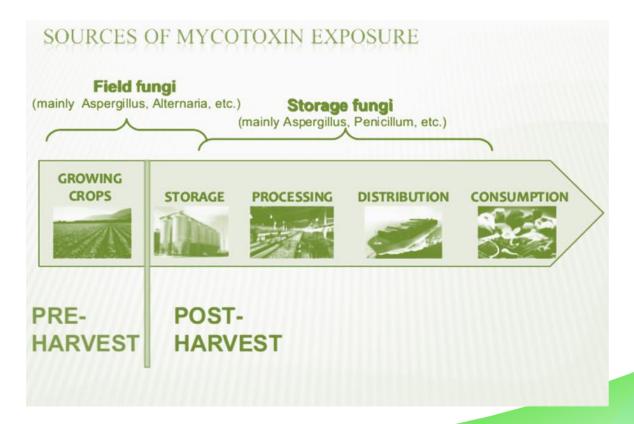


LA BIODIVERSITÀ GENETICA DEI FUNGHI TOSSIGENI: PREZIOSA RISORSA PER LE STRATEGIE DI PREVENZIONE E CONTENIMENTO DELLE MICOTOSSINE

"Giornate Fitopatologiche 2018"

Un approccio possibile per il controllo del problema legato alla contaminazione da micotossine nelle colture è il **monitoraggio** costante, che permette di

- applicare azioni correttive immediate
- elaborare modelli previsionali in grado di definire il rischio della presenza di micotossine sulla base delle condizioni meteorologiche, delle caratteristiche della zona di coltivazione, della suscettibilità varietale e delle tecniche agronomiche utilizzate





Le **MICOTOSSINE** sono metaboliti secondari ad azione tossica verso l'uomo e gli animali prodotti da alcuni generi fungini (es. *Aspergillus, Penicillium, Fusarium*).

Una singola specie può produrre più micotossine:

Fusarium proliferatum fumonisine, beauvericina, fusarina C, moniliformina

Aspergillus niger OTA e fumonisina B2

Penicillium griseofulvum patulina, griseofulvina, ac. ciclopiazonico, roquefortinaC

Una **stessa micotossina** può essere prodotta da **specie diverse**, non necessariamente appartenenti allo stesso genere

Aflatossine A. flavus, A. parasiticus

Ocratossina A A. carbonarius, A. niger, A westerdijkiae, P. verrucosum, P. nordicum

Fumonisine F. proliferatum, F. verticillioides, A. niger



Frumento

Principali specie

Altre species

F. graminearum

F. culmorum

F. avenaceum

F. poae

F. cerealis

(syn F. crookwellense)

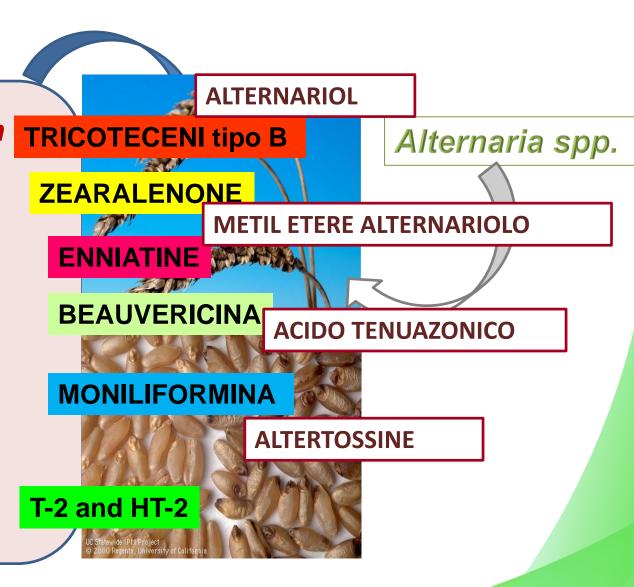
F. sporotrichioides

F. tricinctum

F. acuminatum

F. equiseti

F. langsethiae





Mais

Fusarium proliferatum
Fusarium verticillioides

Fusarium temperatum Fusarium subglutinans



Fusarium culmorum

Fusarium crookwellense

Tricoteceni



Aspergillus section Flavi

A. flavus

A. minisclerotigenes

A<u>. mottae</u>

Aflatossine



Aspergillus section Nigri

A. tubingensis

A. welwitschiae (syn A. awamori)

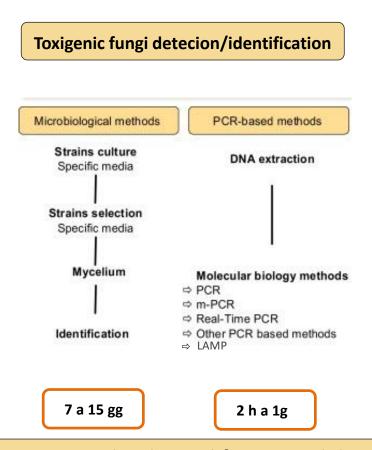
A. niger

A. japonicus





Una efficiente metodica per l'identificazione della popolazione fungina presente su una coltura si basa sull'analisi di caratteri genetici dei funghi tossigeni.



Numerosi sono i saggi basati su tecniche di amplificazione del DNA, quali PCR (end point e real time) e LAMP, particolarmente efficaci per rilevare **precocemente** la presenza di funghi micotossigeni prima della comparsa di sintomi visibili sulla pianta, ma anche **rapidi specifici** e **sensibili**.





Quali regioni del DNA ricercare?

GENI COSTITUTIVI (housekeeping)

Alcuni geni risultano importanti marcatori per il riconoscimento di specie, mediante confronto con banche dati di sequenze pubbliche ed accessibili tramite Web

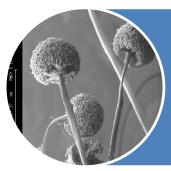
Vantaggi:

- applicabili su più generi fungini
- informativi a livello di specie, anche specie filogeneticamente molto vicine e morfologicamente indistinguibili
- Fattore di allungamento della traduzione 1- α (TEF1a)
- RNA polimerasi (RPB1 e RPB2)
- beta-tubulina (benA)
- Calmodulina (CaM)

Limiti:

- I database pubblici spesso sono lacunosi
- non sempre i dati presenti si riferiscono a ceppi ben caratterizzati dal punto di vista filogenetico.
- Una stessa specie può includere ceppi produttori e non-produttori.



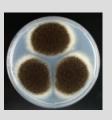


A. ibericus a new species from grapes close to *A. carbonarius*, no OTA producer (Serra *et al.*, 2006 *Mycologia*, 98:295-306)

A. uvarum a new uniseriate species from grapes in Europe (Perrone *et al.,* 2008 *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,* 58, 1032-1039)

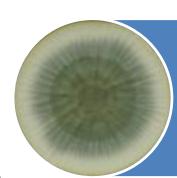






A. brasiliensis a new species worldwide distributed and found on grapes. (Varga et al., 2007 Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57, 1925-1932)

A. niger cryptic phylogenetic species: A awamori (ren: A. welwitschiae) (Perrone et al., 2011 Fungal biology 115,1138-1150)



Penicillium salamii, a new species occurring during seasoning of dry-cured meat. (Perrone et al. Int J Food Microbiol. 2015 Jan 16;193:91-8)







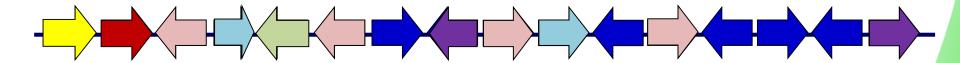
Quali regioni del DNA ricercare?

GRUPPI DI GENI COINVOLTI NELLA BIOSINTESI DEI METABOLITI SECONDARI

Nei funghi filamentosi, i geni che codificano per un MS, sono in genere raggruppati in cluster biosintetici.

Cluster genico:

- core synthase gene
- Oxidoreductase
- Acyl or amino transferase
- Dehydrogenase
- Transporter
- Transcription factor



La capacità di produrre una data micotossina è dovuta alla presenza di **geni coinvolti nella biosintesi** di una data micotossina. La **diversità genetica** in alcuni geni è legata al profilo tossicologico dei ceppi.



Quali sono le basi genetiche per le diverse strutture di micotossine?

POLYKETIDES

Fumonisins OH O CH3 Fusarin C Zearalenone

NON-RIBOSOMAL PEPTIDE

TERPENES

Trichothecenes

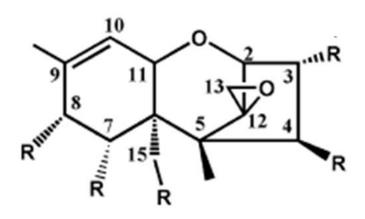
Culmorin



Gibberellin

TRICOTECENI

Tricoteceni sono una famiglia di tossine derivate del terpene

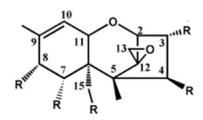




- inibiscono la sintesi proteica eucariotica
- causano gravi tossicosi negli esseri umani e in animali
- Danneggiano il sistema intestinale, immunitario, endocrino e neurologico
- Sono altamente fitotossiche



TRICOTECENI

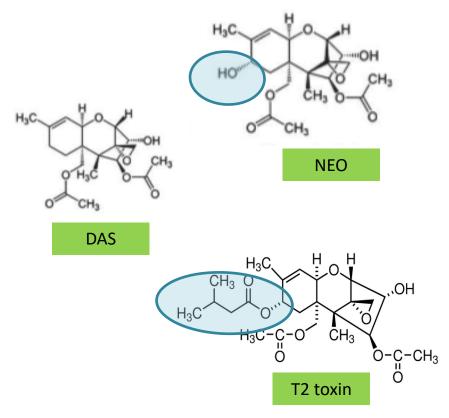


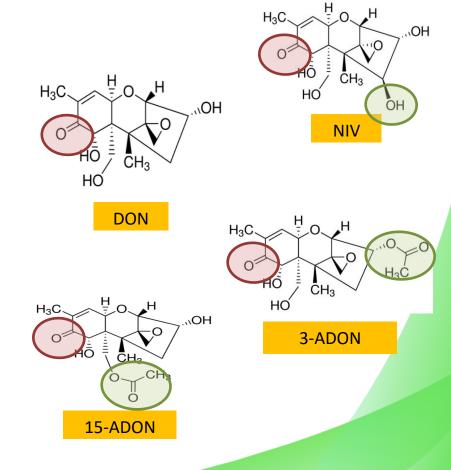
TIPO A

F. sporotrichioides, F. langsethiae, FIESC

TIPO B

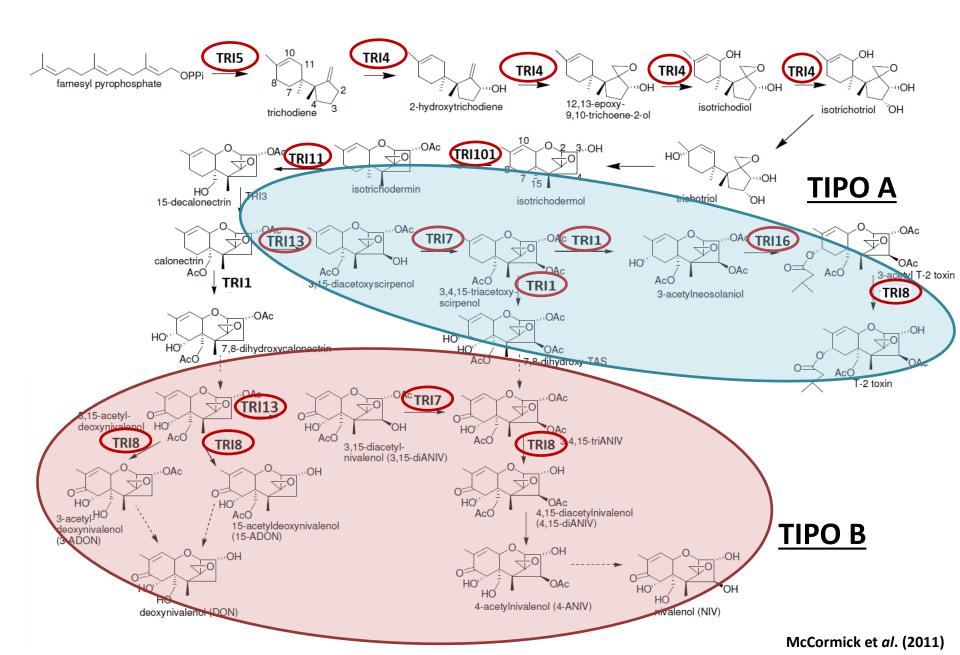
FGSC, FIESC, F. culmorum,



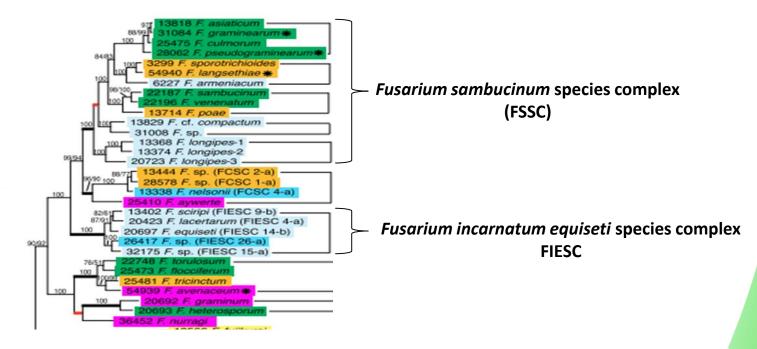


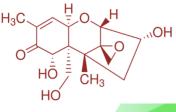


BIOSINTESI DEI TRICOTECENI



I tricoteceni sono prodotti da diverse specie di Fusarium

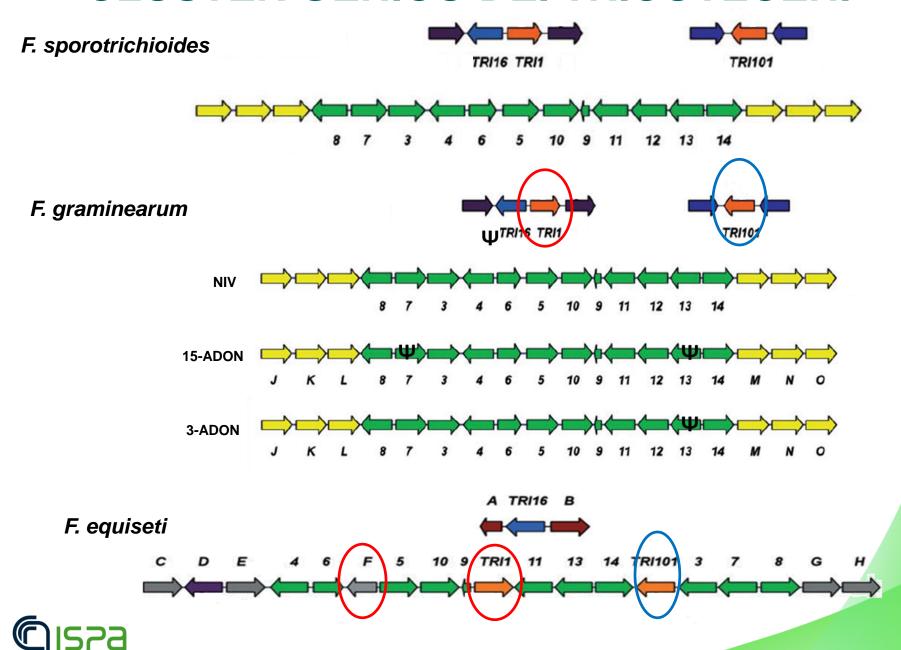




Tricoteceni



CLUSTER GENICO DEI TRICOTECENI

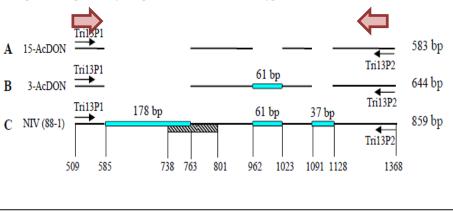


Come utilizzare polimorfismi del DNA in un saggio diagnostico?

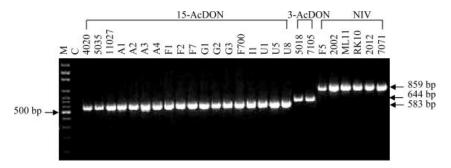
Gene TRI13:

3 differenti delezioni correlate a 3 differenti chemiotipi

Figure 2. Diagrammatic presentations of Tril3 genes are showing the gene structures of 3-AcDON-, 15-AcDON- and NIV-chemotype strains, and indicating the positions of primers designed for this study and the positions of nucleotides in the amplicon amplified by the primers in a NIV-chemotype.



859 pb = produttori di NIV 644 pb = produttori di 3-AcDON 583 pb = produttori di 15-AcDON





Un'unica reazione di PCR con un'unica coppia di primer consente di **predire** il chemiotipo di un dato ceppo analizzando le dimensioni della regione di DNA amplificata.



FUMONISINE



- Le fumonisine sono molecole lineari, derivate dal polichetide, prodotte principalmente da *F. verticillioides* e *F. proliferatum*
- classificate come fumonisine B (FB) o C (FC) in base alla presenza (FB) o assenza (FC) di un gruppo metilico terminale
- La fumonisina B1 è la forma più comune ed economicamente importante
- Il mais è la coltura più contaminata
- Le fumonisine sono cancerogene

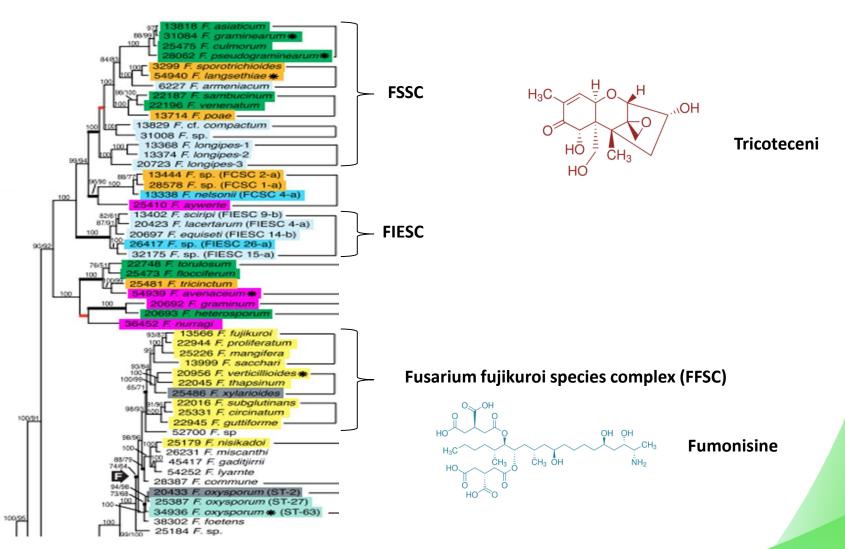


$FB_1/FB_2/FB_3/FB_4$

Fumonisine
B₁, B₂, B₃ e B₄
differiscono per la
presenza di gruppi
idrossilici

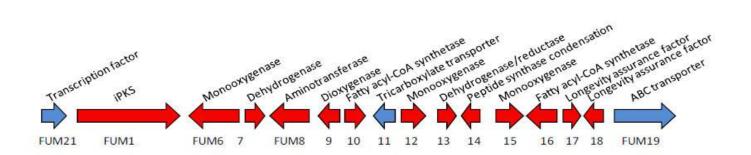


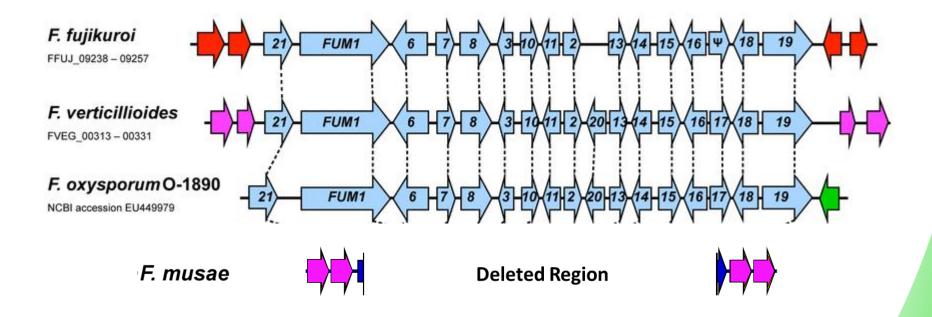
I tricoteceni e le fumonisine sono prodotte da diverse specie di *Fusarium*





CLUSTER GENICO DELLE FUMONISINE

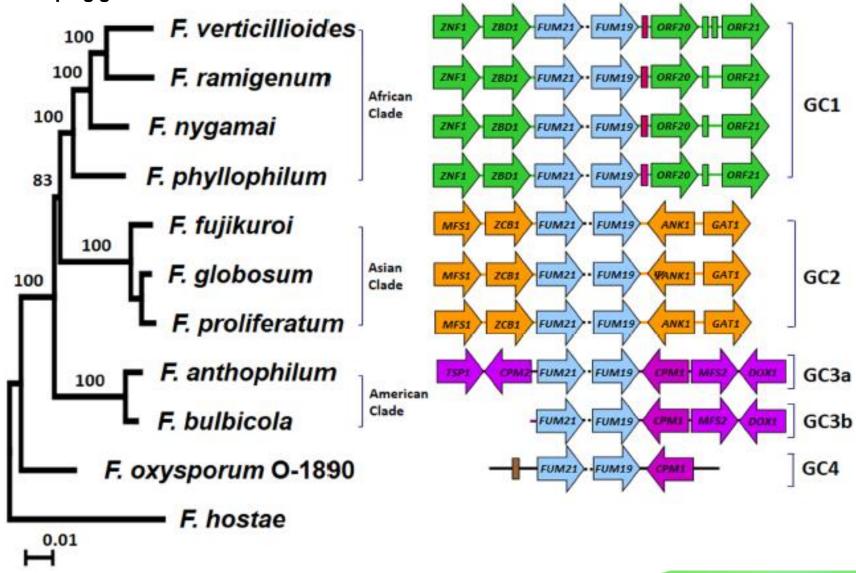


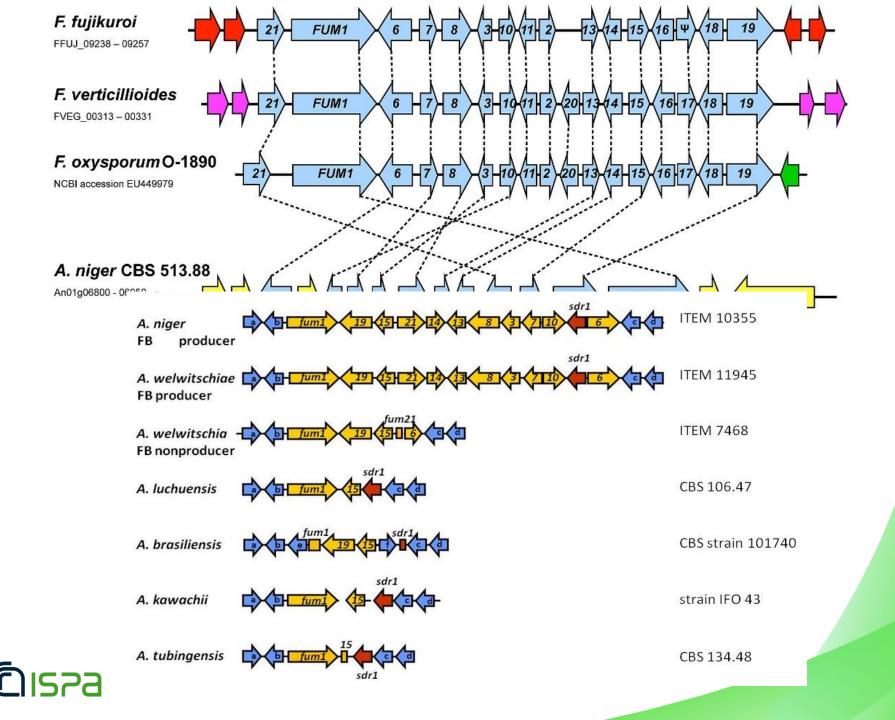




FUM cluster location is correlated with the phylogenetic relationships of species

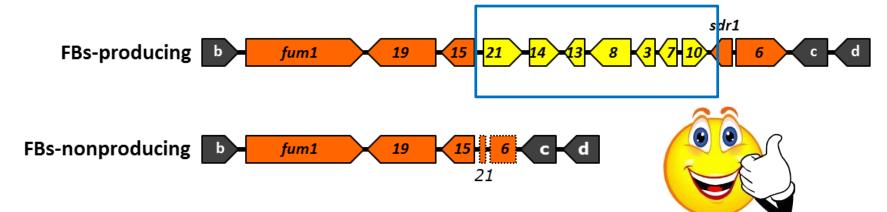
Species phylogeny: housekeeping genes





TARGET Gene



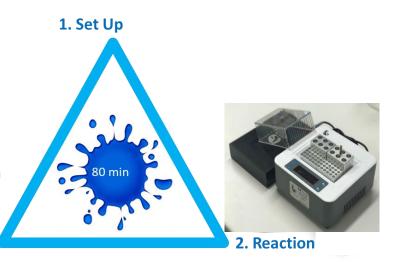




Loop mediated isothermal amplification

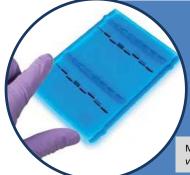
3. Results visualization











emistry

Species-specific primers for identification of *F. verticillioides, F. proliferatum and F. subglutinans*

Primer name	Primer sequence	Species-specificity
SUBI	5'-CTGTCGCTAACCTCTTTATCCA-3'	F. subglutinans
SUB2	5'-CAGTATGGACGTTGGTATTATATCTAA-3'	
PRO1	5'-CTTTCCGCCAAGTTTCTTC-3'	F. proliferatum
PRO2	5'-TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG-3'	
VER1	5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3'	F. verticillioides
VER2	5'-AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3'	

Mule` et al. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *F. verticillioides, F. proliferatum* and *F. subglutinans. European Journal of Plant Pathology* 110: 495-502

Quantitative real-time PCR assay for the detection of

A. carbonarius in grapes

 Oligo name
 Sequence
 Nucleotide position on AJ582714 and AJ582715

 CARBO_q1
 5'-CCG ATG GAG GTC ATG ACA TGA-3'
 547 to 527

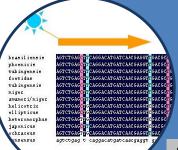
 CARBO_q2
 5'-AAT GCG AAC CGG ATA TTA ACT TCT G-3'
 380–403

 CARBO_probe
 5'-8FAM-CAG CGG CGG AGA TA-MGB-3'
 519 to 506

36 34 32 32 30 28 26 24 40 -3.5 -3.0 -2.5 -2.0 -1.5 -1.0 -0.5 0 0.5 Log Co against OTA contents in grapes
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03
4,501-03

Correlation between A. carbonarius DNA

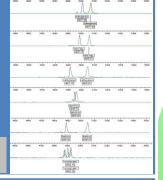
Mulè et al. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of A. carbonarius in grapes. Int J Food Microbiol. 2006 Sep 1;111 Suppl 1:S28-34.



A Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP) assay for the rapid identification of *Aspergillus* species of the Nigri section

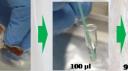
Different electrophoretic mobility of single-strand, related to species-specific sequence variations included in the fragment, allows species identification

Susca et al. Rapid SSCP screening method for the identification of Aspergillus section Nigri species by the detection of calmodulin nucleotide variations. Food Addit Contam. 2007 Oct;24(10):1148-53.



LAMP assay for the detection of *P. nordicum* on salami

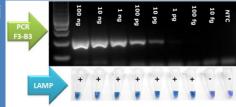












Heat treatment & centrifugation

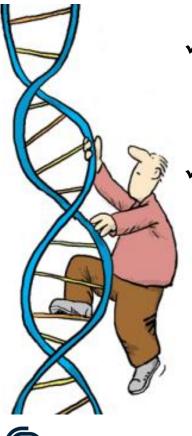
LAMP amplification

Result visualization

Ferrara et al. 2015. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of Penicillium nordicum in dry-cured meat products. Int J Food Microbiol. 202:42-7.

CONCLUSIONI

- ✓ E' possibile utilizzare le variazioni genetiche inter- e intraspecie per sviluppare saggi diagnostici in grado di identificare le specie fungine e il relativo profilo micotossicologico.
- ✓ L'efficacia diagnostica di un saggio per l'identificazione del potenziale rischio tossinogenico dipende dal grado di caratterizzazione del relativo cluster genico
- ✓ Ampliare l'analisi della naturale variabilità genetica (sequenziamento genomico) di popolazioni di funghi tossigeni, includendo ceppi isolati da diverse colture e aree geografiche



F. Fanelli

M. Ferrara

A. Gallo

M. Haidukowski

A.F. Logrieco

A. Moretti

G. Mulè

G. Perrone

A. Susca

G. Cozzi

F. Epifani

S. Somma

G. Stea

P. Anelli

T. Cimmarusti

V. Ghionna

M. Loi

D. Magistà

M. Masiello

F. Ramires

A. Villani







