



Consiglio Nazionale delle Ricerche
ISTITUTO DI SCIENZE DELLE PRODUZIONI ALIMENTARI

Al Consiglio Nazionale delle Ricerche

Direzione Generale

Ufficio Paesi Industrializzati – Organismi Int. li

P.le Aldo Moro, 7

00185 ROMA

OGGETTO: Relazione scientifica sull'attività di ricerca svolta dal dott. Giuseppe Cozzi presso il Laboratory for Aflatoxin Reduction in Crops - Agricultural Research Service, USDA, Department of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson, USA, nel periodo 3-25 Novembre, nell'ambito del Programma Short-Term Mobility 2008

Titolo del Programma: *Valutazione del rischio di contaminazione da aflatossine nel mais in Italia e selezione di potenziali candidati per la lotta biologica*

Le attività scientifiche svolte durante la permanenza nel laboratorio dell'USDA - University of Arizona di Tucson guidato dal Dr. Peter J. Cotty, hanno avuto come **obiettivo** quello di caratterizzare con metodi biologici e chimici popolazioni italiane di *Aspergillus* sezione *Flavi*, isolate da mais e raccolte negli anni 2003/07, al fine di definire il potenziale rischio tossicologico e di selezionare isolati non tossigeni come potenziali candidati alla lotta biologica. L'USDA dell'Arizona è infatti noto a livello internazionale per aver raggiunto una significativa riduzione della contaminazione da aflatossine (sia negli Stati Uniti che in diversi Paesi africani) mediante l'uso in campo di formulati a base di tali isolati di *A. flavus* non tossigeni per un controllo delle popolazioni tossigene. Al fine di perseguire l'obiettivo sopra citato, l'**approccio** di partenza è stato quello di iniziare a caratterizzare i ceppi italiani di *Aspergillus* sezione *Flavi* isolati da mais da un punto biologico con la tecnica dei gruppi di compatibilità vegetativa (VCGs) e da un punto di vista chimico saggiandone la capacità di produzione *in vitro* di aflatossine.

Sede Istituzionale: Via Amendola, 122/O – 70126 Bari (Italy); Tel. 080 5929365, Fax 080 5929374

U.O.: Lecce (Tel. 0832 422600), Milano (Tel. 02 50316685), Sassari (Tel. 079 233466), Torino (Tel. 011 6709230)



Esperimenti. La capacità di produzione *in vitro* di aflatossine è stata saggiata per 53 ceppi di *Aspergillus* della sezione *Flavi*, molti dei quali della collezione dell'Istituto di Entomologia e Patologia vegetale – Università Cattolica di Piacenza, isolati da mais da diverse zone a vocazione maidicola italiana e depositati nella collezione microbiologica ITEM (<http://www.ispa.cnr.it/Collection>) dell'ISPA, e su 3 ceppi di *A. flavus* degli USA (Tabella 1).

Caratterizzazione chimica. Gli isolati sono stati accresciuti sul substrato liquido (permissivo) di Adye e Mateles (Adye & Mateles 1964) con 3g /litro di $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (ammonio) come unica fonte di azoto. Beute di Erlenmeyer (250 ml) contenenti 70 ml di substrato sterile sono state inoculate con 100 μl di sospensione conidica di ciascun isolato e incubate per 5 giorni a 31 °C al buio come colture agitate (150 rpm). Dopo incubazione, 50 ml di acetone sono stati addizionati alle colture e 4 μl di ogni filtrato colturale sono stati deposti direttamente su lastre cromatografiche TLC (Silica gel 60, EMD) adiacenti a uno standard di aflatossine (Aflatoxin Mix Kit-M, Supelco) contenente una miscela di aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂. Le lastre TLC sono state sviluppate con la seguente fase mobile: ethyl ether-metanolo-acqua 96:3:1. Le aflatossine sono state quantificate tramite un densitometro della Camag TLC scanner 3 ad una lunghezza d'onda di 366 nm. Cento ml dei filtrati colturali che risultavano negativi per le aflatossine sono stati posti in imbuto separatori da 250 ml aggiungendo un uguale volume di H₂O e sono stati estratti per 2 volte con methilene chloride. Gli estratti sono stati quindi fatti passare su solfato di sodio anidro per rimuovere eventuali residui acquosi e portati a secco sotto cappa chimica. I residui degli estratti opportunamente ripresi in methilene chloride sono stati nuovamente analizzati per il contenuto di aflatossine tramite la TLC. Il limite di rilevabilità è stato di 1 ppb aflatossina B₁/ ml di coltura.

Dai dati di produzione *in vitro* di aflatossine è risultato che il 34% dei ceppi saggiati non è produttore e che oltre il 10% degli isolati ha prodotto una quantità di aflatossine inferiore ai 100 ng/ml. Circa un terzo degli isolati hanno prodotto aflatossine comprese tra 100 e 1000 ng/ml, mentre solo il 20% dei ceppi ha prodotto aflatossine > 1000 ng/ml. Inoltre, mentre tutti i ceppi positivi per la produzione di aflatossine sono risultati produttori della aflatossina B₁, solo il 25% di essi è risultato produttore anche della aflatossina B₂. In nessuno dei ceppi italiani saggiati è stata rilevata la presenza delle aflatossine G₁ e G₂.



Tabella 1. Produzione di aflatossine di ceppi italiani di *Aspergillus* sezione *Flavi* in medium liquido contenente ammonio come unica fonte di azoto

Isolato	Aflatossina B ₁ (ng/ml)	Aflatossina B ₂ (ng/ml)	Isolato	Aflatossina B ₁ (ng/ml)	Aflatossina B ₂ (ng/ml)
ITEM 8953	2238.7	86.1	ITEM 9654	13.1	1.8
ITEM 8955	2917.7	106.2	ITEM 8960	9.2	38.6
ITEM 8081	4895.4	183	ITEM 8959	6.9	-
ITEM 9641	643.9	-	ITEM 9657	6.0	19.2
ITEM 9644	352.9	-	ITEM 9651	373.6	-
ITEM 9635	460.4	-	ITEM 9661	893.5	-
ITEM 9650	2122.3	102.7	ITEM 8957	339.0	-
ITEM 9638	690.8	-	ITEM 9636	-	-
ITEM 9647	700.3	-	ITEM 8094	-	-
ITEM 9643	596.1	-	ITEM 8079	-	-
ITEM 9660	506.5	-	ITEM 8963	-	-
ITEM 8080	577.6	-	ITEM 9655	-	-
ITEM 9645	392.4	-	ITEM 8070	-	-
ITEM 9649	1211.9	-	ITEM 8951	-	-
ITEM 8956	721.6	-	ITEM 9646	-	-
ITEM 9639	832.7	-	ITEM 8063	-	-
ITEM 9653	286.7	-	ITEM 9658	-	-
ITEM 8954	940.4	75.4	ITEM 8072	-	-
ITEM 9652	268.0	-	ITEM 8952	-	-
ITEM 8071	2679.6	190.7	ITEM 8066	-	-
ITEM 9640	1350.8	-	ITEM 8961	-	-
ITEM 8958	3553.4	-	ITEM 8950	-	-
ITEM 8101	1454.8	-	ITEM 9656	-	-
ITEM 9637	765.3	-	ITEM 8088	-	-
ITEM 9648	491.8	-	ITEM 8949	-	-
ITEM 9642	2215.4	-	AF 13*	10143.7	573.3
ITEM 9659	38.9	-	AF 70*	7937.7	668.4
ITEM 8962	32.7	-	2999* **	79065.1	3050.5

* isolati provenienti da collezione USA; ** unico isolato produttore di aflatossina G₁ (2473,7 ng/ml)

Gruppi di compatibilità vegetativa. E' stata iniziata la caratterizzazione dei ceppi italiani di *Aspergillus* sezione *Flavi* da un punto di vista biologico con la tecnica dei gruppi di compatibilità vegetativa (VCGs). In molti funghi filamentosi, gli individui fisiologicamente distinti della stessa specie possono fondersi per formare un eterocarion. Quando l'eterocarion è stabile, si parla di compatibilità vegetativa, e i due individui appartengono allo stesso gruppo VCG. La compatibilità vegetativa (o da *eterocarion*) ha una base genetica di multilocus che è stata studiata in organismi



Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISTITUTO DI SCIENZE DELLE PRODUZIONI ALIMENTARI

modello, quali *Neurospora*, *Aspergillus* e *Podospora* (Bègueret et al., 1994; Leslie, 1993). La compatibilità vegetativa viene utilizzata per lo studio della variabilità intraspecifica delle popolazioni fungine, e viene impiegata in studi di patogenicità (Puhalla, 1985) e di dinamica di popolazioni e lotta biologica.

Il lavoro di caratterizzazione con la tecnica VCGs ha riguardato 30 isolati italiani di *Aspergillus* sezione *Flavi* della collezione microbiologica ITEM (<http://www.ispa.cnr.it/Collection>) dell'ISPA, scelti per la caratteristica di non essere produttori di aflatoxine. I ceppi inoculati su Selection Medium e incubati per 3 settimane a 31 °C al buio hanno consentito di ottenere mutanti (Nit⁻) che inoculati contemporaneamente sui substrati MIT (Chlorate Medium), HYP (Hypoxanthine), NO₂ medium e NO₃ medium hanno permesso di identificare un totale di circa 90 mutanti tra i tipi *niaD*, *nirA* e *cnx*. I mutanti ottenuti sono stati spediti presso la sede di Bari dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (CNR-ISPA) e costituiscono la base per un lavoro programmato da sviluppare presso l'Istituto.

Il periodo trascorso presso la University of Arizona di Tucson, ha inoltre consentito al Dr. Cozzi di prendere contatti con valenti studiosi del laboratorio dell'USDA, di acquisire metodologie e tecniche specialistiche di laboratorio e di porre le basi per avviare una fattiva collaborazione con l'Istituto ospitante.

Bibliografia

- A dye, J., and R. I. Mateles, 1964. Incorporation of labeled compounds into aflatoxins. *Biochim. Biophys. Acta* 86:418-420;
Bègueret, J., Turcq B. and Clavè C., 1994. Vegetative Incompatibility in Filamentous Fungi: het genes begin to talk. *Trends in Genetics* 10: 441-446;
Leslie, J.F., 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopath.* 31: 127-150;
Puhalla, J.E., 1985. *Can. J. Bot.* 63: 179-183.

Fruitore del Programma

Dott. Giuseppe Cozzi

Per presa visione, il Proponente del Programma

Dott. Antonio Francesco Logrieco

Bari, 23.02.2009

Sede Istituzionale: Via Amendola, 122/O – 70126 Bari (Italy); Tel. 080 5929365, Fax 080 5929374

U.O.: Lecce (Tel. 0832 422600), Milano (Tel. 02 50316685), Sassari (Tel. 079 233466), Torino (Tel. 011 6709230)