

Relazione della Dr.ssa Antonia Susca per il periodo di ricerca svolto dal 10/05/2017 al 31/05/2017 presso l'istituto National Center for Agricultural Utilization Research dell'USDA-Agricultural Research Service di Peoria - IL nell'ambito del Programma CNR Short Term Mobility 2016.

Titolo del progetto: Studio della diversità genetica di specie fungine tossigene di *Fusarium* e *Aspergillus* contaminanti i cereali.

Descrizione del progetto:

Lo studio della biodiversità genetica tra specie strettamente correlate, e all'interno dei complessi di specie, è particolarmente importante per la comprensione dei meccanismi evolutivi che determinano la differenziazione delle specie, la loro patogenicità e specializzazione sull'ospite. Sebbene i cluster biosintetici dei metaboliti secondari (MS) hanno una complessa storia evolutiva, non sempre coerente con le relazioni filogenetiche tra le specie appartenenti ad uno stesso genere, lo studio delle caratteristiche genetiche contribuisce a chiarire le basi della variabilità di produzione dei MS e consente di identificare nuove strategie contro funghi patogeni e tossigeni.

Il genere *Fusarium* comprende 22 complessi di specie che insieme comprendono circa 300 specie filogeneticamente distinte. Questo studio è focalizzato sul complesso *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), che comprende 31 specie filogeneticamente distinte, raggruppate in due "clades", *Equiseti* ed *Incarnatum*. I membri del FIESC sono considerati importanti patogeni vegetali e umani, in grado di produrre un'ampia gamma di micotossine, compresi i tricoteceni di tipo A e B, beauvericina, butenolide, equisetina e zearalenone. Nonostante il loro ampio spettro e potenziale tossigenico, poco è noto circa la variabilità genomica tra le specie dei "clades", e la distribuzione e organizzazione dei cluster di geni di MS all'interno del complesso.

Nel genere *Aspergillus*, il gruppo '*A. niger* "aggregate"' include specie filogeneticamente distinte, ma strettamente correlate e spesso indistinguibili morfologicamente. Alcune sono considerate tossigene, responsabili, in particolare, di contaminazioni da ocratossina A (OTA) e fumonisina B₂ (FB2) in vari alimenti, tra cui vino, caffè, cereali. Tra le varie specie del gruppo '*A. niger* "aggregate"' è noto che *A. niger* e *A. welwitschiae* sono in grado di produrre sia OTA, sia FB2, sebbene entrambe le specie includano ceppi non produttori di OTA o FB2 con delezioni nei relativi cluster di geni biosintetici. Inoltre, in alcune specie dell' *A. niger* aggregate è stata già osservata la presenza di FUM cluster parziali, lasciando spazio a diverse ipotesi di storie evolutive per il gruppo e i cluster genici per i MS. Sebbene sia stato dimostrato che alcuni cluster si evolvono rapidamente attraverso riorganizzazioni multiple, duplicazioni, perdite e trasferimento genico orizzontale, i meccanismi evolutivi con cui vengono acquisiti e mantenuti tali geni non sono completamente chiari. Lo scopo di questo lavoro è studiare, mediante l'approccio dell'analisi comparativa di genomi, le caratteristiche genetiche alla base della variabilità nella produzione di metaboliti secondari all'interno dei complessi FIESC e OTA/FB2 in alcune specie appartenenti al gruppo di specie di *Aspergillus* della sezione *Nigri* (black *Aspergilli*).

Attività svolta:

Nell'ambito della collaborazione con l'istituto "National Center for Agricultural Utilization Research dell'USDA-Agricultural Research Service" di Peoria- IL, è stata studiata la distribuzione e la variabilità dei cluster di geni coinvolti nella biosintesi di MS all'interno di FIESC e dei cluster OTA e FUM in '*A. niger* "aggregate"'.

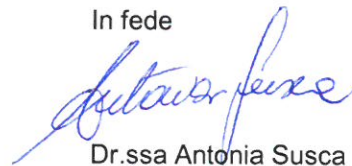
Da uno studio precedente condotto su un set di 69 isolati appartenenti al FIESC, sono stati selezionati 12 ceppi rappresentativi della variabilità filogenetica all'interno del complesso e sottoposti al sequenziamento del genoma, al fine di analizzare la distribuzione e la variabilità di metaboliti secondari associati alla produzione di micotossine, ed individuare la presenza di nuovi putativi metaboliti. Le relazioni filogenetiche tra i 12 isolati sono state ottenute sia mediante un approccio di concatenazione multigenica (26 geni housekeeping), sia mediante l'analisi dell'intera sequenza genomica, ottenendo dendrogrammi filogenetici con topologia sovrapponibile, ma statisticamente più robusta, a quelli ottenuti nello studio precedente, basati sull'analisi di 4 geni housekeeping. In particolare, 6 isolati sono stati classificati all'interno del gruppo *Equiseti*, 5 isolati sono stati classificati all'interno del gruppo *Incarnatum*, e un isolato è stato descritto come *F. camptoceras*. Le sequenze genomiche dei 12 isolati sono state analizzate mediante BLAST, per identificare i geni chiave codificanti per Polichetide Sintasi (PKS) e sintetasi peptidiche (NRPS), e mediante antiSMASH per identificare i cluster biosintetici coinvolti nella produzione di metaboliti secondari, tra cui le micotossine. Il numero di PKS ed NRPS identificate in ciascun isolato è risultato paragonabile a quello riportato in altre specie di *Fusarium*. In particolare, tutti gli isolati hanno mostrato la presenza di 8 noti cluster biosintetici, tra cui quello della fusarubina (PKS3), delle fusarinine (NRPS3), e dei tricoteceni (STC10). Inoltre, tutti gli isolati condividono la presenza di 4 PKS e 9 NRPS con funzione ancora non nota, mentre 20 altri cluster biosintetici sono variabilmente distribuiti tra i 12 genomi analizzati. Sono stati individuati geni codificanti 3 PKS ed 1 NRPS unicamente presenti in FIESC, i quali potrebbero essere coinvolti nella sintesi di nuovi potenziali metaboliti secondari, comunque da indagare ulteriormente a livello funzionale. Abbiamo inoltre confermato la produzione di alcuni metaboliti secondari attraverso analisi chimiche, come ad esempio i tricoteceni. L'analisi comparativa del cluster biosintetico dei tricoteceni ha rilevato che alcuni geni del cluster hanno un ordine ed orientamento differente rispetto a quello descritto in altre specie produttrici di *Fusarium*, confermando quanto riportato da Proctor et al. (2009) in un singolo isolato del complesso FIESC (FIESC12). In questo studio, abbiamo rilevato l'assenza di alcuni geni del cluster (TRI1 e TRI16) in quasi tutti gli isolati appartenenti al gruppo *Incarnatum*, mentre il gene TRI13 è risultato assente in *F. camptoceras*.

Alcuni genomi (23) appartenenti a specie di "*A. niger* "aggregate", di cui 6 confidenziali e 17 disponibili in archivi pubblici, sono stati analizzati per l'identificazione di geni orologi dei cluster OTA e FUM, rispettivamente coinvolti nella biosintesi di OTA e FB2. L'analisi ha consentito di identificare la composizione, l'ordine, l'orientamento di ciascun gene all'interno dei cluster e la distribuzione di cluster tra gli isolati, nonché la costruzione di alberi filogenetici basati sulle matrici di distanza.

L'analisi dettagliata dei singoli cluster consentirà lo studio di diversi meccanismi di ereditarietà dei cluster di MS, nonché la possibile identificazione di marcatori molecolari per i diversi profili chemio tipici dei gruppi studiati, dopo accurata valutazione della loro variabilità intraspecifica.

Bari, 09/06/2017

In fede



Dr.ssa Antonia Susca

Ricercatrice ISPA