



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

Corso di laurea Magistrale in Biologia Molecolare

**Studio di possibili target molecolari mitocondriali di sostanze antimicotossigeniche su fungo fitopatogeno *Aspergillus flavus*.
Il caso della 3-isopropilbenzaldeide tiosemicarbazone.**

RELATORE:

Prof. Francesco Maria Restivo

CORRELATORI:

Dott.ssa Francesca Degola

Dott.ssa Cristina Dallabona

LAUREANDO:

Roberto Draisci

ANNO ACCADEMICO 2016/2017



“Studio di possibili target molecolari mitocondriali di sostanze antimicotossigeniche su fungo fitopatogeno *Aspergillus flavus*. Il caso della 3-isopropilbenzaldeide tiosemicarbazone”

Il mio progetto di tesi è incentrato sullo studio di alcuni aspetti del metabolismo di *Aspergillus flavus*, un fungo fitopatogeno per diverse colture cerealicole, specialmente quelle ad alto contenuto di oli come mais, arachidi e semi di cotone; è noto per essere il maggior produttore di aflatossina, una micotossina a basso peso molecolare accumulata come prodotto del metabolismo secondario e particolarmente tossica e cancerogena per l'uomo e gli animali. La biosintesi è strettamente legata allo stadio differenziativo del fungo e ad alcuni parametri ambientali; soprattutto, sembra essere influenzata dallo stato ossidoriduttivo della cellula. Considerando la diffusione del fitopatogeno, la sempre maggiore incidenza della contaminazione da micotossine nelle derrate alimentari e l'impatto economico che ne deriva, è sempre più di interesse mettere a punto strategie integrate in ambito agronomico, con un occhio di riguardo agli approcci più “green” ed ecosostenibili. Proprio in questa ottica ci stiamo occupando di analizzare l'attività antifungina e antimicotossigenica di alcune molecole di sintesi (ma di origine naturale) sul metabolismo di *A. flavus*, utilizzando anche come sistema modello il lievito *Saccharomyces cerevisiae*. In particolare, attraverso approcci multidisciplinari siamo andati a indagare i possibili target metabolici di derivati della benzaldeide: attraverso uno studio del proteoma (2D-elettroforesi e identificazione delle specie proteiche tramite LTQ-Orbitrap technology, zymogramma, attività enzimatica in gel) e di alcuni geni critici (qPCR RealTime) è stato individuato come possibile bersaglio il metabolismo respiratorio mitocondriale. A seguito di queste evidenze, è stata condotta un'analisi mirata sulla mutabilità del genoma mitocondriale di mutanti di lievito, sulla respirazione (saggi di attività enzimatica spettrofotometrica) e sulla stabilità dei complessi proteici mitocondriali (analisi dei citocromi e WesternBlot), nonché un'analisi ultrastrutturale della morfologia dei mitocondri (TEM analysis).

Poiché le molecole caratterizzate verranno proposte come additivi per formulazioni da applicare in campo, l'efficacia come fungistatici è stata confermata attraverso test di ricostruzione dell'infezione su matrice naturale (granella di mais), e una eventuale attività biologica indesiderata sul seme è stata esclusa tramite test accreditati per la valutazione della germinazione e della radicazione in semi di mais.

ENGLISH VERSION:

This thesis focused on some metabolic aspects of *Aspergillus flavus*, a phytopathogen fungus affecting different cereal crops, especially those with high oily content (corn, peanuts and cotton seeds); it is known to be the higher producer of aflatoxin, a low molecular weight mycotoxin accumulated as a secondary metabolite particularly toxic and carcinogenic to humans and animals. The biosynthesis is closely linked both to the developmental stage of the fungus and some environmental parameters; mostly, seems to be influenced by the ox/redox state of cell. Considering the diffusion of the phytopathogen, the increasing contamination by aflatoxin in foodstuffs and the resulting economic impact led to develop integrated strategies for the containment, with an eye on the most "green" and eco-sustainable approaches. In this perspective, we analyzed the antifungal and antimycotoxigenic activities of some synthetic molecules (deriving from natural compounds) on *A. flavus*, coupling with the use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model system.

Through a multidisciplinary approach, we searched possible metabolic targets of benzaldehyde's derivatives: through the analysis of the fungal proteome (2D-electrophoresis and identification of protein species by LTQ-Orbitrap technology, zymogram, enzymatic activity in gel) and the analysis of some specific genes (qPCR RealTime) we individuated, as a possible target, the mitochondrial respiratory metabolism. Following these evidences, a focused analysis on the mutability of the genome was carried out on mitochondrial yeast mutants, on the respiratory functionality (spectrophotometric enzymatic activity) and on the stability of mitochondrial complex proteins (cytochrome spectra and WesternBlot analysis), as well as an ultrastructural analysis of mitochondrial morphology (TEM analysis).

As the molecules characterized will be proposed as additives for formulations to be applied in field, the effectiveness as a fungistatic was confirmed through infection reconstruction tests on natural matrix (corn grain) and a eventually undesirable biological activity on seed is excluded through accredited tests for the valuation of germination and rooting in seeds corn.