



SCREENING di ATTIVITA' su *A. flavus*

METODICHE E PROTOCOLLI

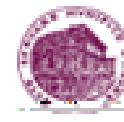
Prof. Francesco M. Restivo
Dr.ssa Francesca Degola
Dr. Giorgio Spadola



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI BRESCIA

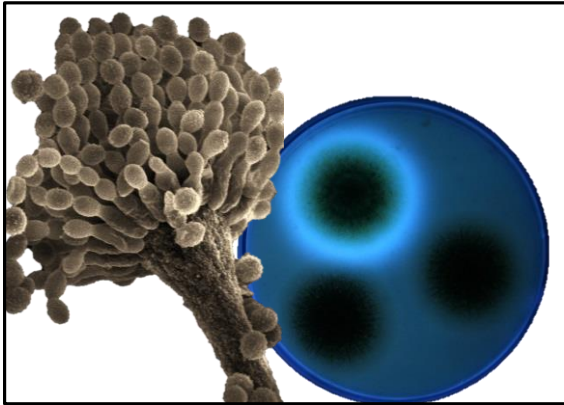


UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PARMA



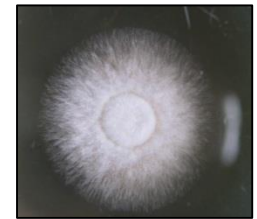
fondazione
cariplo

Aspergillus flavus: struttura, sviluppo e diffusione



- ✓ Contaminante naturale di coltivazioni cerealicole e oleaginose;
- ✓ È il principale produttore di aflatossine del gruppo B;
- ✓ Le aflatossine sono il prodotto del metabolismo secondario del fungo, ma non tutti i ceppi delle specie aflatossigene sono in grado di accumularle.

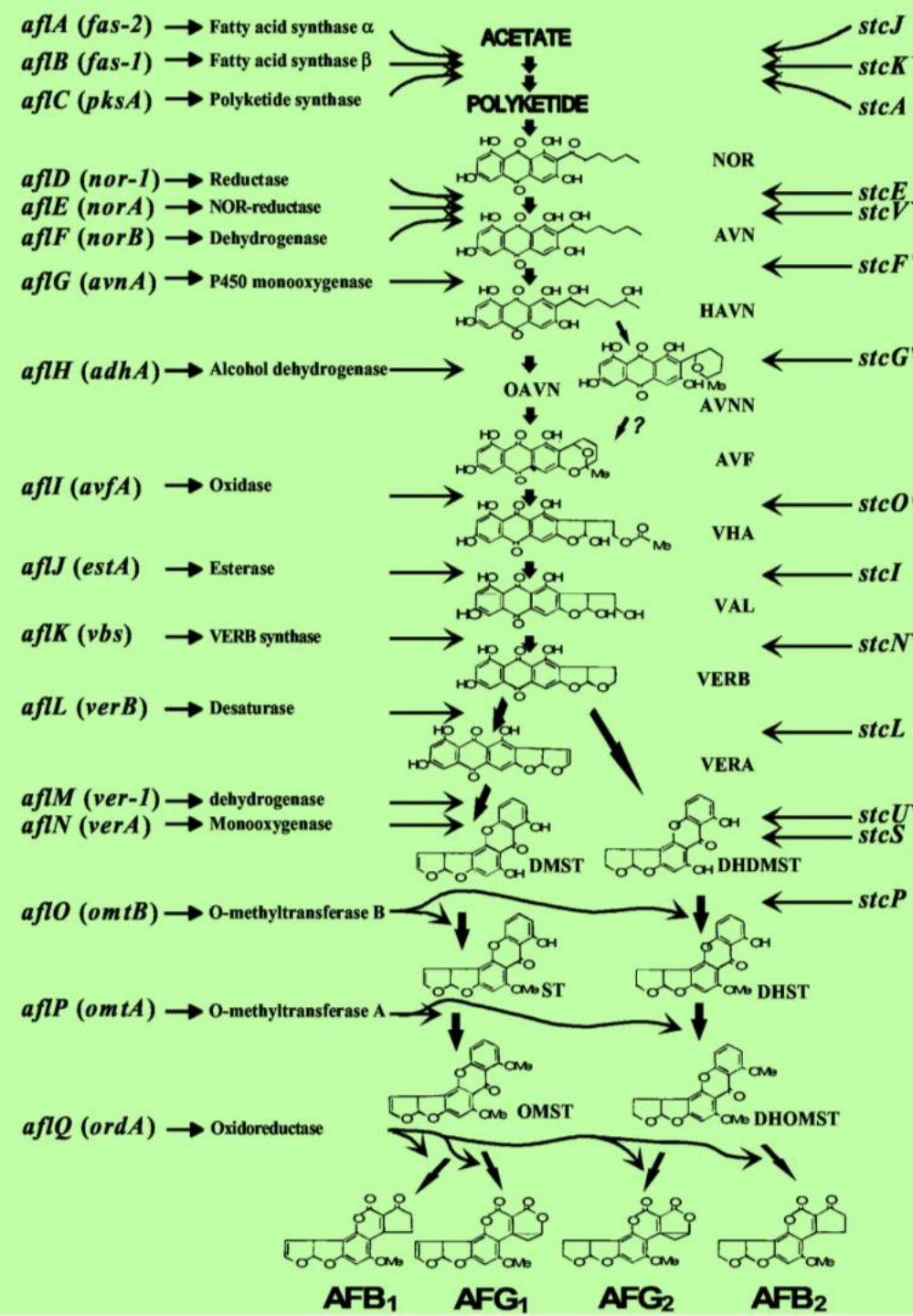
- La struttura vegetativa del fungo viene chiamata **MICELIO**, è costituita da un network di cellule allungate tubulari (**IFE**) estremamente ramificate. La crescita del micelio avviene a partire dall'apice dell'ifa, ed è multidirezionale (**RADIALE**)
- Si riproducono sia per via **sessuata** (ascospore) che per via **asessuata** (**SPORE** o **CONIDI**) → le spore (5-10 µm) maturano a partire da strutture differenziate (**CONIDIOFORI**)
- La biosintesi di aflatossina è strettamente correlata allo stadio di maturazione/sporificazione del fungo
- Sclerozi: strutture la cui biogenesi sembra condividere numerosi punti di controllo e regolazione col metabolismo aflatossinico.



La biosintesi di AF è modulata dallo stato ox/redox della cellula

CLUSTER GENICO

PATHWAY BIOSINTETICO





SAGGI di ATTIVITA' BIOLOGICA su *A. flavus*

Valutazione degli effetti su accrescimento/differenziamento:

- Germinazione delle spore e primo sviluppo delle ife;
- Accrescimento radiale;
- Biomassa;
- Sporificazione;
- Biogenesi degli sclerozi;

Valutazione degli effetti sul metabolismo secondario:

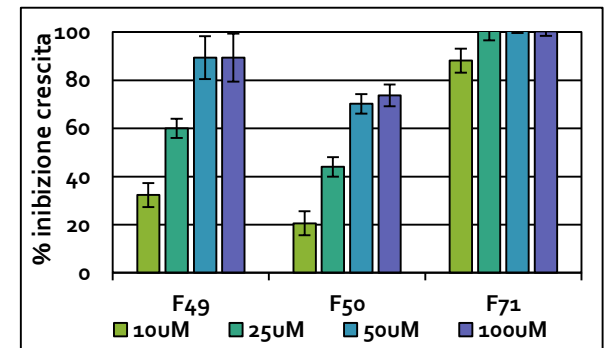
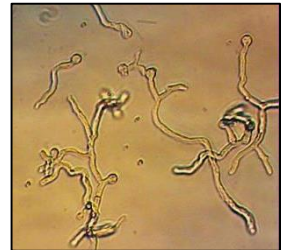
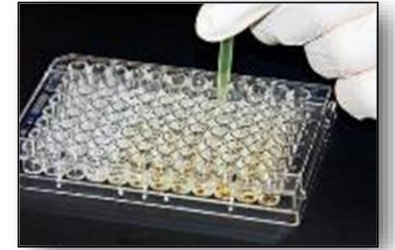
- Accumulo aflatossina;
- Biogenesi degli sclerozi;

Valutazione degli effetti sul potenziale di colonizzazione del fungo:

- Ricostruzione dell'infezione su matrice naturale (cariossidi).

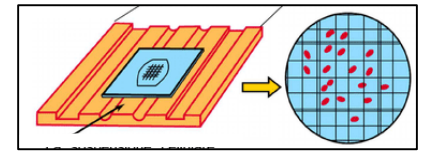
SAGGIO di GERMINAZIONE

- Coltivazione dei ceppi di *A. flavus* in terreno agarizzato;
- Recupero dei conidi, filtrazione con filtro di nylon e stima della concentrazione (OD_{600});
- Inoculo delle sospensioni sporali in piastre multipozzetto (terreno YES liquido) in presenza di concentrazioni crescenti di molecola test;
- Incubazione a 28°C e misurazione dell' OD_{600} a intervalli regolari;
- Osservazione delle colture al microscopio ottico rovesciato;
- Dati espressi come inibizione percentuale dei trattati rispetto al controllo.

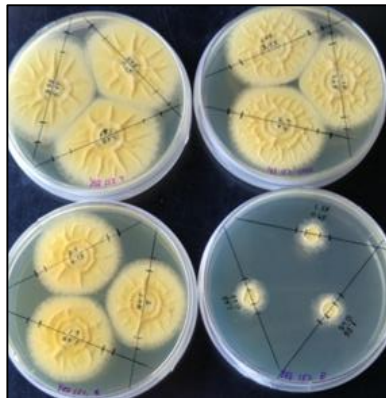


VALUTAZIONE della SPORIFICAZIONE

- Microcolture (piastra multipozzetto) esposte a concentrazioni crescenti di molecola test;
- Incubazione a 28°C fino a completa sporificazione della coltura;
- Recupero del micelio, lavaggio con soluzione sterile; filtrazione (nylon 32µm), stima della concentrazione sporale in camera Burk;
- Dati espressi come inibizione percentuale dei trattati rispetto al controllo.



ACCRESIMENTO RADIALE

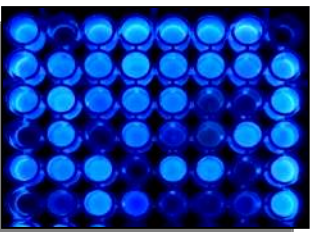
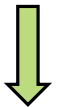
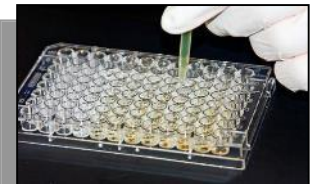
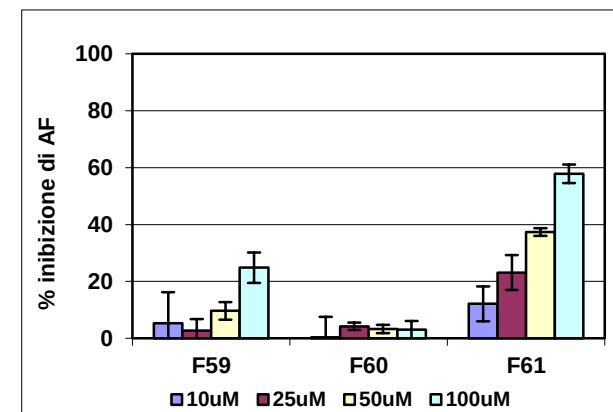
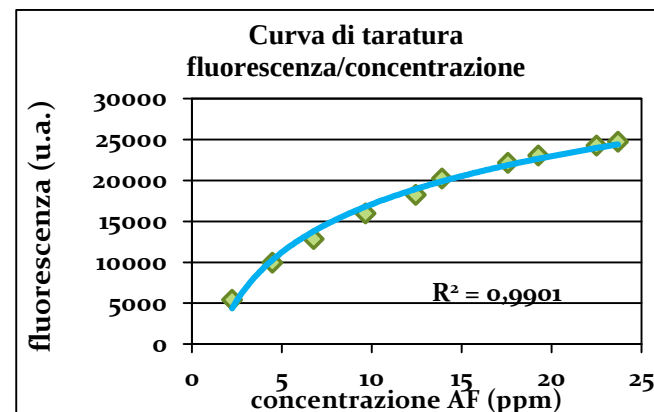


- 3 spot equidistanti da 5µL della sospensione sporale 10^6 /mL in terreno YES agarizzato, addizionato con molecola test;
- Incubazione a 25°C;
- Misurazione del diametro ogni 24h per 4 gg;
- Dati espressi come accrescimento radiale medio giornaliero.

SAGGIO per la VALUTAZIONE dell' ACCUMULO di AFLATOSSINA

Metodica ad alta resa basata sulla fluorescenza dell'AF: la coltivazione in latte di cocco (CCM) permette di evidenziare la presenza di tossina come fluorescenza quando esposta alla lunghezza d'onda di 365nm (Degola et al. 2012).

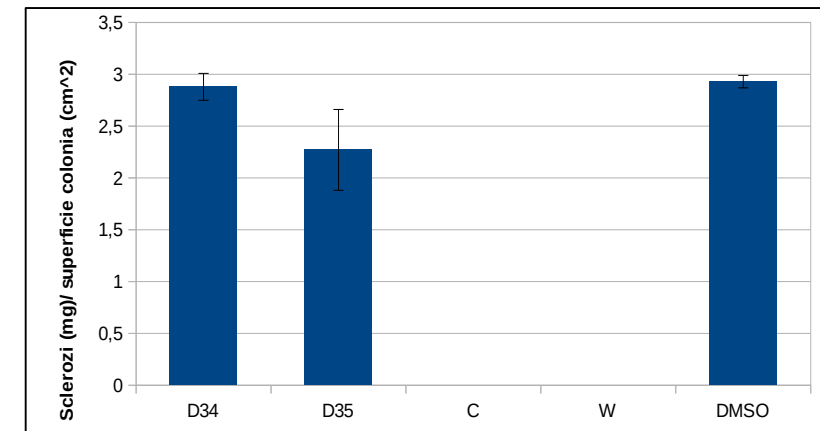
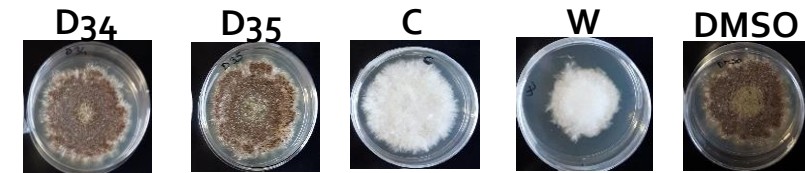
- Sostanze test addizionate al terreno CCM in concentrazioni crescenti;
- Incubazione statica 6 giorni a 25°C;
- Stima della concentrazione di AF (TECAN SpectraFluor PLUS);
- Valutazione dello stato di sporificazione come indice di maturazione delle colture;
- Dati espressi come produzione di AF (unità arbitrarie di fluorescenza) e/o inibizione percentuale dell'accumulo di AF in presenza di della molecola.



EFFETTO sulla BIOGENESI degli SCLEROZI

Il **Terreno CZ (Czapek)** è povero di nutrienti e mima le condizioni ambientali favorevoli al differenziamento di queste strutture di resistenza del fungo. Viene utilizzato per indurre lo sviluppo di sclerozi, permettendo così di valutare lo stato di differenziamento del micelio.

- Il test viene condotto inoculando uno spot di sospensione sporale (10^6 spore/mL) in piastre su terreno CZ agarizzato addizionato con la molecola test;
- Incubazione a 28°C al buio per 12 giorni;
- Recupero manuale degli sclerozi dalla superficie delle colture;
- Rimozione delle spore, essiccazione e valutazione del peso secco;
- Dati espressi in mg/unità superficiale della colonia.





I risultati ottenuti sono stati omessi perchè
saranno oggetto di pubblicazione