vaste alla ricerca di buoni competitori interspecifici.

4.3 Test di competitività su matrice naturale

Esistono controversie sulla capacità di isolare *A. oryzae* dall'ambiente naturale. Dati specifici indicano che il processo di domesticazione può aver provocato una diminuzione della fitness, limitando la sopravvivenza di *A. oryzae* nell'ambiente naturale, anche se la sua capacità di produrre spore suggerisce che sia ancora in grado di colonizzare un ecosistema appropriato [10]. In questo caso è pertanto ancora più importante verificare il comportamento del buon competitore in condizioni sempre controllate ma più vicine ad una situazione reale: gli esperimenti di ricostruzione in cui l'efficienza di contenimento di Lok18 è stata messa alla prova nei confronti di un isolato aflatoxigeno (afla⁺) proveniente dalla sua stessa nicchia (Lok20+) e nei confronti di un isolato aflatoxigeno (AT1+, proveniente dalla popolazione microbica di mais della provincia di Asti) sono stati progettati con lo stesso disegno descritto per le prove di ricostruzione strutturate per TOΦ. In breve, miscele dei due *A. flavus* alternativamente e di Lok18 sono state inoculate in campioni di granella preventivamente sterilizzati in autoclave e incubati a 28°C; l'estrazione di AF dalla farina e il dosaggio con HPLC è stata eseguita dopo

12 giorni di crescita. I dati mostrano come, coerentemente con il risultato ottenuto nei test in vitro, anche su matrice naturale l'isolato Lok18 riesca a contenere l'accumulo di aflatossina da parte di entrambi i ceppi tossigeni (fig. 34). Quando co-inoculato con il ceppo AT1+, l'isolato di *A. oryzae* limita la contaminazione da aflatossina al 13% del controllo, mentre l'effetto su Lok20+ è un abbattimento al 18%.

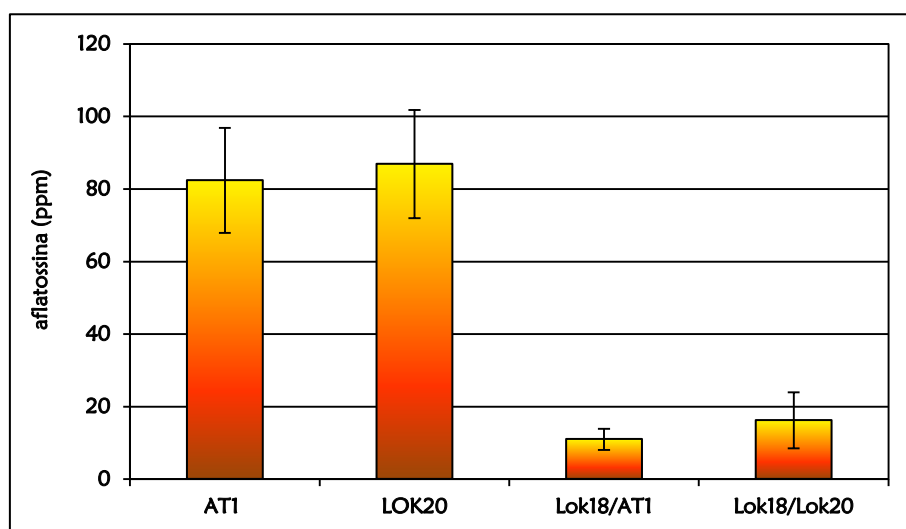


Fig. 34: Concentrazione di AFB nelle competizioni su cariossidi. Determinazione condotta con HPLC su campioni di granella co-infettati con miscele sporali dei ceppi di *A. flavus* AT1+ e Lok20+ e del ceppo di *A. oryzae* Lok18 in rapporto 1:1. Le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard calcolata su 3 repliche per campione nei controlli e 5 repliche per campione nelle competizioni.

In questa ultima parte del lavoro abbiamo dunque dimostrato che esiste una reale possibilità di isolare questa specie da materiale proveniente da un ambiente naturale, aperto e sicuramente competitivo, ma non solo: i risultati mostrati rinforzano una ipotesi applicativa di specie non tossigene quali *A. oryzae* e *A. sojae* per strategie di biocontrollo nella lotta alla contaminazione da aflatossina. A causa della separazione antica e forzata dal continente, il 90% della flora e della fauna del Madagascar è endemica, e in mancanza di evidenze contrarie è

presumibile che sia lo stesso per la popolazione microbica. E' pertanto plausibile che isolati naturali, sia appartenenti alla specie *A. flavus* che ad altre specie correlate, possiedano caratteristiche morfologiche e fisiologiche uniche, e che, contrariamente a quanto postulato, proprio per questo potrebbero mostrare un potenziale biocompetitivo eccellente nei confronti di popolazioni microbiche adattate a ecosistemi molto differenti.

Conclusioni e Prospettive

Nel corso di questo lavoro è stato dimostrato che la messa a punto di una procedura ad alta resa per una rapida (e poco costosa) diagnosi di aflatossigenicità in colture di *A. flavus* può essere molto utile non solo per lo screening di popolazioni microbiche, ma anche per lo studio del metabolismo aflatossinico stesso: i dati riportati sono evidenze importanti per la comprensione dei meccanismi che regolano attivazione e inattivazione del pathway biosintetico della tossina, sia in condizioni fisiologiche che durante la competizione inter e intraspecifica. Nei rispetto dei suoi limiti strumentali, la procedura è particolarmente adatta all'osservazione dell'effetto di molecole/composti che interferiscono con l'accumulo della tossina nel terreno. In questa sede sono state saggiate diverse sostanze, sia pure che in miscela, il cui effetto di contenimento sull'aflatossina è stato attribuito ad un potenziale antiossidante intrinseco, ma l'adattabilità della metodica si presta ad una vasta gamma di applicazioni: sotto il profilo della valutazione del potere antiossidante di una molecola, ad esempio, la procedura può rappresentare un valido strumento per vagliare un numero molto elevato di candidati alla ricerca di nuovi composti bioattivi, da impiegare sia in campo farmaceutico (come principi farmacologici nel trattamento terapeutico) che in campo nutraceutico (come integratori), che in campo alimentare (come innalzatori del valore nutrizionale o conservanti naturali), che in ambito cosmetico (sia come stabilizzatori che come droghe nella creazione di linee *naturali*). Restando in campo agronomico, il sistema può essere impiegato in un programma di selezione per l'identificazione di cultivar che producono molecole capaci di contrastare l'accumulo di micotossina, e di conseguenza interessanti per strategie di breeding.

Riteniamo che la proposta di sfruttare *A. flavus* come sistema modello inserito in questo sistema di coltura/rilevamento possa essere vincente sotto molti punti di vista: le argomentazioni qui discusse dimostrano infatti come esso possa considerevolmente contribuire ad una rapida ed efficiente selezione di buoni competitori da includere nella formulazione di bio-pesticidi; un esempio è l'individuazione del ceppo atossigenico TO ϕ , isolato dalla popolazione microbica residente su una coltivazione di mais della Valle del Po e rivelatosi un

ottimo candidato per l'applicazione in campo nella lotta alla contaminazione da aflatossina. Anche se il numero di ceppi fungini vagliati a questo scopo è solo una rappresentazione della comunità di *A. flavus* che colonizza la Pianura Padana, si deve considerare che nei tre anni di screening molto probabilmente sono stati selezionati quei ceppi che ben si sono adattati all'ambiente, predominando sugli altri all'interno della popolazione microbica. Lo stato di avanzamento della sperimentazione del ceppo, tutelato da una garanzia di deposito garantito, è attualmente in una fase di realizzazione di trials in campo per l'ottimizzazione della formulazione di un prototipo disperdibile sulle colture di mais. Come ultima considerazione su questo argomento va ammesso che, su base pluriennale, occorrerebbe monitorare la persistenza delle capacità biocompetitive del ceppo nel corso di stagioni successive di applicazione, per valutare l'esistenza di un qualche eventuale processo adattativo dei ceppi che porta col tempo iniziali buoni competitori ad "appiattirsi" al livello competitivo degli altri afla- della popolazione, forse a causa dell'importanza biologica della biosintesi di aflatossina.

Secondo una logica industriale, invece, l'applicazione del sistema modello è estremamente interessante e vantaggiosa se confrontata con i test chimici (DPPH, TEAC, ORAC, etc.) o a base biologica (dosaggio dei TBARS, dosaggio di perossidi, formazione di dieni coniugati) normalmente impiegati per la determinazione del potere antiossidante di composti/estratti.

Nuovi meccanismi di attività 'antagonista' sulla produzione di aflatossina possono essere indagati: sia lieviti che batteri, infatti, sono in grado di crescere sul terreno a base di cocco qui descritto, dando così la possibilità di condurre esperimenti in cui può essere valutato non solo l'effetto della biocompetizione interspecifica sulla produzione di aflatossina, ma anche un eventuale potenziale di degradazione e/o binding delle stesse da parte di questi microrganismi. Non solo: evidenze preliminari dimostrano che la procedura può essere adattata per il rilevamento di altre micotossine, quali ocratossina A e zearalenone, anch'esse dotate di una fluorescenza naturale sotto eccitazione UV e prodotte da specie fungine che rappresentano una grave minaccia per diverse importanti colture e

per prodotti derivati di varia natura. A questo proposito, attualmente sono in corso prove di ricostruzione per la messa a punto di una strategia di biocompetizione che sfrutta isolati atossigenici di *Penicillium nordicum* per il controllo della contaminazione da ocratossina A su prodotti carnei stagionati.

BIBLIOGRAFIA

Abbas H.K., Zablutowics R.M., Weaver M.A., Horn B.W., Xie W. and Shier W.T. (2004) Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. *Can. J. Microbiol.* **50**:193-199.

Abudulai M., Shepard B.M. and Mitchell P.L. (2001) Parasitism and predation on eggs of *Leptoglossus phyllopus* (L.) (Hemiptera: Coreidae) in Cowpea: impact of Endosulfan Sprays. *J. Agric. Urban Entomol.* **18**: 105-115.

Accinelli C., Saccà M.L., Abbas H.K., Zablutowicz R.M. and Wilkinson J.R. (2009) Use of a granular bioplastic formulation for carrying conidia of a non-aflatoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Bioresour. Technol.* **100**: 3997-4004.

Adye J. and Mateles R.I. (1964) Incorporation of labeled compounds into aflatoxin. *Bioch. Biophys. Acta* **86**: 418-420.

Alpsoy L. (2010) Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. *African J. Biotechnol.* **17**: 2474-2481.

Amaike S. and Keller N.P. (2011) *Aspergillus flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**:107-133.

Arseculeratne S. N., de Silva L. M., Wijesundera S., Bandunatha C.H.S.R. (1969) Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **18**: 88-94.

Bennett J.W. (1983) Differentiation and secondary metabolites in mycelial fungi. In: Bennett J.W. and Ciegler (Eds.) Secondary metabolism and differentiation in fungi. *Marcel Dekker Press, New York.* 1-32.

Berthiller F., Crews C., Dall'asta C., Saeger S.D., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I.P., Seefelder W., Speijers G. and Stroka J. (2012) Masked mycotoxins: A review. *Mol Nutr Food Res*. doi: 10.1002/mnfr.201100764.

Bhatnagar D., Cary J.W., Ehrlich K., Yu J. and Cleveland T.E. (2006) "Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development" *Mycopathologia* **162**: 155-166.

Bhatnagar, D., Zeringue H.J., and Cormick S.P. (1990). Neem leaf extracts inhibit aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. In: Proceedings of the USDA neem workshop (pp. 118-127). Beltsville, Maryland: US Department of Agriculture.

Bigelis R. (1992) Food enzymes. In: Finkelstein D.B. and Ball C. (Eds.), Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Product. Butterworth-Heinemann, Boston, Massachusetts, pp. 361-415.

Blout W.P. (1961) Turkey "X" disease. *Turkeys* **52**: 55-58.

Boermans H.J. and Leung M.C.K. (2007) Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* **119**: 95-101.

Brown R.L., Cotty P.J. and Cleveland T.E. (1991) Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot.* **54**: 623-626.

Burt S. (2004). Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223-253.

Caddick M.X. (1993) Perception and response: phenotypic plasticity in fungi. In: Jennings D.H. (Ed.) Stress tolerance of fungi. *Marcel Dekker Press, New York*. 13-44.

Calvo A., Wilson R.A., Bok J.W. and Keller N.P. (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **66**: 447-459.

Carini M., Aldini G., Orioli M., Maffei Facino R. (2002) Antioxidant and photoprotective activity of a lipophilic extract containing neolignans from *Krameria triandra* roots. *Planta Med.* **68**: 193-197.

Cary J.W. and Ehrlich K.C. (2006) Aflatoxicogenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationship and evolutionary implications. *Mycopathologia* **162**: 167-177.

Chang P.K. (2004) Lack of interaction between *aflR* and *aflJ* contributes to nonaflatoxicogenicity of *Aspergillus sojae*. *J. Biotechnol.* **107**: 245-253.

Chang P.K. and Ehrlich K.C. (2010) What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *Int. J. Food Microbiol.* **138**: 189-199.

Chang P.K., Wilkinson J.R., Horn B.W., Yu J., Bhatnagar D. and Cleveland T.E. (2007) Genes differentially expressed by *Aspergillus flavus* strains after loss of aflatoxin production by serial transfers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**: 917-925.

Chen Z.Y., Brown R.L., Cleveland T.E., Damann K.E. and Russin J.S. (2001) Comparison of constitutive and inducible maize kernel proteins of genotypes resistant or susceptible to aflatoxin production. *J. Food Prot.* **64**: 1785-1792.

Connick Jr. W.J., Daigle D.J., Pepperman A.B., Hebbar K.P., Lumsden R.D., Anderson T.W. and Sands D.C. (1998) Preparation of stable, granular formulations containing *Fusarium oxysporum* pathogenic to narcotic plants. *Biol. Control* **13**: 79-84.

Cotty P.J. (1988a) Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: influence of pH. *Phytopathology* **78**: 1250-1253.

Cotty P.J. (1988b) Simple fluorescence method for rapid estimation of aflatoxin levels in a solid culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 274-276.

Cotty P.J. (1994) Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* **84**: 1270-1277.

Cotty P.J. and Bayman P. (1993) Competitive exclusion of a toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain. *Phytopathology* **83**: 1283-1287.

Cotty P.J. and Bhatnagar D. (1994) Variability among *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2248-2251.

Cotty P.J. and Mellon J.E. (2006) Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. *Mycotox. Res.* **22**: 110-117.

Creppy, E.E. (1999) Human ochratoxicosis. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **18**: 277-293.

Criseo G., Bagnara A. and Bisignano G. (2001) Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 291-295.

Dall'Asta C., Ingletto G., Corradini R., Galaverna G. and Marchelli R. (2003) Fluorescence enhancement of aflatoxins using native and substituted cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macro.* **45**: 257-263.

Das M.K., Ehrlich K.C. and Cotty P.J. (2008) Use of pyrosequencing to quantify incidence of a specific *Aspergillus flavus* strain within complex fungal communities associated with commercial cotton crops. *Phytopathology* **98**: 282-288.

Davies N.D., Iyer S.K. and Diener U.L. (1987) Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1593-1595.

De Vries, J.W., Trucksess M.W. and Jackson L.S. (Eds.) (2002) Mycotoxins and food safety. Kluwer Academic/Plenum Publications, New York, N.Y.

Degola F., Berni E. and Restivo F.M. (2011) Laboratory tests for assessing efficacy of atoxigenic *Aspergillus flavus* strains as biocontrol agents. *Int. J. Food Microbiol.* **146**: 235-243.

Degola F., Berni E., Spotti E. and Restivo F.M. (2009) Facing the problem of “false positives”: re-assessment of a multiplex RT-PCR procedure for the diagnosis of *A. flavus* mycotoxin producers. *Int. J. Food Microbiol.* **129**: 300-305.

Degola F., Berni E., Dall'Asta C., Marchelli R., Spotti E., Ferrero I. and Restivo F.M. (2007) A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 409-417.

Degola F., Dall'Asta C. and Restivo F.M. (2012) Development of a simple and high-throughput method for detecting aflatoxins production in culture media. *Lett. Appl. Microbiol.* **55**: 82-89.

Dorner J.W. (2004) Biological control of aflatoxin contamination of crops. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* **23**: 425-450.

Dorner J.W. (2008) Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Addit. Contam.* **25**: 203-208.

Dorner J.W. (2009) Biological control of aflatoxin contamination in corn using a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *J. Food Protect.* **72**: 801-804.

Dorner J.W. and Lamb M.C. (2006) Development and commercial use of Afla-Guard, an aflatoxin biocontrol agent. *Mycotox. Res.* **22**: 33-38.

Dorner J.W., Cole R.J. and Wicklow D.T. (1999) Aflatoxin reduction in corn through field application of competitive fungi. *J. Food Protect.* **62**: 650-656.

Du W., O'Brian G.R. and Payne G.A. (2007) Function and regulation of *aflJ* in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food Addit. Contam.* **24**: 1043-1050.

Dyer S.K. and McCammon S. (1994) Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. *J. Appl. Bacteriol.* **76**: 75-78.

Ehrlich K.C., Chang P.H., Yu J. and Cotty P.J. (2004) Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **11**: 6518-6524.

Ehrlich K.C. and Cotty P.J. (2004) An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Environ. Biotechnol.* **65**: 473-478.

Ehrlich K.C., Montalbano B.G. and Cotty P.J. (2003) Sequence comparison of *aflR* from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 63-74.

Ehrlich K.C., Montalbano B.G. and Cotty P.J. (2007) Analysis of single nucleotide polymorphism in three genes shows evidence for genetic isolation of certain *Aspergillus flavus* vegetative compatibility groups *Microbiol. Lett.* **268**: 231-236.

Ehrlich K.C., Yu J. and Cotty P.J. (2005) Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 518-527.

Fanelli C., Ricelli A., Reverberi M. and Fabbri A.A. (2004) Aflatoxins and ochratoxins in cereal grain: an open challenge. *Recent Res. Devel. Crop Sci.* **1**: 295-317.

Fente C.M., Ordaz J.J., Vazquez B.I., Franco C.M. and Cepeda A. (2001) New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 58-62.

Fernandes M., Keller N.P. and Adams T.H. (1998) Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **28**: 1355-1365.

Francis O.J. Jr, Kirschenheuter G.P., Ware G.M., Carman A.S. and Kuan S.S. (1988) Beta-cyclodextrin post-column fluorescence enhancement of aflatoxins for reverse-phase liquid chromatographic determination in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**: 725-8.

Frisvad J.C, Frank J.M., Houbraken J.A.M.P., Kuijpers A.F.A. and Samson R.A. (2004) New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section "circumdati" *Studies in Mycology* **50**: 23-43.

Frobish R.A., Bradley B.D., Wagner D.D., Long-Bradley P.E. and Hairston H. (1986) Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Protect.* **49**: 781-785.

Galaverna G., Dall'Asta C., Corradini R., Dossena A. and Marchelli R. (2008) Cyclodextrins as selectors for mycotoxin recognition. *World Mycotox. J.* **1**: 397-406.

Geiser D.M., Dorner J.W., Horn B.W. and Taylor J.W. (2001) The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **31**: 169-179.

Geiser D.M., Pitt J.I. and Taylor J.W. (1998) Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 388-393.

Ghiasian S.A. and Maghsood A.H. (2012) Infants' exposure to aflatoxin M1 from mother's breast milk in Iran. *Iranian J. Publ. Health* **41**: 119-126.

Gibriel Y.A.Y., Hamza A.S. Gibriel A.Y. and Mohsen S.M. (2011) *In vivo* effect of mint (*Mentha viridis*) essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolated from stored corn. *J. Food Safety* **31**: 445-451.

Giorni P., Magan N. and Battilani P. (2009) "Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize" *Int. J. Food Microbiol.* **130**: 213-218.

Gouas D., Shi H. and Hainaut P. (2009) The aflatoxin-induced *TP53* mutation at codon 249 (*R249S*): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Lett.* **286**: 29-37.

Graf E. (1992) Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **13**: 435-48.

Grubisha L.C. and Cotty P.J. (2009) Twenty-four microsatellite markers for the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Molec. Ecol. Resour.* **9**: 264-267.

Harmann D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 1333-1345.

Holmes R.A., Boston R.S. and Payne G.A. (2008) Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**: 559-572.

Honeycutt E.W. and Benson D.M. (2001) Formulation of binucleate *Rhizoctonia* spp. and biocontrol of *Rhizoctonia solani* on impatiens. *Plant Dis.* **85**: 1241-1248.

Horn B.W. (2007) Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: a review." *Food Addit. Contam.* **24**: 1088-1101.

Horn B.W. and Dorner J.W. (2002) Effect of competition and adverse culture conditions on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* through successive generations. *Mycologia* **94**: 741-751.

Horn B.W., Greene, R.L. and Dorner J. (2000) Inhibition of aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus* using nonaflatoxigenic strains: role of vegetative compatibility. *Biological Control* **17**: 147-154.

Horn B.W., Moore G.G. and Carbone I. (2009) Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* **101**: 423-429.

Horn B.W., Ramirez-Prado J.H. and Carbone I. (2009) The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia* **101**: 275-80.

Hsouna A.B. and Alayed A.S. (2012) Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis and *in vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) roots to control pathogen and spoilage bacteria. *African J. Biotechnol.* **11**: 10753-10760.

Huang J.Q., Jiang H.F., Lei Y., Wang S.Y. and Liao B.S. (2008) The metabolic responses of *Aspergillus flavus* to N-Acetylcysteine, ascorbate, and H₂O₂. *Agricultural Sciences in China* **7**: 74-81.

Huang J.Q., Zhou J.Y.Q., Lei Y., Wang S.Y. and Liao B.S. (2009) Ethylene inhibited aflatoxin biosynthesis is due to oxidative stress alleviation and related to glutathione redox state changes in *Aspergillus flavus*. *Int. J. Food Microbiol.* **130**: 17–21.

Hussein H.S. and Brasel J.M. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**:101-134.

Jayashree T. and Subramanyam C. (2000) Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biol. Med.* **29**: 981-985.

Jiang J., Yan L., and Ma Z. (2009) Molecular characterization of an atoxigenic *Aspergillus flavus* strain AF051. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**: 501-505.

Joerger A.C. and Fersht A.R. (2007) Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene* **26**: 2226-2242.

Kabak B., Dobson A.D.W. and Var I. (2006) Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**: 593-619.

Khodadadi F., Panjehkeh N., Ahmadinejad M. and Aminaee M.M. (2011) Genetic variability of toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by RAPD marker. *J. Food Safety* **31**: 439-444.

Kim, J.H., Campbell, B.C., Yu, J., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R.J., Bhatnagar, D. and Cleveland, T.E. (2005) Examination of fungal stress response genes using *Saccharomyces cerevisiae* as a model system: targeting genes affecting aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Appl. Microb. Biotechnol.* **67**: 807-815.

Klich M.A. (2007) *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 713-722.

Kornerup A. and Wanscher J.H. (1978) Methuen Handbook of Colour. Methuen & Co. Ltd: London

Kurtzman, C.P., Smiley M.J., Robnett C.J. and Wicklow D.T. (1986) DNA relatedness among wild and domesticated species of the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* **78**: 955-959.

Kusumoto K., Nogata Y. and Ohta H. (2000) Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. *Curr. Genet.* **37**: 104-111.

LaPrade J.C. and Manwiller A. (1977) Relation of insect damage, vector, and hybrid reaction to aflatoxin B1 recovery from field corn. *Phytopathology* **67**: 544-547.

Lee C., Barnett J. and Reaven P.D. (1998) Liposomes enriched in oleic acid are less susceptible to oxidation and have less proinflammatory activity when exposed to oxidizing conditions. *J. Lipid Res.* **39**: 1239-1247.

Lee Y.H., Tominaga M., Hayashi R., Sakamoto K., Yamada O., *et al.* (2006) *Aspergillus oryzae* strains with a large deletion of the aflatoxin biosynthetic homologous gene cluster differentiated by chromosomal breakage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 339-345.

Leng P., Zhang Z., Pan G. and Zhao M. (2011) Applications and development trends in biopesticides. *African J. Biotechnol.* **86**: 19864-19873.

Leslie J.F. (1993) Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 127-150.

Leung M.C.K., Diaz-Llano G. and Smith T.K. (2006) Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 9623-9635.

Lewis J.A., Larkin R.P. and Rogers D.L. (1998) A formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to reduce damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soilless mix. *Plant Dis.* **82**: 501-506.

Li H., Wang X., Li P., Li Y. and Wang H. (2008) Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *J. Food and Drug Anal.* **16**.

Lledias F., Rangel P and Hansberg W. (1999) Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. *Free Rad. Biol. Med.* **26**: 1396-1404.

Lyn M.E., Abbas H.K., Zablotowicz R.M. and Johnson B.J. (2009) Delivery systems for biological control agents to manage aflatoxin contamination of pre-harvest maize. *Food Addit. Contam.* **26**: 381-387.

Machida M., Yamada O., Gomi K. (2008) Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Research* **15**: 173-183.

Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Edziri H., Haloui E., Fenina N. and Aouni M. (2009) Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. *J. Ethnopharmacol.* **125**: 344-349.

Marzouk B., Marzouk Z., Halouib E., Feninab N., Bouraouic A. and Aounia M. (2010) Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *J. Ethnopharmacol.* **128**: 15-19.

Matsushima K., Chang P.K., Yu J., Abe K., Bhatnagar D., Cleveland T.E. (2001) Pre-termination in *afIR* of *Aspergillus sojae* inhibits aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 585-589.

Mehl H.L. and Cotty P.J. (2010) Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during maize infection. *Phytopathology* **100**: 150-159.

Meimaroglou D.M., Galanopoulou D. and Markaki P. (2009) Study of the effect of methyl-jasmonate concentration on aflatoxin B1 biosynthesis by *Aspergillus parasiticus* in Yeast Extract Sucrose Medium. *Internat. J. Microbiol.* doi:10.1155/2009/842626.

Moye-Rowley W.S. (2003) Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences *Eukaryotic cell* **2**: 381-38.

Narasaiah K.V., Sashidar R.B. and Subramanyam C. (2006) Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediate. *Mycopathologia* **162**: 179-189.

Oluwafemi F.T. (2012) Aflatoxin M1 levels in lactating mothers in two Nigerian cities. *Archives of Clinical Microbiology* Vol 3, No 4.

Packer L., Witt E.H. and Tritschler H.J. (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biol. Med.* **19**: 227-250.

Passone M.A., Resnik S.L. and Etcheverry M.G. (2005) In vitro effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B1 accumulation by peanut *Aspergillus section Flavi*. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 682-691.

Pitt J.I. and Hocking A.D. (1997) *Aspergillus* and related telomorphs. (Eds.) Fungi and Food Spoilage, Academic Press, London.

Pitt J.I. and Hocking A.D. (2006) Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia* **62**: 233-243.

Peraica M., Radic B., Lucic A. and Pavlovic M. (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. W.H.O.* **77**: 754-766.

Polychronaki N., Turner C.P., Mykkanen H., Gong Y., Amra H., Abdel-Wahhab M. and El-Nezami H. (2006) Determinants of AFM1 in breast milk in a selected group of Egyptian mothers. *Food Addit. Contam.* **23**: 700-708.

Puschner B. (2002) Mycotoxins. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **32**: 409-419.

Ramirez-Prado J.H., Moore G.G., Horn B.W. and Carbone I. (2008) Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genet Biol.* **45**: 1292-1299.

Reddy K.R.N., Nurdijati S.B. and Salleh B. (2010) An overview of plant-derived products on control of mycotoxigenic fungi and mycotoxins. *Asian J. Plant Sci.* **9**: 126-133.

Reddy K.R.N., Ch. Surendhar Reddy, Nataraj Kumar P., Reddy C.S. and Muralidharan K. (2009) Genetic variability of aflatoxin B1 producing *Aspergillus flavus* strains isolated from discolored rice grains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 33-39.

Reddy K.R.N., Reddy C.S. and Muralidharan K. (2009) Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control* **20**: 173-178.

Reese B.N., Payne G.A., Nielsen D.M. and Woloshuk C.P. (2011) Gene expression profile and response to maize kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* **101**: 797-804.

Reverberi M., Fabbri A.A., Zjalic S., Ricelli A., Punelli F. and Fanelli C. (2005) Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 207-215.

Reverberi M., Punelli M., Smith C.A., Zjalic S., Scarpari M. *et al.* (2012) How peroxisomes affect aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus Flavus*. *PLoS ONE* **7**: e48097. doi:10.1371/journal.pone.0048097

Reverberi M., Zjalic S., Ricelli A., Punelli F., Camera E. *et al.* (2008) Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene. *Eukaryotic Cell* **7**: 988-1000.

Rodrigues P., Soares C., Kozakiewicz Z., Paterson R.R.M., Lima N. and Venâncio A. (2007) Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins.

In: A. Méndez-Vilas (Eds.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, pp. 527-534.

Rojas T.R., Sampayo C.A.F., Vazquez B.I., Franco C.M. and Cepeda A. (2005) Study interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control* **16**: 445-450.

Rojas-Duran T.R., Fente C.A., Vazquez B.I., Franco C.M., Sanz-Medel A. and Cepeda A. (2007) Study of a room temperature phosphorescence phenomenon to allow the detection of aflatoxigenic strains in culture media. *Int. J. Food. Microbiol.* **115**: 149-158.

Roze L.V., Chanda A., Wee J., Awad D. and Linz J.E. (2011) Stress-related transcription factor Atfb integrates secondary metabolism with oxidative stress response in *Aspergilli*. *J. Biol. Chem.* **286**: 35137-35148.

Samson R.A., Hoekstra E.S. and Frisvad J.C. (2004). Introduction to Food- and Airborne Fungi. 7th edition. *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands*.

Schmidt-Heydt M., Abdel-Hadi A., Magan N. and Geisen R. (2009) “Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature” *Int. J. Food Microbiol.* **135**: 231-237.

Semighini C.P. and Harris S.D. (2008) Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. *Genetics* **157**: 591-600.

Sharma A. and Sharma K. (2012) Protection of maize by storage fungi and aflatoxin production using botanicals. *Ind. J. Natural Prod. Resour.* **3**: 215-221.

Sies H. (1991) Oxidative stress II. In: Sies H. (Ed.) *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Academic Press, London.* 15-22.

Singh A., Srivastava S., Singh H.B. (2007) Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresour. Technol.* **98**: 470-473.

Spotti E., Cacchioli C., Colla F., Beatrisotti M. and Zanardi S. (1999) Growth of *Penicillium verrucosum* in model system based on raw ripened meat products: Ochratoxin A determination and control. *Ind. Cons.* **74**: 113-124.

Svobodová A., Psotová J. and Walterová D. (2003) Natural phenolics in the prevention of uv-induced skin damage. A review. *Biomed. Papers* **147**: 137-145.

Thanaboripat D. (2011) Control of aflatoxins in agricultural products using plant extracts. *KMITL Sci. Tech. J.* **11**: 35-42.

Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. and Kaur H. (2011) Phytochemical screening and extraction: a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia* **1**: 98-106.

Toda S., Kimura M. and M. Ohnishi (1991) Effects of phenolcarboxylic Acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Med.* **57**: 8-10.

Tran-Dinh N., Pitt J.I. and Carter D.A. (1999) Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycol. Res.* **103**: 1485-1490.

Tsitsigiannis D.I., Dimakopoulou M., Antoniou P.P. and Tjamos E.C. (2012) Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathol. Medit.* **51**: 158-174.

Tsitsigiannis D.I., Georgiadou M., Agoritsis S., Zakynthinos G., Varzakas T.H., et al. (2010) Ecology, epidemiology and control of *Aspergillus* spp. in pistachio orchards in Greece. *Petria* **20**: 95-96.

Varga J., Frisvad J.C. and Samson R.A. (2011) Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology* **69**: 57-80.

Vasquez M.L., Franco C.M., Cepeda A., Prognon P. and Mahuzier, G. (1992) Liquid chromatographic study of the interaction between aflatoxins and β -cyclodextrin. *Anal Chim Acta* **269**: 239-247.

Versar (1991) Screening level exposure assessment of *aspergillus* species for 5(h)(4) exemption under the proposed biotechnology rule. *Unpublished*, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

Watson A.J., Fuller L.J., Jeenes D.J. and Archer D.B. (1999) Homologs of aflatoxin biosynthesis genes and sequence of *afIR* in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 307-310.

Wicklow D.T. and Horn B.W. (2007) Association between vegetative compatibility and aflatoxin production by *Aspergillus* species during intraspecific competition. *Mycoscience* **48**: 267-273.

Wicklow D.T., Wilson D.M. and Nelsen T.C. (1993) Survival of *Aspergillus flavus* sclerotia and conidia buried in soil in Illinois or Georgia. *Phytopathology* **83**: 1141-1147.

Woloshuk C.P., Foutz K.R., Brewer J.F., Bhatnagar D., Cleveland T.E. *et al.* (1994). Molecular characterization of *aflR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2408-2414.

Yin Y., Yan L., Jiang J. and Ma Z. (2008) Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University. Science B* **9**: 787-792.

Yong J.W.H., Ge L., Ng Y.F. and Tan S.N. (2009) The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* **14**: 5144-5164.

Yuan G.F., Liu C.S. and Chen C.C. (1995) Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2384-2387.

Zuber M.S. and Lillehoj E.B. (1979) Status of the aflatoxin problem in corn. *J. Environ. Qual.* **8**: 1-5.

SITOGRAFIA

- [1] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:02006R1881-20100701:IT:NOT>
- [2] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006R0401:IT:NOT>
- [3] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32002L0032:IT:NOT>
- [4] <http://www.iss.it/mico/norm/cont.php?id=24&lang=1&tipo=47>
- [5] <http://www.fao.org>
- [6] <http://www.aflasafe.com/home>
- [7] <http://www.google.com/patents/US5171686>
- [8] <http://naldc.nal.usda.gov/download/6007/PDF>
- [9] <https://docs.google.com/a/google.com/viewer?url=www.google.com/patents/US6027724.pdf>
- [10] file:///F:/A_oryzae/EPA%20Risk%20assessment.htm

Materiale Supplementare

**Livelli massimi tollerabili di aflatossina M1 negli alimenti a base di latte
(Decreto Legislativo 149/2004)**

Prodotti destinati all'alimentazione animale	Valore Limite in mg/Kg (tasso di umidità del 12%)
Tutte le materie prime per mangimi	0.02
Mangimi Completi per bovini, ovini e caprini ad eccezione di:	0.02
- Mangimi Completi per animali da latte	0.005
- Mangimi Completi per vitelli e agnelli	0.01
Mangimi Completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0.02
Altri Mangimi Completi	0.01
Mangimi Complementari per bovini, ovini e caprini (ad eccezione dei complementari per animali da latte, vitelli e agnelli)	0.02
Mangimi Complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0.02
Altri Mangimi Complementari	0.005

**Limiti Massimi Tollerabili di
aflatossine (Direttiva 2006/1881/CE)**

Prodotto	B1	B1+B2+G 1+G2	M1
Arachidi, frutta a guscio, frutta secca e relativi prodotti derivati destinati al consumo umano diretto	2	4	
Arachidi da sottoporre a cernita	8	15	
Frutta a guscio e frutta secca da sottoporre a cernita	5	10	
Cereali e prodotti derivati eccetto granturco e alimenti per l'infanzia	2	4	
Granturco da sottoporre a cernita	5	10	
Cereali e alimenti per lattanti e bambini	0.10		
Alimenti e latte per lattanti			0.025
Latte crudo e trattato termicamente			0.050
Spezie	5	10	
Alimenti dietetici	0.10		0.025

SUPERFICI E PRODUZIONI DI MAIS IN ITALIA

Provincia	MAIS					
	Superficie (ettari)		Prod. totale (ql)		Variazione %	
	2009	2010	2009	2010	Sup	Prod.
Piemonte	173.090	186.830	12.033.393	15.883.725	7,94	32,00
Valle d'Aosta	20	20	1.200	900	0,00	-25,00
Lombardia	238.304	220.487	25.276.248	24.714.660	-7,48	-2,22
Trentino-Alto Ad.	340	1.410	11.695	37.596	314,71	221,47
Veneto	234.752	231.649	23.003.696	22.168.349	-1,32	-3,63
Friuli-Ven. Giu.	72.935	90.461	5.746.156	8.721.496	24,03	51,78
Liguria	270	260	12.400	12.000	-3,70	-3,23
Emilia-Romagna	101.356	98.800	9.283.870	9.724.200	-2,52	4,74
Toscana	19.210	21.517	1.044.660	1.651.188	12,01	58,06
Umbria	16.551	13.674	1.669.864	1.311.191	-17,38	-21,48
Marche	8.050	7.198	471.803	473.875	-10,58	0,44
Lazio	23.950	19.855	1.834.000	1.537.911	-17,10	-16,14
Abruzzo	1.413	7.710	121.319	647.800	445,65	433,96
Molise	1.142	886	32.623	29.199	-22,42	-10,50
Caserta	5.919	5.835	562.290	552.290	-1,42	-1,78
Campania	17.553	16.910	1.185.384	1.181.090	-3,66	-0,36
Puglia	980	878	65.900	61.400	-10,41	-6,83
Basilicata	1.360	934	65.178	41.368	-31,32	-36,53
Calabria	4.019	4.158	140.160	214.530	3,46	53,06
Sicilia	476	650	39.162	55.900	36,55	42,74
Sardegna	387	800	26.941	48.628	106,72	80,50
ITALIA	916.158	925.087	82.065.652	88.517.006	0,97	7,86

Fonte: elaborazione dati ISTAT

SUPERFICI E PRODUZIONI CEREALICOLE IN EUROPA

	GRANO TENERO								GRANO DURO								ORZO								MAIS											
	Sup. (1.000 Ha)				Produzione (1.000 Ton)				Variazione % 2010-2009				Sup. (1.000 Ha)				Produzione (1.000 Ton)				Variazione % 2010-2009				Sup. (1.000 Ha)				Produzione (1.000 Ton)				Variazione % 2010-2009			
	2010	2009	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.				
	2010	2009	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.	2010	2009	2010	2009	Sup.	Prod.				
Austria	276	292	1.413	1.460	2.025	2.22	-5,48	-3,22	18	17	79	66	5,88	19,70					169	182	779	833	55	64	495	544	-14,06	-9,01	68	70	1.887	1.112	-11,50	-7,48		
Belgio/Lux.	230	225	1.955	2.025	5.996	5.996	-3,38	-15,69											620	594	2.988	3.428	416	562	1.331	2.164	-25,98	-38,49	1.549	1.710	13.585	15.202	-9,42	-10,64		
Danimarca	714	739	5.055	5.996	902	902	-3,64	-19,40											416	562	1.331	2.164	1.590	1.879	10.208	13.003	-15,38	-21,50	464	464	4.074	4.527	0,00	-10,01		
Finlandia	212	220	727	902	36.553	3.90	-2,43		502	415	2.485	2.083	20,96	19,30					1.590	1.879	10.208	13.003	1.653	1.878	10.412	12.288	-11,98	-15,27	150	240	1.050	1.920	-37,50	-45,31		
Francia	4.926	4.741	35.664	36.553	25.190	3.13	-4,57		21	11	114	65	90,91	75,38					1.653	1.878	10.412	12.288	150	180	225	342	-16,67	-34,21								
Germania	3.327	3.226	24.040	25.190	488	488	-2,56	-26,02		560	896	1.120	0,00	-20,00					150	180	225	342	165	169	1.064	1.104	-2,37	-3,62	915	930	8.784	8.649	-1,61	1,56		
Grecia	190	195	361	488	490	490	51,79	51,02											280	310	980	1.020	37	45	236	313	-17,78	-24,60	27	27	297	340	0,00	-12,65		
Irlanda	85	56	740	490	3.000	3.000	-6,67	-1,63		1.250	1.300	3.688	3.705	-3,85	-0,46				37	45	236	313	33	41	51	74	-19,51	-31,08	88	95	648	666	-7,37	-2,70		
Italia	560	600	2.951	3.000	1.404	1.404	3,97	-3,85											2.855	3.058	8.052	7.440	2.855	3.058	8.052	7.440	-6,64	8,23	324	341	3.204	3.462	-4,99	-7,45		
Paesi Bassi	157	151	1.350	1.404	86	86	-19,23	-31,40		6	7	10	13	-14,29	-23,08				311	361	1.216	1.677	922	1.160	5.163	6.767	-20,52	-23,70								
Portogallo	42	52	59	86	3.446	3.446	14,54	28,85											311	361	1.216	1.677	922	1.160	5.163	6.767	-20,52	-23,70								
Spagna	1.434	1.252	4.440	3.446	2.284	2.284	8,00	-4,77											922	1.160	5.163	6.767	28	34	45	51	-17,65	-11,76								
Svezia	405	375	2.175	2.284	14.833	14.388	6,39	3,09		6	5	12	8	20,00	50,00				28	34	45	51	389	455	1.678	2.002	-14,51	-16,18	115	105	771	893	9,52	-13,66		
Regno Unito	1.931	1.815	4.295	4.358	342	342	7,89	-0,88		37	9	178	46	311,11	286,96				389	455	1.678	2.002	133	140	299	378	-5,00	-20,90								
Cipro	834	831	4.295	4.358	0,36	0,36	-1,45		15	13	49	48	15,38	2,08					133	140	299	378	287	321	967	1.063	-10,59	-9,03	1.117	1.179	7.473	7.546	-5,26	-0,97		
Rep. Ceca	123	114	339	342	7,89	7,89	-0,88												81	105	162	263	204	277	551	859	-26,35	-35,86	8	6	29	24	33,33	20,83		
Estonia	996	1.146	3.715	4.424	-13,09	-16,03													204	277	551	859	1	1	3	3	0,00	0,00								
Ungheria	298	286	1.013	1.030	4,20	4,20	-1,65		0	2	0	9	-100,00	-100,00					1	1	3	3	1.100	1.157	3.421	3.957	-4,93	-13,55	300	274	1.746	1.699	9,49	2,77		
Lettonia	503	480	1.861	2.160	4,79	-13,84													1.100	1.157	3.421	3.957	143	192	389	691	-25,52	-43,70	179	162	1.146	956	10,49	19,87		
Lituania	2.380	2.364	9.282	9.716	0,68	-4,47			19	8	82	33	137,50	148,48					143	192	389	691	21	20	85	72	5,00	18,06	39	40	296	300	-2,50	-1,33		
Malta	330	371	1.188	1.484	-11,05	-19,95													21	20	85	72	472	504	1.201	1.210	-6,35	-0,74	2.200	2.268	8.000	7.484	-3,00	6,89		
Polonia	35	35	154	137	0,00	12,41			5	8	11	13	-37,50	-15,38					472	504	1.201	1.210	225	257	763	858	-12,45	-11,07	282	278	1.684	1.273	1,44	32,29		
Slovacchia	2.050	2.244	6.765	5.991	-8,65	12,92			26	27	86	92	-3,70	-6,52					225	257	763	858	12.340	13.946	52.764	62.401	-11,52	-15,44	8.005	8.367	55.135	57.563	-4,33	-4,22		
Slovenia	1.032	1.114	3.695	3.615	-7,36	2,21																														
Romania	23.070	22.924	128.071	130.969	0,64	-2,21			2.938	2.911	8.600	8.611	0,93	-0,13																						
Bulgaria	1.032	1.114	3.695	3.615	-7,36	2,21																														
EU -27	23.070	22.924	128.071	130.969	0,64	-2,21			2.938	2.911	8.600	8.611	0,93	-0,13																						

Fonte: elaborazione dati Cocereal - dicembre 2010

SUPERFICI E PRODUZIONI CEREALICOLE NEL MONDO

	GRANO TENERO						GRANO DURO						ORZO						MAIS											
	Sup. (1.000 Ha)			Produzione (1.000 Ton)			Variazione % 2010-2009			Sup. (1.000 Ha)			Produzione (1.000 Ton)			Variazione % 2010-2009			Sup. (1.000 Ha)			Produzione (1.000 Ton)			Variazione % 2010-2009					
	2010	2009	Prod.	2010	2009	Prod.	2010	2009	Prod.	2010	2009	Prod.	2010	2009	Prod.	2010	2009	Prod.	2010	2009	Prod.	2010	2009	Prod.	2010	2009	Prod.			
Austria	276	292	1.413	1.460	-5,48	-3,22				18	17	79	66	5,88	19,70				169	182	779	833	-7,14	-6,48	180	178	1.670	1.887	1,12	-11,50
Belgio/Lux.	230	225	1.955	2.025	2,22	-3,46													55	64	495	544	-14,06	-9,01	68	70	680	735	-2,86	-7,48
Danimarca	714	739	5.055	5.996	-3,38	-15,69													620	594	2.988	3.428	4,38	-12,84						
Finlandia	212	220	727	902	-3,64	-19,40													416	562	1.331	2.164	-25,98	-38,49						
Francia	4.926	4.741	35.664	36.553	3,90	-2,43				502	415	2.485	2.083	20,96	19,30				1.590	1.879	10.208	13.003	-15,38	-21,50	1.549	1.710	13.585	15.202	-9,42	-10,64
Germania	3.327	3.226	24.040	25.190	3,13	-4,57				21	11	114	65	90,91	75,38				1.653	1.878	10.412	12.288	-11,98	-15,27	464	464	4.074	4.527	0,00	-10,01
Grecia	190	195	361	488	-2,56	-26,02				560	560	896	1.120	0,00	-20,00				150	180	225	342	-16,67	-34,21	150	240	1.050	1.920	-37,50	-45,31
Irlanda	85	56	740	490	51,79	51,02													165	169	1.064	1.104	-2,37	-3,62						
Italia	560	600	2.951	3.000	-6,67	-1,63				1.250	1.300	3.688	3.705	-3,85	-0,46				280	310	980	1.020	-9,68	-3,92	915	930	8.784	8.649	-1,61	1,56
Paesi Bassi	157	151	1.350	1.404	3,97	-3,85													37	45	236	313	-17,78	-24,60	27	27	297	340	0,00	-12,65
Portogallo	42	52	59	86	-19,23	-31,40				6	7	10	13	-14,29	-23,08				33	41	51	74	-19,51	-31,08	88	95	648	666	-7,37	-2,70
Spagna	1.434	1.252	4.440	3.446	14,54	28,85				473	529	912	1.311	-10,59	-30,43				2.855	3.058	8.052	7.440	-6,64	8,23	324	341	3.204	3.462	-4,99	-7,45
Svezia	405	375	2.175	2.284	8,00	-4,77													311	361	1.216	1.677	-13,85	-27,49						
Regno Unito	1.931	1.815	14.833	14.388	6,39	3,09													922	1.160	5.163	6.767	-20,52	-23,70						
Cipro										6	5	12	8	20,00	50,00				28	34	45	51	-17,65	-11,76						
Rep. Ceca	834	831	4.295	4.358	0,36	-1,45				37	9	178	46	311,11	286,96				389	455	1.678	2.002	-14,51	-16,18	115	105	771	893	9,52	-13,66
Estonia	123	114	339	342	7,89	-0,88													133	140	299	378	-5,00	-20,90						
Ungheria	996	1.146	3.715	4.424	-13,09	-16,03				15	13	49	48	15,38	2,08				287	321	967	1.063	-10,59	-9,03	1.117	1.179	7.473	7.546	-5,26	-0,97
Lettonia	298	286	1.013	1.030	4,20	-1,65													81	105	162	263	-22,86	-38,40						
Lituania	503	480	1.861	2.160	4,79	-13,84													204	277	551	859	-26,35	-35,86	8	6	29	24	33,33	20,83
Malta										0	2	0	9	-100,00	-100,00				1	1	3	3	0,00	0,00						
Polonia	2.380	2.364	9.282	9.716	0,68	-4,47													1.100	1.157	3.421	3.957	-4,93	-13,55	300	274	1.746	1.699	9,49	2,77
Slovacchia	330	371	1.188	1.484	-11,05	-19,95				19	8	82	33	137,50	148,48				143	192	389	691	-25,52	-43,70	179	162	1.146	956	10,49	19,87
Slovenia	35	35	154	137	0,00	12,41													21	20	85	72	5,00	18,06	39	40	296	300	-2,50	-1,33
Romania	2.050	2.244	6.765	5.991	-8,65	12,92				5	8	11	13	-37,50	-15,38				472	504	1.201	1.210	-6,35	-0,74	2.200	2.268	8.000	7.484	-3,00	6,89
Bulgaria	1.032	1.114	3.695	3.615	-7,36	2,21				26	27	86	92	-3,70	-6,52				225	257	763	858	-12,45	-11,07	282	278	1.684	1.273	1,44	32,29
EU-27	23.070	22.924	128.071	130.969	0,64	-2,21				2.938	2.911	8.600	8.611	0,93	-0,13				12.340	13.946	52.764	62.401	-11,52	-15,44	8.005	8.367	55.135	57.563	-4,33	-4,22

Fonte: elaborazione dati Cocereal - dicembre 2010

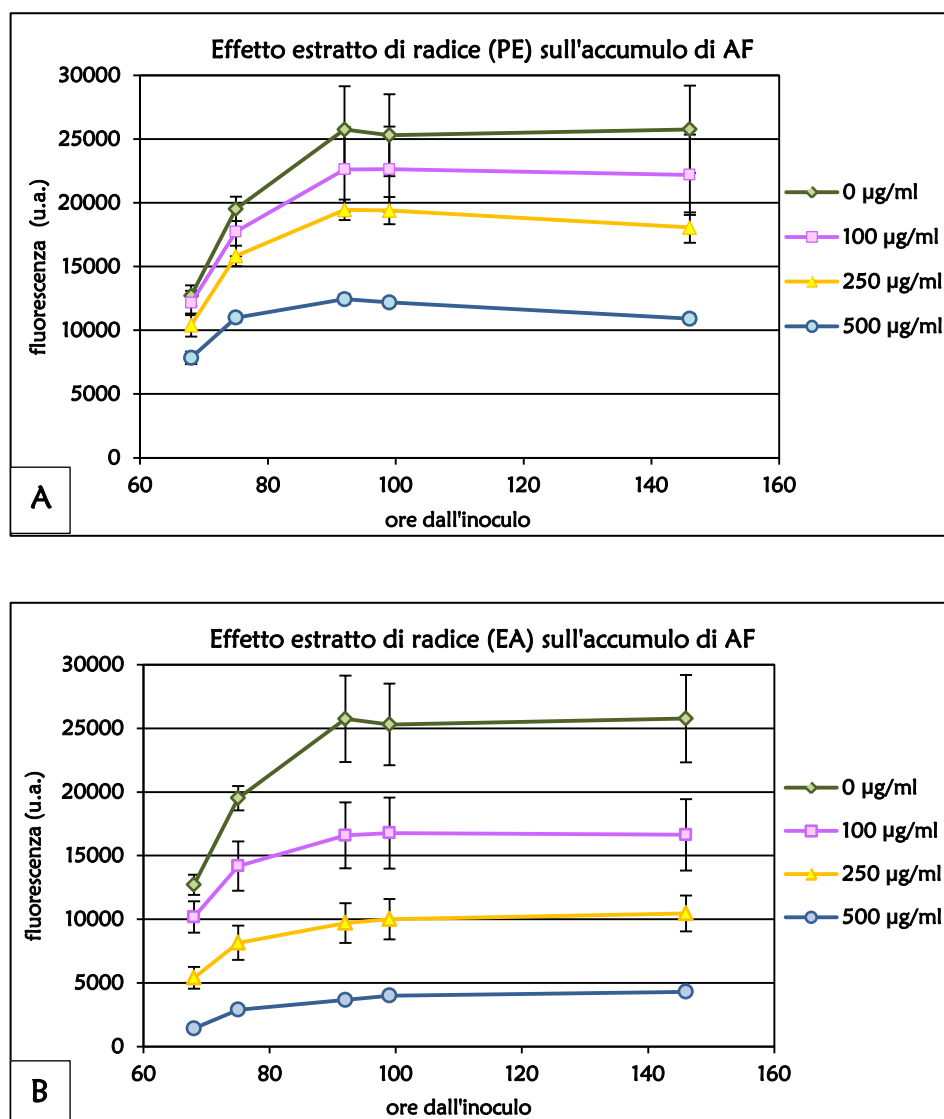


Fig. S-1: Accumulo AFB in presenza di estratti organici di radice di *C. colocynthis*. Gli estratti sono stati solubilizzati in EtOH e aggiunti, al momento dell'inoculo, ad una coltura CCM di Fri2+ in concentrazioni crescenti (100-500µg/ml w/v finali). L'accumulo di AF è stato monitorato a partire dalle 63h di incubazione fino alla stabilizzazione definitiva del plateau (146h). Le curve corrispondono alla cinetica di accumulo AF in presenza degli estratti organici in **A)** etere di petrolio (PE); **B)** etil-acetato (EA). I valori di fluorescenza sono normalizzati per il valore di una coltura analoga di afla-. La deviazione standard è calcolata su 6 repliche per campione.

Ceppo	Sclerozi	Specie	AF	Provenienza	Rad. Growth (cm/g)
MAM13		<i>A. flavus</i>	+		0.60±0.07
TOφ		<i>A. flavus</i>	-	mais (Piemonte)	0.48±0.09
SF2		<i>A. flavus</i>	+	farina (Italia)	0.68±0.15
Fri2+	L	<i>A. flavus</i>	+	farina di mais (Friuli)	0.43±0.09
Fri7	L	<i>A. flavus</i>	-	“”	0.40±0.12
Fri8+		<i>A. flavus</i>	+	“”	0.51±0.05
Fri9		<i>A. flavus</i>	-	“”	0.44±0.13
Fri10+	L	<i>A. flavus</i>	+	“”	0.56±0.05
AT1+		<i>A. flavus</i>	+	“”	0.59±0.05
AT2		<i>A. flavus</i>	-	“”	0.63±0.14
AT3		<i>A. flavus</i>	-	“”	0.60±0.02
UD3		<i>A. flavus</i>	-	“”	0.50±0.03
193K		<i>A. flavus</i>	-	mais (Italia)	0.38±0.18
MN1		<i>A. flavus</i>	-	mais (Mantova)	0.35±0.20
Emi10+	L	<i>A. flavus</i>	+	mais (Parma)	0.39±0.25
3A+		<i>A. flavus</i>	+	mais bio (Parma)	0.48±0.04
696A		<i>A. flavus</i>	-	mais (EU)	0.35±0.25
Lom3		<i>A. flavus</i>	-	farina (Lombardia)	0.56±0.07
VR3+	L	<i>A. flavus</i>	+	mais (Veneto)	0.66±0.12
Ven4+		<i>A. flavus</i>	+	farina mais (Veneto)	0.51±0.10
Pie1	L	<i>A. flavus</i>	-	farina mais (Piemonte)	0.46±0.15
Pie5	L	<i>A. flavus</i>	-	“”	0.56±0.06
Pie9		<i>A. flavus</i>	-	“”	0.49±0.20
Pie10+		<i>A. flavus</i>	+	“”	0.40±0.05
BS07		<i>A. flavus</i>	-	“”	0.58±0.14
TN3+		<i>A. flavus</i>	+	mais (Trentino)	0.58±0.05
NR1+	L	<i>A. flavus</i>	+	mais (Reggio E.)	0.65±0.08
NR4	L	<i>A. flavus</i>	-	“”	0.60±0.11
NR8	L	<i>A. flavus</i>	-	“”	0.69±0.09
NR11	L	<i>A. flavus</i>	-	“”	0.67±0.07
Pol10+	L	<i>A. flavus</i>	+	mais (Polonia)	0.53±0.13
Pol13+		<i>A. flavus</i>	+	“”	0.63±0.05
Lok11+	L	<i>A. flavus</i>	+	mais (Madagascar)	0.57±0.13
Lok20+	L	<i>A. flavus</i>	+	“”	0.49±0.10
Lok22+	L	<i>A. flavus</i>	+	“”	0.56±0.26
Lok18		<i>A. oryzae</i>	-	“”	0.63±0.07
NRRL2999		<i>A. parasiticus</i>	+		

Tabella S-1: Elenco dei ceppi utilizzati. In tabella sono riportati i ceppi di collezione e gli isolati utilizzati, con le loro caratteristiche di aflatossigenicità, accrescimento radiale e classificazione L/S sulla base del diametro degli sclerozi.

