



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI



**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari**

Indirizzo: Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Ciclo XXVIII

Identificazione di fattori di virulenza nel fungo fitopatogeno
Fusarium culmorum

Dott.ssa Irene Camboni

Direttore della Scuola

Prof. Antonello Cannas

Referente di Indirizzo

Dr. Severino Zara

Docente Guida

Prof. Quirico Migheli

Docenti Tutor

Dott.ssa Barbara Scherm e Dr. Matias Pasquali

Anno Accademico 2014 - 2015



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

**Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari**



Indirizzo: Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Ciclo XXVIII

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in “Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari” dell’Università degli Studi di Sassari, a.a. 2014/2015 - XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

Irene Camboni gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective 1.3, Line of Activity 1.3.1.)

INDICE

PAGINA

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 I cereali: caratteristiche principali.....	1
1.1.1 Il mercato dei cereali.....	2
1.1.2 Il frumento duro.....	2
1.2 Le fusariosi deicereali.....	3
1.2.1 La fusariosi del colletto	4
1.2.2 La fusariosi della spiga.....	5
1.2.3 Agenti patogeni	7
1.2.4 <i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Sacc.....	7
1.3 Le micotossine.....	9
1.3.1 I tricoteceni: aspetti generali.....	11
1.3.2 La tossicologia dei tricoteceni.....	13
1.4 I metodi di lotta alle fusariosi dei cereali.....	15
1.5 Metodi molecolari per individuare geni di virulenza in <i>Fusarium culmorum</i>	17
1.5.1 Gene knock-out.....	18
1.5.2 Mutagenesi inserzionale mediata da trasposoni.....	18
2. SCOPO DEL LAVORO.....	20
3. MATERIALI E METODI.....	21
3.1 Materiale fungino.....	21
3.2 Collezione di revertanti.....	21
3.3 Preparazione di colture monosporiche.....	22
3.4 Caratterizzazione molecolare dei revertanti.....	23
3.5 Analisi fenotipiche dei revertanti.....	24
3.6 Estrazione del DNA.....	24
3.7 Knock-out dei geni FG_SG 17209 e FG_SG 00332.....	25
3.8 Test di patogenicità del “mal del piede”.....	26
3.9 Test di patogenicità della fusariosi della spiga	27
3.10 Phenotype Microarray.....	28
3.11 Analisi quantitativa delle micotossine.....	29

4.RISULTATI.....	30
4.1 Ottenimento del cotrasformante M7.....	30
4.2 Screening fenotipico dei revertanti.....	32
4.3 Analisi delle sequenze fiancheggianti e distribuzione del transposone <i>mimp1</i> nel genoma di <i>F. graminearum</i>	33
4.4 Ottenimento mutanti knock-out.....	34
4.5 Test di patogenicità: “mal del piede”.....	34
4.6 Test di patogenicità: fusariosi della spiga.....	36
4.7 Metabolizzazione di fonti di carbonio.....	37
4.8 Analisi quantitativa delle micotossine.....	38
5. CONCLUSIONI E DISCUSSIONE.....	39
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	41

1. INTRODUZIONE

1.1 I cereali: caratteristiche principali

I cereali rappresentano un gruppo di colture di grande importanza nell'economia agricola mondiale e svolgono un ruolo fondamentale sia nell'alimentazione umana che animale. I cereali infatti producono semi amidacei destinati alla produzione di farine e preparati alimentari per l'uomo e foraggio per gli animali. Si contano circa 10000 specie di cereali appartenenti per la maggior parte alla famiglia delle *Graminacee* (*Poaceae*). Dal punto di vista agronomico, i cereali rappresentano un prodotto agricolo molto diffuso e coltivato nei diversi areali del mondo grazie alla loro capacità di adattamento ai continui cambiamenti climatici e ai differenti tipi di terreno. Queste caratteristiche fanno di essi un prodotto importante anche sul piano economico-industriale. I cereali, inoltre, vengono annoverati tra i principali fornitori di energia per l'elevato contenuto in carboidrati; sono anche una discreta fonte di proteine, sali minerali e vitamine che li rendono un alimento completo dal punto di vista nutrizionale e consigliato in qualsiasi programma dietetico volto ad una corretta e sana abitudine alimentare (Piredda e Cannella, 2006). Forniscono, inoltre, un prodotto secco, facile da trasportare e a lunga durata, resistente perciò ad eventuali processi di deterioramento. Il concetto di alimentazione ha subito nel corso degli anni profonde trasformazioni e, se prima il termine veniva utilizzato per indicare solo lo sviluppo e l'accrescimento corporeo, nella società moderna il valore salutistico di un alimento è requisito essenziale per il loro utilizzo nella formulazione di alimenti funzionali per i quali c'è un crescente interesse dei paesi sviluppati. Si riscontra, infatti, una forte richiesta da parte del mercato di alimenti che, oltre a fornire un apporto nutrizionale ed energetico, siano in grado di esercitare un effetto benefico sulla salute e di ridurre il rischio di malattie croniche-degenerative (Hugget e Schliter, 1996). Gli effetti salutistici dei cereali sono da attribuirsi nello specifico al contenuto in fibra (solubile ed insolubile) ed in composti biologicamente attivi (nutraceutici) presenti nelle diverse componenti della cariosside, quali composti fenolici, tocoli e carotenoidi. E' crescente l'interesse verso i cereali integrali proprio per la presenza di composti bioattivi in grado di rafforzare la barriera di protezione cellulare nei confronti dei fenomeni ossidativi (Duthie *et al.*, 1996).

1.1.1 Il mercato dei cereali

Frumento, riso e mais sono i cereali più coltivati al mondo e insieme costituiscono la fonte alimentare principale dell'umanità.

Le prime stime della Crop Prospects Food Situation della FAO del 1 marzo 2016 inerenti la produzione mondiale di cereali nell'annata agraria 2016 sono tutt'altro che confortanti, prevedendo una raccolta cerealicola a fine anno di 723 milioni di tonnellate esattamente 10 milioni di tonnellate (1,4%) in meno rispetto ai valori registrati nel 2015. Le numerose scorte nei centri di stoccaggio e l'offerta in continua flessione sul piano internazionale rappresentano, invece, le principali caratteristiche dello scenario tratteggiato dall'International Grains Council (IGC), nel bollettino di maggio 2016, che prevede una forte risalita della produzione di cereali nel 2017, esattamente in linea con gli aumentati impieghi alimentari, foraggeri e industriali (fonte: <http://www.igc.int/en>). Dal rapporto della FAO risulta che 34 paesi di tutto il mondo, di cui 27 solo nel continente africano, necessitano di una maggiore assistenza esterna dovuta da una parte alle incessanti guerre civili che mettono a rischio la sicurezza alimentare e dall'altra alle condizioni climatiche sfavorevoli caratterizzate da grave siccità, che mettono in ginocchio diverse popolazioni determinando un aumento di casi di malnutrizione e l'incremento nel prezzo degli alimenti (fonte: <http://www.fao.org/giews>).

1.1.2 Il frumento duro

Uno dei cereali più coltivati al mondo è il frumento. Con il termine frumento si identificano diverse specie di cereali della famiglia delle *Triticeae* e tra queste, riveste particolare interesse il frumento duro (*Triticum turgidum* o *durum*), cereale autunno-vernino coltivato soprattutto nel bacino del Mediterraneo (Centro e Sud Europa, Paesi del Nord Africa e dell'Asia Occidentale) e nel Nord-America. Dal punto di vista genetico il frumento duro è la risultante di un processo chiamato poliploidizzazione avvenuto tra due specie selvatiche diploidi, *Triticum urartu* e *Aegilops speltoides* a formare la specie *Triticum turgidum* con corredo cromosomico tetraploide. Dal punto di vista ambientale, il frumento duro meno si adatta ad avversità climatiche come prolungati abbassamenti termici e umidità eccessiva rispetto al frumento tenero, prediligendo perciò habitat prevalentemente primaverili caratterizzati da un clima caldo-

asciutto e, inoltre, più di questo, vede compromessa la qualità della granella all'instaurarsi di condizioni ambientali improprie. Il frumento duro si differenzia dal frumento tenero (*Triticum aestivum*) non solo per areale di adattamento e diffusione ma anche per caratteristiche morfo-fisiologiche della pianta. Il *Triticum durum* infatti possiede il frutto secco indeiscente, cariosside, di dimensioni maggiori rispetto al frumento tenero, rivestito da uno strato di endosperma molto più rigido (da qui il nome *durum*), di colore giallo ambrato e dall'aspetto vitreo. La struttura e la funzione dell'endosperma sono aspetti di grande interesse e sui quali si è ampiamente discusso anche per i consolidati benefici nutrizionali derivanti dall'amido e dalle proteine in esso contenuti. Per quanto riguarda le esigenze pedologiche il frumento duro è in grado di esprimere alti livelli di produttività in presenza di terreni piuttosto argillosi e dotati di buona capacità idrica e per molti paesi costituisce l'unica forma di valorizzazione economica. Anche in Italia riveste particolare importanza con circa 3 milioni di ettari di superficie investiti in questa coltivazione e contribuendo con la quota nazionale in maniera modesta alla produzione cerealicola comunitaria (fonte: <http://www.dat.istat.it>). Nonostante ciò, il comparto del frumento italiano sconta una posizione di debolezza rispetto agli altri paesi per qualità del prodotto, costi e organizzazione, che costringono l'Italia all'importazione da Paesi esterni all'UE. Questi punti deboli potrebbero creare nel tempo un danno all'immagine dei prodotti "made in Italy", come la pasta, di cui l'Italia detiene il primato come maggior produttore ed esportatore. L'utilizzo di specie varietali ad alta qualità e purezza e le adeguate tecniche agronomiche volte ad ostacolare lo sviluppo di malattie fungine, sono requisiti fondamentali che i Paesi produttori ed esportatori di granella a frumento duro devono possedere per poter commercializzare un prodotto di qualità (Direttiva 66/402/CEE del 1966).

1.2 Le fusariosi dei cereali

Le fusariosi dei cereali sono malattie che colpiscono le piante nei diversi cicli riproduttivi della coltura. L'attacco può avvenire ad opera di diversi agenti patogeni (specialmente funghi e virus), in grado di colpire i differenti organi della pianta come la base del culmo, le radici, l'apparato fogliare o, ancora, la spiga o il seme, interferendo sul regolare sviluppo della pianta e compromettendo totalmente o parzialmente la

produzione di granella. La rapidità di diffusione di una malattia può dipendere dall'interazione di tre fattori principali quali, la virulenza del patogeno, le condizioni climatico-ambientali favorevoli e ancora la suscettibilità della pianta ospite all'attacco del patogeno. Le malattie a carico del frumento maggiormente diffuse sono: la fusariosi del colletto e la fusariosi della spiga (Backhouse *et al.*, 2004; Corazza *et al.*, 2002; Scherm *et al.*, 2013; Smiley e Patterson, 1996; Wachaga e Muthomi, 2007).

1.2.1 La fusariosi del colletto

La fusariosi del colletto, anche chiamata “mal del piede”, è una malattia a sintomatologia molto complessa, che si manifesta principalmente a carico dell'apparato radicale della pianta, nella parte basale del culmo, con imbrunimenti più o meno estesi del fusto e delle radici (Figura 1). I sintomi si possono manifestare in post-emergenza anche a carico delle parti aeree della pianta, per interruzione del flusso di acqua e di nutrienti dalle porzioni basali con precoce maturazione delle spighe (spighe bianche), che risultano di seguito completamente vuote o contenenti cariossidi striminzite e conseguente perdita in termini qualitativi e quantitativi. I danni si ripercuotono anche a livello agronomico, determinando una ridotta crescita delle piante e fallanze nel seminato per mancata emergenza della plantula o per morte in fase di post emergenza. La complessità di questa patologia risiede nel numero e nella diversità dei microrganismi che la determinano, tra cui si citano: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *Microdochium nivale*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* e *Bipolaris sorochiniana*, che possono agire singolarmente o sinergicamente sullo stesso ospite. In Italia, tra i possibili agenti causali del “mal del piede”, *F. culmorum* è risultato il più diffuso (Corazza e Balmas, 1994).



Figura 1. Imbrunimento basale del culmo e della radice causate da *F. culmorum*

1.2.2 La fusariosi della spiga

La fusariosi della spiga (FHB) è una fitopatia largamente diffusa in Europa, Sud Africa, Sud America, Stati Uniti, Canada e Asia (Balmas *et al.*, 1998; Bottalico e Perrone, 2002; McMullen *et al.*, 1997) e tra le più distruttive del frumento. In territorio nazionale è comparsa già a partire dal 1900 (Peglion, 1900) e nel corso degli anni si è diffusa in maniera rilevante nelle diverse aree cerealicole italiane. Le principali specie fungine che causano l'insorgenza di questa malattia appartengono al genere *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. triticum*) e al genere *Microdochium* (*M. nivale nivale* e *M. nivale majus*). Da spighe affette da fusariosi possono essere isolate anche altre specie micotossigene di *Fusarium* come *F. poae*, *F. langsethiae* e *F. cerealis* ma con frequenza minore (Balmas *et al.*, 2000; Infantino *et al.*, 2007). Gli agenti patogeni ritenuti tra i più aggressivi e maggiormente responsabili dell'insorgenza della malattia sono *F. graminearum* e *F. culmorum* (Brennan *et al.*, 2003; Stack and MacMullen, 1985). La specie *graminearum* è più diffusa nelle regioni temperate (Logrieco *et al.*, 2002) mentre *F. culmorum* sembra prediligere zone dove vi è carenza idrica e temperature elevate (Cariddi e Catalano, 1990; Strunnikova *et al.*, 2000). Il ciclo epidemiologico della malattia ha inizio nel terreno, in seguito al contatto diretto dei patogeni, o sottoforma di clamidospore (spore durevoli) o come micelio nei residui colturali infetti, con la pianta ospite. Su residui e organi vegetali infetti i funghi producono le spore che, diffuse nell'ambiente tramite il vento e la pioggia, causano infezioni a carico delle spighe. I sintomi, facilmente riconoscibili per lo sbiancamento della parte infetta della spiga rispetto a quella sana, sono caratterizzati da disseccamento parziale o totale del rachide con conseguente prematura essiccazione della spiga (Figura 2).



Figura 2. Dissecamento parziale o totale del rachide ed essiccazione della spiga causate da *F. culmorum*

E' possibile delineare una scala della gravità di attacco (da 0 a 6) della fusariosi della spiga su frumento e il corrispettivo valore di dissecamento della spiga espresso in percentuale (Figura 3).



Figura 3. Gravità di attacco della fusariosi della spiga (da 0 a 6) e percentuale di dissecamento (da 0% a 100%)

In condizioni particolarmente umide i funghi possono formare sulla superficie della spiga uno strato di micelio bianco rossastro e/o ammassi arancioni detti sporodochi (fruttificazioni agamiche) (Champeil *et al.*, 2004). Anche la cariosside è soggetta ad infezioni, le più precoci ne impediscono la formazione, quelle che colpiscono le cariossidi nei primi stadi di sviluppo ne determinano una riduzione nelle dimensioni e nel loro peso unitario e specifico; mentre quelle tardive modificano le caratteristiche nutritive della granella attraverso la distruzione delle pareti cellulari con conseguente alterazione delle frazioni lipidiche e proteiche e l'accumulo di quantità più o meno rilevanti di micotossine (Prodi *et al.*, 2009). Tutto ciò si traduce in una perdita anche nel

settore economico-produttivo. Il caldo umido e le abbondanti piogge, in coincidenza con le fasi fenologiche, comprese tra fioritura e maturazione della spiga, sono condizioni ideali all'insorgenza e sviluppo della fusariosi (Schroeder e Christensen, 1963). Oltre alle condizioni climatiche, tra i fattori che possono influire sul decorso della malattia vi sono anche le tecniche colturali adottate, la sensibilità varietale, la virulenza del fungo, una scarsa o esagerata concimazione, la competizione delle infestanti, trattamenti fungicidi con principi attivi o dosaggi inadeguati, stress biotici o abiotici predisponenti le piante alle infezioni fungine (Balmas *et al.*, 1998; Miraglia e Brera, 1999; Reyneri *et al.*, 2010). In Italia, la graduale espansione delle coltivazioni di frumento, soprattutto nelle zone centro-settentrionali, ha fatto sì che i patogeni trovassero le condizioni climatiche ideali al loro insediamento, con incidenza della malattia variabile in relazione all'anno di coltura, area di coltivazione e varietà di frumento (Pancaldi *et al.*, 2010).

1.2.3 Agenti patogeni

Il "mal del piede" e la fusariosi della spiga sono causati da numerose specie fungine appartenenti soprattutto al genere *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*), di cui *F. graminearum* e *F. culmorum* sono ritenuti i più aggressivi e tossigeni su frumento e orzo (Brennan *et al.*, 2003) e sui quali è stata rivolta la nostra attenzione in questo lavoro di ricerca. Nello specifico, la patogenicità delle specie *F. culmorum* e *F. graminearum* si esplica attraverso la produzione di spore agamiche in forma di macroconidi che, grazie alle piogge e al vento, vengono veicolate dal suolo verso la pianta ospite e, una volta depositatesi sulle parti basali della pianta, possono germinare e dare inizio al processo infettivo.

1.2.4 *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc.

F. culmorum è un fungo ubiquitario del terreno annoverato insieme a *F. graminearum* Schwabe (telomorfo=*Gibberella zeae*) e *F. pseudograminearum* O'Donnell e Aoki (telomorfo=*Gibberella coronicola*) tra i principali agenti causali del mal del piede e della fusariosi della spiga nel mondo (Goswami e Kistler, 2004; Wagacha e Muthomi, 2007; Wang *et al.*, 2006). La modalità di attacco si esplica a livello del culmo, in

seguito alla penetrazione del fungo attraverso gli stomi delle guaine fogliari che avvolgono la base dello stelo, oppure attraverso lesioni della pianta ospite in fase di germinazione del seme. Non essendo un patogeno sistemico, l'infezione non va oltre i primi due internodi basali della pianta (Clement e Parry, 1998). A livello morfologico, *F. culmorum* è facilmente riconoscibile perché produce macroconidi dalle pareti spesse e curve con 3-5 setti, dalle dimensioni dell'ordine dei micron (Figura 4). I macroconidi si generano a partire da conidiofori monofialidici ramificati o da sporodochi di colore arancione e si presentano piuttosto corti e tozzi, con una cellula apicale smussata ed una basale leggermente accennata o con un piede ben formato (Balmas *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 2006).

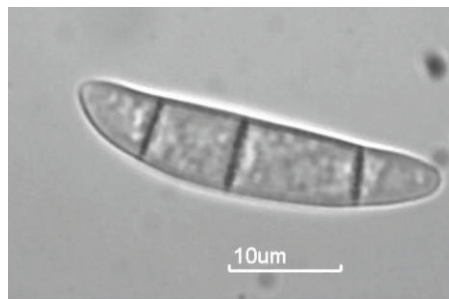


Figura 4. Macroconidio settato di *F. culmorum*

A partire da macronidi o come unità singole, o ancora aggregate a formare catene, *F. culmorum* è in grado di formare le clamidospore, spore di resistenza, dalla parete ispessita e ricche di sostanze di riserva, capaci di sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli (Corazza e Balmas, 1994). L'accrescimento in vitro delle colonie di *F. culmorum* si può osservare facilmente su piastra contenente potato dextrose agar (PDA), caratterizzato dalla comparsa di micelio aereo fioccoso di colore bianco tendente al giallo e rosso sulla faccia dorsale (Figura 5A) e di colore rosso mattone su quella ventrale (Figura 5B) (Burgess *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 1983).

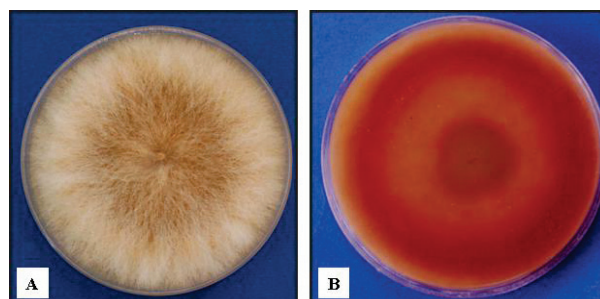


Figura 5. Accrescimento colonie di *F. culmorum* su PDA. (A) faccia dorsale; (B) faccia ventrale.

I funghi appartenenti al genere *Fusarium* sono anche produttori di micotossine, metaboliti secondari, in grado di resistere alle alte temperature e che, se accumulati in concentrazioni elevate nel cibo e nelle derrate alimentari, possono causare effetti dannosi sia all'uomo che agli animali (Marasas *et al.*, 1984; Sudakin, 2003). Le micotossine sono talmente nocive da determinare ingenti perdite in termini di qualità e quantità della granella. Tra le micotossine prodotte da *Fusarium* si ritrovano lo zearalenone, le fumonisine e i tricoteceni. Al gruppo dei tricoteceni appartengono il deossinivalenolo (DON) e il nivalenolo (NIV), tossine prodotte nello specifico da *F. culmorum* (Bensassi *et al.*, 2010; Bottalico e Perrone, 2002), capaci di inibire la sintesi proteica (Wei e McLaughlin, 1974), con effetti di tipo immunosoppressivo, dermatotossico ed emorragico se assunti per ingestione di alimenti contaminati e dall'altra parte, in grado di condizionare il processo infettivo da parte dei *Fusarium* patogeni (Bai *et al.*, 2002; Desjardins *et al.*, 1996, 2000; Harris *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2006; McCormick 2003; Proctor *et al.*, 1995, 2002; Scherm *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Dal punto di vista epidemiologico *F. culmorum* è molto diffuso nelle zone del centro, nord ed ovest dell'Europa, dove ben si adatta ai climi freddi, anche se ultimamente è rilevante la sua presenza anche nelle regioni del Centro Italia (Corazza *et al.*, 2002; Fakhfakh *et al.*, 2011; Pancaldi *et al.*, 2010).

1.3 Le micotossine

Le micotossine sono metaboliti secondari dell'attività dei funghi filamentosi, altamente tossici per l'uomo e per gli animali. L'interesse per questa classe di composti risiede proprio nelle micotossicosi e nelle patologie cancro-degenerative che sono in grado di scatenare nell'organismo umano ed animale (Zöllner e Mayer-Helm, 2006) in seguito all'ingestione di alimenti contaminati. Le micotossine sono prodotte da diverse specie di funghi, appartenenti principalmente ai generi *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. A causa dell'elevata percentuale di diffusione nelle derrate alimentari, queste sostanze tossiche contaminano la dieta di una larga proporzione della popolazione del nostro pianeta, cosicchè la correlazione tra micotossine e salute umana costituisce un problema

a livello mondiale. In tabella 1 sono riportati i prodotti alimentari che possono essere contaminati da micotossine.

Tabella 1: Principali funghi produttori di micotossine e alimenti contaminati

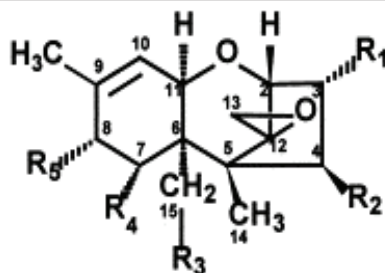
Micotossine	Fungo produttore	Alimento contaminato
Aflatossine B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Arachidi e leguminose, mais ed altri cereal, semi oleosi, noci e mandorle
Zearalenoni zearalenone, zearalenolo	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	Mais ed altri cereali
Ocratossine ocratossina-A, ocratossina-B	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Orzo, mais ed altri cereali. Pane, pasta ed altri prodotti da forno. Prodotti a base di cacao
Tricoteceni tossina T-2, deossinivalenolo (DON), nivalenolo (NIV)	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. trincictum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. croockwellense</i> , <i>F. solani</i>	Mais, orzo ed altri cereali
Fumonisine	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Mais e prodotti a base di mais
Rubratossine rubratossina-A, rubratossina-B	<i>Penicillium rubrum</i> , <i>P.</i> <i>purpurogenum</i> , altri <i>Penicillium</i> spp.	Mais ed altri cereali
Citrinina	<i>Penicillium</i> spp.	Cereali
Patulina	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	Pomacee

La contaminazione può avvenire nelle fasi di pre e post-raccolta (Magan *et al.*, 2003, Monbaliu *et al.*, 2012), durante il trasporto o lo stoccaggio o, ancora, a causa delle continue precipitazioni e delle temperature elevate che rendono l'ambiente favorevole

allo sviluppo delle tossine (Lacey *et al.*, 1999). La peculiarità delle micotossine è quella di resistere a lungo nei prodotti contaminati anche dopo la morte del fungo produttore e di andare incontro a qualsiasi processo chimico-fisico senza subire alterazioni o distruzioni molecolari (Aziz *et al.*, 1997; Yumbe-Guevara *et al.*, 2003). L'impatto sulla salute umana attribuibile alle micotossine è verosimilmente molto differente nelle diverse regioni del mondo; in molti paesi a basso reddito per esempio, dove l'alimentazione è rappresentata esclusivamente da cereali, le micotossine sono presenti in maniera continuativa e ad alto livello. Nei paesi industrializzati, ed in particolare nell'Unione Europea, in virtù dei limiti di legge in vigore, ragionevolmente restrittivi, il consumatore può essere esposto in maniera cronica, ma solo a livelli bassi di micotossine (IV Congresso Nazionale "Le micotossine nella filiera agro-alimentare". Istituto Superiore di Sanità. Roma, 2012).

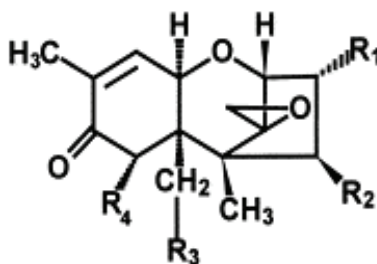
1.3.1 I tricoteceni: aspetti generali

I tricoteceni costituiscono una famiglia di circa 200 tossine, termicamente stabili, che presentano una struttura comune a tre cicli (12,13 epossitricotec-9-ene), il *core* della molecola, responsabile della loro attività tossica. Le differenze nella struttura del *core* permettono di distinguere i tricoteceni in 4 gruppi. Ai gruppi A e B appartengono i tricoteceni di maggior importanza. Il gruppo A comprende le tossine T-2 e la sua forma acetilata (AcetilT-2), l' HT-2, il Neosolaniolo (NEO) e il Diacetossiscirpenolo (DAS) con la sua forma acetilata (15 Acetossiscirpenolo). I tricoteceni del gruppo B comprendono il Deossinivalenolo (DON) e i suoi derivati mono (3 e 15-ADON) e diacetilati (3,15-ADON), il Nivalenolo (NIV) (Bottalico e Perrone, 2002; Goswami e Kistler, 2004) e il Fusarenone X (FUSX) (Figura 6).



Group A Trichothecenes

	MW	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Neosolaniol	382	OH	OAc	OAc	H	OH
HT-2 Toxin	424	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Toxin	466	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Triol	382	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Tetraol	298	OH	OH	OH	H	OH
Scirpentriol	282	OH	OH	OH	H	H
15-Monoacetoxyscirpenol (MAS)	324	OH	OH	OAc	H	H
4,15-Diacetoxyscirpenol (DAS)	366	OH	OAc	OAc	H	H



Group B Trichothecenes

	MW	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Deoxynivalenol (DON)	294	OH	H	OH	OH
3-Acetyl-DON	338	OAc	H	OH	OH
15-Acetyl-DON	338	OH	H	OAc	OH
Nivalenol	312	OH	OH	OH	OH
Fusarenon-X (4-Acetyl-nivalenol)	354	OH	OAc	OH	OH

Figura 6. Formula di struttura dei tricoteceni del gruppo A e B (tratto da Langseth e Rundberget, 1998)

Sulla base del tricotecene prodotto, le specie di *F. graminearum* possono essere ulteriormente distinte in chemiotipi. La caratterizzazione chemiotipica delle specie di *Fusarium* rappresenta uno strumento utile per determinare il potenziale tossigenico dei diversi ceppi (Pasquali e Migheli, 2014; Rebib *et al.*, 2014). In Italia, dal nord al centro, è stato osservato che il chemiotipo più frequente è il 15 ADON (Covarelli *et al.*, 2015; Prodi *et al.*, 2011). Analogamente in altre aree del mondo, come Stati Uniti (Gale *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2015), Russia (Yli-Mattila *et al.*, 2009), Argentina (Reynoso *et al.*, 2011), Polonia (Stępień *et al.*, 2008), Lussemburgo (Beyer *et al.*, 2014; Pasquali *et al.*, 2010; Piec *et al.*, 2016) e Belgio (Oerke *et al.*, 2010) è stata osservata una predominanza del 15 ADON. La conoscenza dei chemiotipi prevalenti nei diversi areali del mondo è importante per valutare il possibile rischio di contaminazione da micotossine e ricercare *cultivar* resistenti alle fusariosi dei cereali (Balmas *et al.*, 2015).

1.3.2 La tossicologia dei tricoteceni

Riconoscere una manifestazione clinica da micotossicosi è molto complesso. Le micotossine, una volta ingerite, vengono assorbite a livello del tratto gastro-intestinale ed esplicano la loro azione su differenti organi bersaglio. La sintomatologia infatti, può manifestarsi con disturbi a carico dell'apparato gastrointestinale come vomito e diarrea, irritazioni cutanee, problemi alimentari legati ad inappetenza o rifiuto totale del cibo, aborti, sindromi immunosoppressive, emetiche ed emorragiche, fino alla cancerogenesi (Cavret e Lecoeur, 2006; Lee e Ryu, 2015; Pestka e Smolinski, 2005; Rotter *et al.*, 1996; Sakai *et al.*, 2007; Zöllner e Mayer-Helm, 2006). La quantità e la potenza fitotossica dei tricoteceni può variare sensibilmente all'interno della stessa specie, anche basse concentrazioni di tossina provocano, nella pianta ospite, sintomi visibili come necrosi (Desjardins *et al.*, 1993; 2000). Il Deossinivalenolo (DON), noto come vomitossina, provoca una sindrome emetica nei suini, caratterizzata da vomito, rifiuto dell'alimento e riduzione del peso corporeo. Essendo termoresistente, può essere isolata anche da alimenti commerciali come pane, biscotti, merendine, cereali da colazione e

fette biscottate (Bottalico e Perrone, 2002, Sudakin, 2003). I prodotti alimentari contaminati da micotossine rappresentano non solo un rischio sanitario per il consumatore, ma anche un danno a livello economico-produttivo per le ingenti perdite di prodotto disponibile al commercio (Lee e Ryu, 2015). La normativa nazionale e comunitaria ha affrontato da tempo il problema della contaminazione degli alimenti da micotossine, stabilendo specifici controlli ufficiali attraverso l’emanazione del Regolamento CE 1126/2007 che definisce i limiti massimi di DON nei prodotti alimentari (Tab.2). Per garantire un ulteriore margine di sicurezza alla salute umana, si è resa necessaria l’introduzione di un Regolamento CE 669/2009 relativo al livello accresciuto di controlli ufficiali sulle importazioni di alcuni mangimi e alimenti di origine non animale da Paesi Terzi. In Italia, gli USMAF (Uffici di sanità marittima, aerea e di frontiera del Ministero della Salute) esercitano un’azione di verifica capillare sulla sicurezza degli alimenti di origine non animale, creando un filtro protettivo a favore del territorio nazionale e del singolo cittadino (IV Congresso Nazionale “Le micotossine nella filiera agro-alimentare”. *Istituto Superiore di Sanità. Roma, 2012*).

Tabella 2: Tenori massimi ammissibili di DON secondo il Regolamento (CE) 1126/2007.

2.4	Deossinivalenolo	Tenori massimi (µg/kg) (ppb)
2.4.1	Cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granturco	1.250
2.4.2	Grano duro e avena non trasformati	1.750
2.4.3	Granturco non trasformato ad eccezione del granoturco non trasformato destinato alla molitura ad umido	1.750
2.4.4	Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.4.7, 2.4.8 e 2.4.9	750
2.4.5	Pasta (secca)	750
2.4.6	Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500
2.4.7	Alimenti a base di cereali trasformati e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
2.4.8	Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1103 13 o 1103 20 40 e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	750

2.4.9	Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1102 20 e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	1250
-------	---	------

1.4 I metodi di lotta alle fusariosi dei cereali

Dato il crescente interesse per le fusariosi dei cereali e i rischi di contaminazione umana da micotossine, diverse sono le strategie messe in atto al fine di limitarne lo sviluppo e la diffusione. Tra le tecniche di prevenzione, quelle agronomiche possono risultare tra le più efficaci nel ridurre la quantità di inoculo fungino presente naturalmente nel terreno. Le rotazioni con colture non suscettibili alla fusariosi come le leguminose in alternativa alla mono successione, adeguati livelli di concimazione del terreno o ancora, il controllo di eventuali stress idrici sono tutti accorgimenti volti a ridurre lo sviluppo delle infezioni (Corazza e Balmas, 1994; Degraeve *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 1991, Wagacha e Muthomi, 2007). Lavorazioni del terreno che prevedono un completo interrimento dei residui colturali come l'aratura, possono altresì ridurre lo sviluppo della malattia e l'accumulo di tossine. Tutto ciò non può esulare, in ultimo, da una scelta varietale appropriata; sono da preferire infatti *cultivar* resistenti agli attacchi fungini e di provata stabilità adattativa negli specifici areali di coltivazione, capaci di migliorare a costo zero rese, qualità e salubrità delle produzioni. Non sono però attualmente disponibili *cultivar* con queste caratteristiche (Pereyra *et al.*, 2004; Wisniewska e Kowalczyk, 2005) anche se sono noti alcuni genotipi che meglio di altri possono essere sfruttati grazie ad una maggiore resistenza all'FHB (Häberle *et al.*, 2009; Schmolke *et al.*, 2008), limitando così le perdite nella produzione e nell'accumulo di micotossine.

Ad oggi, il metodo più utilizzato per il contenimento dei *Fusarium* spp. fitopatogeni è l'utilizzo di fungicidi di sintesi, di cui i triazoli sono i più attivi (Balmas *et al.*, 2006; Nicholson *et al.*, 2003). I fungicidi sono in grado di penetrare e diffondersi rapidamente nei tessuti vegetali, ed esplicano la loro azione fungitossica a livello del metabolismo dei lipidi, componenti fondamentali della membrana cellulare, inibendo la biosintesi degli steroli con conseguente alterazione della funzionalità della cellula fungina. I fungicidi possono avere un'azione preventiva, bloccando la penetrazione dei funghi nei tessuti vegetali, oppure curativa, bloccando l'infezione al primo stadio o ancora eradicante, quando sono in grado di combattere la penetrazione dei funghi anche ad infezione avvenuta (sintomi visibili). Il momento d'intervento è differente: ad esempio,

nel caso della fusariosi della spiga, il momento ottimale coincide con la fioritura subito dopo un evento piovoso (Lamberti e Pancaldi, 2004; Haidukowski *et al.*, 2004). Il trattamento con fungicidi inoltre, agisce positivamente riducendo la produzione di tossine nella granella. Nonostante ciò, l'utilizzo di composti di sintesi non ha dato fino ad ora i risultati attesi in termini di contenimento della malattia, ed è stato osservato invece che un trattamento fito-farmacologico non idoneo e non conforme alle dosi consigliate può risultare del tutto inefficace, con ripercussioni negative non solo sull'ambiente, ma anche sulla salute umana ed animale (Bezerra e De Costa, 2009; Haidukowski *et al.*, 2005; Lyon *et al.*, 1995; Magan *et al.*, 2002) per eventuali residui dei composti chimici nella granella (Jones, 2000). E' sempre crescente, per ciò, l'interesse nel ricercare e caratterizzare sostanze naturali, non tossiche, da poter impiegare in alternativa agli agrofarmaci di sintesi. Inoltre, alla luce di un iperproduzione di molecole naturali di tipo fenolico biologicamente attive da parte della pianta come difesa all'attacco fungino e da una richiesta sempre maggiore da parte dei consumatori delle colture "biologiche", il cui disciplinare di produzione prevede il divieto di utilizzo di molecole di sintesi ad azione biocida, l'identificazione e l'utilizzo di nuove molecole di origine naturale diventa una reale necessità. Gli interventi con composti naturali e naturali-simili, utilizzati da soli o insieme a piccole dosi di fungicidi sintetici, potrebbero perciò trovare una loro applicazione nel limitare non solo l'accumulo di tossine nelle cariossidi ma inibire in modo naturale il potere patogenetico di *Fusarium*, limitando il rischio di insorgenza di ceppi ad alta resistenza (Scherm *et al.*, 2013). Sono numerosi a tal riguardo gli studi per dimostrare la capacità inibente di alcuni composti naturali sulla biosintesi dei tricoteceni di tipo B in *F. culmorum* (Boutigny *et al.*, 2010; Pani *et al.*, 2014; 2016). Sono numerosi gli studi sulle piante medicinali e i loro metaboliti da poter utilizzare come base per formulati farmacologici per i loro effetti benefici e terapeutici. E' stato ipotizzato a tal riguardo l'utilizzo degli oli essenziali estratti da alcune piante, come ad esempio il *Myrtus communis* o il *Cupressus sempervirens*, per contrastare lo sviluppo dei fitopatogeni e la produzione di micotossine (Al-Snafi, 2016; Kordali *et al.*, 2016). In letteratura sono riportati studi su un potenziale coinvolgimento dell'acido clorogenico e di uno dei suoi prodotti idrolizzati come l'acido caffeico nel ridurre significativamente la crescita del fungo e la biosintesi dei tricoteceni di tipo B. Entrambi gli acidi fenolici hanno messo in evidenza

effetti “antifungal” e “antimicotossin”. Questo va ad aggiungersi ai meccanismi di difesa chimica che la pianta può attuare contro l’attacco da parte di fusarium e la sua produzione di tossine (Gauthier *et al.*, 2016).

E’ risaputo che la colonizzazione della pianta da parte del fungo e la conseguente produzione di tossine sono il risultato dell'interazione di diversi fattori, tra i quali la diversità fungina è ampiamente studiata (Pasquali *et al.*, 2015). L’azione su composti che hanno un ruolo chiave nella crescita, lo sviluppo e la differenziazione delle cellule fungine come le poliammine, può quindi rappresentare un nuovo approccio per limitare la contaminazione da tossine nei cereali (Crespo-Sempere *et al.*, 2015) o ancora, interventi di tipo molecolare si stanno rivelando efficaci per contrastare la diffusione del fungo *F. culmorum* (Chen *et al.*, 2016).

1.5 Metodi molecolari per l’identificazione di geni di interesse in *F. culmorum*

L’importanza di *F. culmorum* quale fitopatogeno ampiamente diffuso in campo cerealicolo e produttore di micotossine e le poche conoscenze riguardo la sua struttura genetica, ci hanno spinto ad indagare attraverso metodi di genomica funzionale l’attività di alcuni potenziali geni bersaglio per nuove molecole fungicide. La disponibilità del genoma di *F. culmorum* fornirebbe, in tal senso, alla ricerca un punto di partenza dal quale poter proseguire per l’identificazione e successiva caratterizzazione molecolare e funzionale di geni coinvolti nei principali processi che regolano il ciclo biologico di questo fungo. Nonostante il genoma di *F. culmorum* sia stato sequenziato, ancora poco si conosce dei suoi geni e delle funzioni regolatrici che essi svolgono. Si è reso necessario, per tali ragioni, lo studio dei complessi meccanismi che regolano l’espressione di geni coinvolti nei processi di patogenicità e il ruolo dei tricoteceni durante i processi di infezione e colonizzazione della pianta ospite, al fine di formulare nuove possibili ed efficaci strategie per il contenimento del patogeno. Diverse sono le tecniche molecolari utili ad indagare sulla funzionalità e sulla manipolazione dell’espressione di geni nelle specie fungine; in questo progetto di dottorato è stata focalizzata l’attenzione principalmente sulla tecnica del gene knock-out mediante ricombinazione omologa e del transposon tagging.

1.5.1 Gene knock-out

Il gene knock-out è una tecnica di mutagenesi inserzionale mirata, volta all'inattivazione di un gene di interesse del genoma fungino attraverso inserimento "mirato" di DNA esogeno in un preciso *locus* del genoma mediante ricombinazione omologa. La sostituzione genica consente di determinare in che modo il gene sostituito influenzi l'organismo. Nei funghi filamentosi la sostituzione genica avviene per ricombinazione omologa della sequenza con il gene bersaglio esattamente all'altezza delle regioni di omologia e postula la previa conoscenza della sequenza genica. L'integrazione di una sola porzione del costrutto crea dei falsi positivi (trasformanti ectopici). Questo approccio sperimentale si è rapidamente diffuso e rappresenta una tecnica di elezione per l'analisi della funzione genica e si è rivelata particolarmente utile nel comprendere la funzione dei geni coinvolti nei processi di patogenicità, micotossigenicità e crescita del fungo (Colot *et al.*, 2006).

1.5.2 Mutagenesi inserzionale mediata da trasposoni

La mutagenesi inserzionale mediata da trasposoni (Transposon Tagging) è una tecnica che consiste nell'inserimento di costrutti di DNA esogeno, che codificano per elementi trasponibili nel genoma della cellula ospite. Questo procedimento permette di inattivare e, successivamente, caratterizzare geni con potenziale impatto sulla virulenza o sul metabolismo. I trasposoni sono elementi capaci di muoversi da un sito all'altro del genoma, sullo stesso cromosoma o su cromosomi diversi e di inserirsi in un gene o nelle sue vicinanze determinando l'inibizione della sua attività. Le modalità di inserzione possono essere differenti: si possono inserire casualmente all'interno di sequenze geniche, bloccandone l'attività, oppure nelle regioni a monte del gene regolando, quindi, la modalità di espressione dello stesso gene o, ancora, in porzioni non codificanti del DNA, senza alterare alcuna attività (Daboussi, 1996). I trasposoni sono stati utilizzati con successo negli anni novanta su differenti organismi, ma la loro prima identificazione nei funghi è avvenuta nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* (Boeke, 1989). I trasposoni possono essere distinti in tre classi in base alla modalità di trasposizione e alla loro struttura. Si distinguono i retrotrasposoni, che traspongono mediante trascrizione inversa di un intermedio a RNA, secondo un meccanismo di copia

e incolla; i trasposoni che traspongono mediante un meccanismo di taglia e incolla da cromosoma a cromosoma e, infine, tutti quegli elementi trasponibili di piccole dimensioni (es. *mimp1*) che non codificano per una propria trasposasi e che, pertanto, necessitano di trasposasi esogene per potersi muovere liberamente nel genoma. Nella tecnica del “transposon tagging” il DNA esogeno, sotto forma di trasposoni, viene veicolato all’interno della cellula ospite tramite dei plasmidi che portano un gene codificante per un marcatore di selezione in modo tale da permettere facilmente l’individuazione di ceppi trasformati. L’efficienza e la validità del transposon tagging è stata ampiamente descritta e non sono richieste, per la sua applicazione, conoscenze del genoma della specie ospite, ma permette di poter lavorare anche su genomi non ancora sequenziati o in fase di sequenziamento come nel caso di *F. culmorum*, dove poche sono le informazioni al riguardo di geni importanti per la patogenicità, metabolismo, germinazione e produzione di tossine. Uno dei vantaggi di questa tecnica è quella di poter creare una vasta libreria genica di trasformanti che abbiano inserito nel loro genoma una singola copia del costrutto di DNA esogeno che crea un fenotipo mutante e pertanto facilmente identificabili mediante il sito di reinserzione dell’elemento trasponibile. Il nostro obiettivo è stato quello di creare una copiosa collezione di mutanti di *F. culmorum*, possibilmente a singola integrazione con distribuzione casuale dell’elemento nell’intero genoma, in modo da agevolare il recupero degli eventi di inserzione/reinserzione, e poter indagare nuovi geni coinvolti nei processi fisiologici e metabolici del fungo al fine di identificare nuovi target per il contenimento del patogeno.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro di ricerca è stato quello di creare una vasta collezione di mutanti di *F. culmorum* attraverso l'applicazione di due tecniche alternative di mutagenesi inserzionale (Dufrense *et al.*, 2008, Spanu *et al.*, 2012). Le due metodiche utilizzate ci hanno permesso di individuare un qualche gene alterato nel suo stato funzionale, che fosse coinvolto nei processi di patogenesi o di sintesi di tricoteceni, mediante l'inserimento di elementi trasponibili capaci di silenziare, interrompere o comunque modificare i geni interessati.

La successiva caratterizzazione dei geni coinvolti nei processi di patogenicità/micotossicità è stata utile per arricchire l'informazione genetica di *F. culmorum* il cui genoma presenta sequenze geniche non ancora conosciute.

Lo studio si è proposto, inoltre, di porre le basi per un ipotetico sviluppo di metodi di contenimento alternativi dei funghi fitopatogeni, in grado di ridurre o inattivare i processi infettivi derivanti dall'attività micotossigena e garantire così una salubrità degli alimenti nel rispetto della salute umana.

Poiché il meccanismo di integrazione dell'elemento trasponibile all'interno del genoma è dettato esclusivamente dalla casualità, l'allestimento di collezioni di mutanti sempre più numerose, sarebbe auspicabile per incrementare la probabilità di identificare e caratterizzare la funzione di nuovi geni e avere così spunti per studi futuri.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale fungino

Il materiale di partenza per questo progetto di ricerca è stato un ceppo di *F. culmorum* M7, trasformante monocopia (Spanu *et al.*, 2012), ottenuto dalla trasformazione di protoplasti del ceppo MCf 21 nit1, mutato nel gene della nitrato reduttasi e quindi incapace di usare il nitrato come fonte di azoto e di crescere in maniera fioccosa su determinati substrati minimi. La trasformazione ha coinvolto i plasmidi pNm1H18, contenente il gene della nitrato reduttasi *niaD* interrotto dal trasposone *mimp1*, e pHE062, contenente la resistenza all'igromicina e la trasposasi *impalaE*. I ceppi wild-type utilizzati per la ricerca sono stati FcUK99 del ceppo *F. culmorum* e PH-1 del ceppo *F. graminearum*, entrambi produttori di micotossine della classe dei tricoteceni (DON, 3-ADON e 15-ADON). I ceppi M7, FcUK99 e PH-1 sono stati fatti crescere in beute da 250 mL, contenenti ciascuna 80 mL di mezzo liquido carbossimetilcellulosa (CMC; Cappellini e Peterson, 1965) sterile e chiuse con cotone idrofobo. Ciascuna beuta è stata inoculata con due dischetti di micelio del diametro di 0.5 cm ricavati da colonie dei relativi ceppi cresciuti in piastre Petri di Potato Dextrose Agar (PDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) di 7 giorni di età. Le beute sono state lasciate in incubazione a 25°C per 5 giorni al buio, in agitazione a 200 rpm, allo scopo di ottenere un'abbondante produzione di macroconidi. L'allevamento è stato portato avanti nel mezzo solido per successive analisi.

3.2 Collezione di revertanti

La coltura fungina cresciuta su CMC liquido è stata filtrata con fogli di Miracloth[®] e determinata dopo due lavaggi con acqua distillata sterile. La determinazione della concentrazione conidica è avvenuta al microscopio attraverso conta dei conidi nella camera contaglobuli e portata alla concentrazione finale di 1×10^6 CFU/ml. Piastre di un terreno minimale agarizzato, a pH 7.5, contenenti nitrato come unica fonte di azoto e ammendate con 50 µg/mL dell'antibiotico igromicina B (MM- nitrato H50, Migheli *et al.*, 2000) [2% (w/v) glucosio, 7.3 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 6.5 mM KCl, 36 mM

FeSO₄, 23.5 mM NaNO₃] e piastre senza antibiotico (MM), sono state inoculate con 10⁴ conidi per piastra (= 10 µL di una sospensione 1x10⁶ CFU/ml) rispettivamente dei ceppi M7 e MCf 21 nit1 e lasciate in incubazione a 25°C per 1 mese. Dopo circa 15 giorni di incubazione è stato possibile osservare la formazione di colonie attraverso la crescita fioccosa del micelio su piastra. Ogni colonia fioccosa rappresentava un evento di escissione e quindi anche un probabile evento di reinserzione del trasposone *mimp1* (che, prima dell'escissione, interrompeva il gene per la nitrato-reduttasi *niaD*) nel genoma. A questo punto tutte le colonie sono state trasferite su piastre contenenti PDA con 50 µg/mL dello stesso antibiotico, creando in questo modo una vasta collezione di revertanti. Questo è stato possibile perché il gene della nitrato reduttasi ha ripreso a funzionare, non essendo più interrotto dal trasposone *mimp1*.

3.3 Preparazione di colture monosporiche

Per evitare di avere nella stessa colonia fungina due eventi di trasformazione dovuti a spore differenti, si è proceduto alla purificazione della coltura mediante la preparazione di colture monosporiche. Dischetti di micelio del diametro di 0.5 cm di ciascun revertante sono stati trasferiti in eppendorf sterili da 2 mL contenenti 1 mL di CMC ed incubati a 120 rpm, 25°C per 3-4 giorni, per favorire la formazione delle spore. Il contenuto delle eppendorf è stato successivamente trasferito in tubi di vetro contenenti 10 mL di H₂O sterile e dopo breve agitazione manuale, versato su piastre di Acqua Agar (AA, 1.5% [w/v] agar in H₂O).

Le piastre, lasciate riposare per circa 10 sec, sono state private della parte liquida in eccesso ed incubate a temperatura ambiente in posizione verticale per 18 ore. Allo stereo microscopio, le singole spore sono state circoscritte, prelevate e trasferite su nuove piastre di PDA o PDA-H50 e lasciate in crescita nel termostato alla temperatura di 25°C.

3.4 Caratterizzazione molecolare dei revertanti

Per provare ogni singolo evento di trasposizione dell'elemento *mimp1* nel genoma, sono state effettuate analisi PCR mediante due coppie di primers specifici disegnati in un caso attorno al sito di inserzione di *mimp1* (niaD144/niaD754r; vedi Tab.3) e nell'altro caso, situati direttamente sull'elemento trasponibile (mi1/SacF) sui ceppi revertanti che mostravano delle alterazioni fenotipiche su piastra. La prima coppia di primers è servita per identificare gli eventi di escissione dell'elemento trasponibile *mimp1* dal genoma, mentre la coppia di primers mi1/SacF è stata utilizzata per valutare l'effettiva reintegrazione di *mimp1* in un'altra parte del genoma. Secondo il protocollo descritto da Spanu et al. (2012) sono state eseguite un'analisi PCR e una splinkerette-PCR (sp-PCR; Potter *et al.*, 2010) per amplificare le sequenze fiancheggianti il sito di inserzione del trasposone nel genoma e poterlo identificare. I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio al 3% (1*32 wells, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in tampone 1x TAE (Tris-Acido Acetico – EDTA). Per ciascun campione sono stati caricati 10 µL di amplificato ed esposto a 110 V per 40 min.

Le immagini del gel sono state catturate tramite un analizzatore (Ingenius Syngene Bio Imaging, Syngene, Cambridge, UK). Le bande fluorescenti sono state comparate al marker MassRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use (80-1031 bp, Thermo Scientific) e al controllo positivo del ceppo PH1 della collezione del fungo *F. graminearum*. La coppia di primers niaD144 e niaD754r ha evidenziato l'amplificazione di un frammento di 717 bp nei ceppi co-trasformati di controllo e di 493 bp nei ceppi revertanti, dovuta all'escissione del trasposone *mimp1*; la coppia di primers mi1/SacF, invece, ha evidenziato l'amplificazione di un frammento di 121 bp a dimostrazione dell'avvenuta re-inserzione dell'elemento *mimp1* nel genoma dei ceppi revertanti. Il prodotto PCR è stato purificato per mezzo del Kit PureLink® PCR Purification (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e successivamente sequenziato.

Tabella 3: Lista primer usati in questo progetto

Identificazione trasformanti mediante PCR	Sequenze primer
niaD144	5'GTTTCATGCCGTGGTCGCGC3'
niaD754r	5'AGTTGGAATGTCCTCGTCG3'
mi1	5'TACAGTGGGATGCAATAAGTTTGAATAC3'
SacF	5'GGCTAGATCGAGCTCCCTCCTCAG3'

Splinkerette PCR	Sequenze primer
SPLNK-BOT	5'CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGGCTGAATG AGACTGGTGTGCGACACTAGTGG3'
SPLNK-GATC-TOP	5'GATCCCCTAGTGTGCGACACCAGTCTCTAATTTTTTTTTTTC AAAAAAA3'
SPLNK#1	5'CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACC3'
SPLNK#2	5'GTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCGAC3'
2R	5'CTGAGGAGGGAGCTCGATCTTAGCC3'
3R	5'GTAGCGTGGCTCAAAGAGGC3'
M1Div53F	5'GCCTCTTTGAGCCACGCTAC3'
SacF	5'GGCTAGATCGAGCTCCCTCCTCAG3'

3.5 Analisi fenotipiche dei revertanti

Una volta accertata la reinserzione del trasposone *mimp1*, si è proceduto ad identificare nell'intera collezione di revertanti se l'elemento trasponibile si fosse o meno inserito in un punto del genoma responsabile di qualche attività metabolica. Dischetti di micelio (0.5 cm Ø) di ciascun revertante dell'intera collezione e il suo ceppo co-trasformato M7 sono stati coltivati su piastre di PDA ammendato con diversi reagenti (2M Sorbitolo o 1M NaCl, 0,02% SDS, 30mM Persolfato di Potassio, 0.05 ppm Tebuconazolo) per valutare la crescita nelle differenti condizioni di stress (stress osmotico, ossidativo e tolleranza al fungicida). Le piastre sono state incubate al buio alla temperatura di 25°C e dopo 3 giorni è stato osservato l'aspetto del micelio ed annotato il valore del diametro di crescita di ciascun revertante rispetto al suo controllo M7. La prova è stata eseguita in triplicato e i risultati ottenuti su PDA sono stati confermati su substrato specifico Czapeck dox agar (Oxoid Limited, Hampshire, UK).

3.6 Estrazione del DNA

Per facilitare il recupero del micelio, ritagli di Mira cloth sterile (Merck Millipore, Darmstadt, Germania) del diametro di 5 mm sono stati posizionati su piastre Petri contenenti un substrato a base di succo di pomodoro (V8) insieme a dischetti di micelio e incubate a 22°C al buio per 5 giorni. Trascorsi i 5 giorni, i ritagli di Mira cloth ricoperti

di micelio sono stati rimossi dalle piastre Petri e disposti in tubi Eppendorf contenenti 100 µL di AE buffer (10mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA; pH 9.0).

Il DNA è stato estratto tramite irradiazione al microonde (Easytronic, M571, Whirlpool) ad una potenza di 750 W per 5 min in accordo con il protocollo di Pallez et al. Dopo estrazione, il DNA è stato osservato su gel di agarosio 1% (Biorad, Hercules, California, USA). Le bande fluorescenti, ottenute dopo la corsa del gel a 110 Volt per 5 min, poi a 80 V per 1h30min, esposte alla luce UV, sono state comparate con il marker DNA Ladder (0.1–10.0 kb, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA). La purezza dei campioni (260/280) è stata calcolata attraverso lo strumento NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA). I ceppi sono stati conservati a -80°C per successive analisi.

3.7 Knock-out dei geni FGSG_00332 e FGSG_17209

In accordo con Pasquali *et al.*, 2013, sono stati condotti esperimenti di mutagenesi inserzionale mirata su geni noti dei ceppi FcUK99 e PH-1 per verificare la corretta integrazione del costrutto esogeno a livello del gene. Sono state eseguite analisi PCR con coppie di primers specifici in grado di riconoscere le sequenze geniche a monte e a valle del gene di interesse e dell'igromicina, in modo da poter discriminare trasformanti knock-out da trasformanti ectopici. La PCR è stata eseguita in un volume finale di 20 µL contenente: 1X Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix con HF Buffer (New England Biolabs), 0.5 µM di ciascun primer e 20 ng di DNA. Le coppie di primer forward e reverse utilizzate erano: 1F-FGSG00332 e 4R-FGSG00332; NF-FGSG00332 e NR-FGSG00332; NF-FGSG00332 e 4R-FGSG00332; 1F-FGSG00332 e NR-FGSG00332 nel caso di un gene e 1F-FGSG17209 e 4R-FGSG17209; NF-FGSG17209 e NR-FGSG17209; NF-FGSG17209 e 4R-FGSG17209; 1F-FGSG17209 e NR-FGSG17209 nel caso del secondo gene (Tab.4).

Tabella 4: Sequenze primer utilizzate per ottenere il costrutto dei trasformanti e identificare mutanti knock-out mediante PCR

Split-marker recombination	Sequenze primer
HY1F	5'-GGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAA-3'
HY2R	5'-GCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGA-3'

YG1F 5'-GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCT-3'
 YG2R 5'-GAACCCGCGGTCGGCATCTACTCTAT-3'

Identificazione di mutanti K.O. mediante PCR	Sequenze primer
FG_00332 1F	5'-CACTCAATGTGTCTTTTTGTACCTG-3'
FG_00332 2R	5'-TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCC-3'
FG_00332 3F	5'-GAATAGAGTAGATGCCGACCGCGGGTTC-3'
FG_00332 4R	5'-CAGTCCCCAGCATTACATTTATTAG-3'
FG_00332 NF	5'-CACACAAGTTGATAAGGTTGAGGAG-3'
FG_00332 NR	5'-GTTCCATGAGAGTTTGATGATAGGT-3'

Identificazione di mutanti K.O. mediante PCR	Sequenze primer
FG_17209 1F	5'-CACTCAATGTGTCTTTTTGTACCTG-3'
FG_17209 2R	5'-TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCC-3'
FG_17209 3F	5'-GAATAGAGTAGATGCCGACCGCGGGTTC-3'
FG_17209 4R	5'-CAGTCCCCAGCATTACATTTATTAG-3'
FG_17209 NF	5'-CACACAAGTTGATAAGGTTGAGGAG-3'
FG_17209 NR	5'-GTTCCATGAGAGTTTGATGATAGGT-3'

3.8 Test di patogenicità del “mal del piede”

Su tutta la collezione di revertanti ottenuta, sono stati selezionati coloro che mostravano una crescita fenotipica atipica su piastra e sono stati sottoposti ad un test di patogenicità per mettere in evidenza se il trasposone *mimp1* fosse riuscito o meno ad inserirsi all'interno o vicino ad un gene che condiziona la virulenza per il mal del piede di *F. culmorum* MCf21. Sono stati perciò condotti degli esperimenti dapprima *in vitro* e in seguito *in planta* per confermare i risultati osservati, mantenendo le stesse condizioni. Su piastre di PDA dei revertanti accertati, sono stati effettuati 10 dischetti del diametro di 1.5 cm e riposti in piastre Petri sterili; su ciascun dischetto di micelio poi è stato adagiato un seme di frumento (*Triticum durum* cv. Iride) mediante pinze sterili. Le piastre sono state incubate al buio per 3-5 giorni alla temperatura di 25°C. Il saggio *in planta* è stato eseguito alle stesse condizioni termiche, sottoponendo i dischetti di micelio provvisti di cariossidi in un terreno sterile. L'emergenza delle piantine di

frumento è stata valutata dopo 21 giorni di incubazione e la gravità di attacco sul culmo è stata calcolata mediante l'indice di McKinney attribuendo a ciascun sintomo un valore secondo una scala da 0 a 4, dove 0 corrispondeva a nessun sintomo della malattia, 1 a leggeri imbrunimenti alla base del culmo, 2 a metà culmo della pianta imbrunito, 3 al culmo della piantina completamente imbrunito e infine il valore 4 attribuito alla piantina morta dopo l'emergenza o non emersa del tutto (McKinney 1923; Spanu *et al.*, 2012). La patogenicità dei revertanti è stata confrontata rispetto ad un controllo negativo (senza il patogeno) e il cotrasformante di accertata virulenza (M7, FcUK99 e PH-1).

3.9 Test di patogenicità della fusariosi della spiga

Per valutare l'aggressività dei mutanti nel determinare la fusariosi della spiga e la loro capacità di disseccamento del frumento, sono state allestite delle prove di patogenicità sia in serra che in campo. Sono stati utilizzati due differenti approcci: il metodo dell'inoculazione diretta (point inoculation) mediante inoculazione del ceppo di interesse direttamente all'interno della spiga e il metodo dell'infezione della pianta mediante vaporizzazione della sospensione conidica. Il metodo della point inoculation è stato eseguito iniettando, a partire dalla quinta spighetta, privata precedentemente delle reste, 10 µL di una sospensione 1×10^6 CFU/ml (10^4 conidi) precedentemente diluita con 1 microlitro di Triton per ogni 100 microlitri di sospensione conidica. Il secondo metodo è stato eseguito attraverso vaporizzazione delle spighe con 4 mL di una sospensione conidica concentrata 10^5 conidi/ml. Le spighe infettate sono state successivamente nebulizzate con acqua, incappucciate con sacchetti di plastica e richiuse mediante laccetti per 48 ore in modo da creare le condizioni ideali allo sviluppo della malattia. Entrambe le prove sono state eseguite in triplicato e sono state scelte 5 spighe di ciascun ceppo. Il livello di patogenicità è stato valutato dopo 21 giorni di trattamento usando l'indice di McKinney. I trattamenti sono stati condotti su *cultivar* di frumento duro Iride e Saragolla.

3.10 Phenotype Microarray

Per capire la funzione biologica e quindi l'espressione fenotipica di alcuni geni, sono state messe a punto differenti tecnologie e approcci efficienti in grado di sviluppare questa relazione gene-fenotipo (Bochner, 2003). Studi di genomica funzionale e proteomica sfruttano le informazioni genomiche per studiare quale sia l'impatto che un gene alterato di un organismo determina a livello fenotipico ma non descrivono completamente il fenotipo dell'organismo. E' stata studiata la tecnologia del Phenotype Microarray (PM) come strumento per caratterizzare il metabolismo di un ceppo fungino non ancora conosciuto o di un ceppo mutante (Atanasova e Druzhinina, 2010).

Per osservare la capacità di utilizzazione di fonti di carbonio da parte dei funghi e identificare nuove strategie di controllo biologico contro l'attacco di fitopatogeni (Khalil e Alsanius, 2009), è stato condotto uno studio attraverso l'utilizzo di micropiastre di identificazione FF a 96 pozzetti (Biolog, Haward, CA, USA) contenenti ciascuno un substrato differente.

Il metodo è stato ampiamente utilizzato nello studio di batteri e lieviti (Geldreich *et al.*, 1985; McGinnis *et al.*, 1996). Il primo processo di identificazione attraverso l'utilizzo di fonti di carbonio è stato effettuato su un microbo nel 1920 dal microbiologo Dooren de Long. Attraverso questa tecnologia è possibile valutare il "fingerprint" digitale di qualsiasi organismo valutando la capacità di metabolizzare fonti di carbonio (Bochner, 1989; Bochner *et al.*, 2001).

Dischetti di micelio dei ceppi wild-type M7, FcUK99 e PH-1 e i rispettivi mutanti R38 e R386; Fc7, Fc11, Fc22, B6, B24, B51 e G2, G8, G10; sono stati trasferiti in beute contenenti 150 mL di CMC liquido ed incubati a 25°C al buio in agitazione per 5 giorni per consentire la produzione di conidi. La sospensione conidica è stata filtrata con 4 fogli di Miraclot (Calbiochem, Merck Darmstadt, Germania) e il pellet lavato con acqua sterile e centrifugato per 3 volte. La concentrazione finale della sospensione conidica di 1×10^5 conidi/mL è stata determinata mediante osservazione al microscopio e conta alla camera contaglobuli di Thoma. Successivamente 1.5 mL di questa sospensione conidica sono stati addizionati al fluido di inoculo FF portandolo alla concentrazione finale di 1×10^4 conidi/mL. Del fluido di inoculo, 100 μ L sono stati pipettati all'interno dei 96 pozzetti e le micropiastre, prodotte in triplicato per ciascun campione, sono state incubate in un lettore di piastre Omnilog (Biolog, Haward, CA,

USA) a 25°C per 72 ore e la lettura effettuata ogni 15 minuti a 750 nm. I dati sono stati elaborati ed analizzati mediante due software OmniLog-OL_PM_FM/Kin 1.30 e OmniLog-OL_PM_Par 1.30 e le curve di crescita ottenute sono state comparate con la curva relativa al pozzetto di controllo contenente solo acqua.

3.11 Analisi quantitativa delle micotossine

Per l'analisi *in vitro* della produzione di micotossine, sono stati selezionati i seguenti trasformanti knock-out Fc7-Fc22-B24-B51 per il ceppo wild-type FcUK99 (del ceppo *F. culmorum*), G8-G10 per il ceppo PH-1 (del ceppo *F. graminearum*) e i rispettivi ectopici Fc11, B6 e G2 ed infine R38 e R386 per il trasformante monocopia M7. Sono stati inoculati 80 µL di una sospensione concentrata 1×10^6 conidi/mL, per ciascun ceppo, in 5 piastre Petri (60mm Ø) contenenti ciascuna 8 mL del substrato liquido selettivo Vogel e lasciate in incubazione per 14 giorni a 25°C al buio. Trascorso tale periodo, il liquido colturale è stato riversato in un imbuto di ceramica rivestito di uno strato di Miracloth sterile e filtrato per mezzo di una pompa a vuoto. Il micelio, separato dal liquido, è stato lavato per 3 volte con 1 mL di acqua sterile, riposto in stufa alla temperatura di 80°C per un giorno intero e successivamente pesato per determinare il peso secco. Per permettere la separazione della tossina dalla fase sottostante, il liquido è stato addizionato a 3 mL di acetato di etile, agitato per 10 secondi e sottoposto ad analisi LC-MS. E' stata stimata anche la produzione di micotossina *in vivo* tramite analisi LC-MS previo inoculo all'interno di spighe di frumento duro di 100 µL di una sospensione concentrata 1×10^6 conidi/mL.

4. RISULTATI

4.1 Ottenimento del cotrasformante M7

Il trasformatore M7 del ceppo di *F. culmorum* è stato selezionato tra 56 trasformanti ottenuti in seguito alla trasformazione di protoplasti del ceppo MfC21 nit1, mutato nel gene della nitrato reductasi e quindi incapace di usare il nitrato come fonte di azoto e di crescere in maniera fioccosa su determinati substrati minimi. Le analisi PCR eseguite con i primer niaD144 e niaD754r (vedi Tab.3) hanno messo in evidenza che solo 38 sui 56 trasformanti analizzati avevano integrato nel proprio genoma il costrutto *mimp1/impala*. Gli eventi di escissione dei 38 cotrasformanti ottenuti era confermata da prove *in vitro* su piastre di MM-nitrato contenenti 50 µg/mL di igromicina B. La frequenza degli eventi di escissione si è dimostrata molto elevata e oscillava da 5 a 15 revertanti per piastra. Solo il cotrasformatore M7 ha mostrato l'integrazione di una sola copia del costrutto *mimp1/impala* e perciò selezionato per questa ricerca.

A conferma dell'avvenuta integrazione, i cotrasformanti hanno mostrato un aspetto fenotipico identico alle colonie di *F. culmorum* MfC21 nit1 se lasciati crescere su substrato minimale senza igromicina. Alla trasposizione dell'elemento trasponibile è seguita la riacquisizione dell'attività della nitrato-riduttasi e le colonie, chiamate revertanti, erano facilmente distinguibili come areali di micelio fioccoso di aspetto simile a quello presentato dal wild type (Fig. 6).

Il Southern blot ha confermato la frequenza di inserzione in un'unica copia e rilevato il fenotipo caratteristico in 11 revertanti M7 (Fig. 7A).

I revertanti hanno mostrato una singola banda di 1.7 Kb, 200bp più corta della banda di riferimento del cotrasformatore, a dimostrazione dell'avvenuta escissione dell'elemento trasponibile dal gene della nitrato reductasi (Fig. 7A). L'integrazione del costrutto a livello del gene che regola l'attività della proteina nitrato reductasi nel cotrasformatore monocopia M7 e la conseguente escissione dal sito genomico di inserzione, hanno determinato la riacquisizione del gene, la cui funzione era stata momentaneamente silenziata. È stata osservata la reinserzione del trasposone *mimp1* in diverse parti del

genoma ed è stato evidenziato quando un fenomeno di escissione è stato seguito dalla reinserzione di *mimp1* (Fig. 7B).

Gli eventi di escissione e reinserzione del trasposone *mimp1* nel genoma hanno permesso di isolare infinite colonie di micelio, chiamate revertanti, riferibili al fenotipo del wild-type. Il mutante MCF 21 nit1, fatto crescere su substrato minimale contenente nitrato di sodio come unica fonte di azoto e senza aggiunta dell'antibiotico igromicina B, mostrava invece un aspetto fenotipico caratterizzato da micelio raso in relazione alla mancata funzionalità della nitrato reductasi.

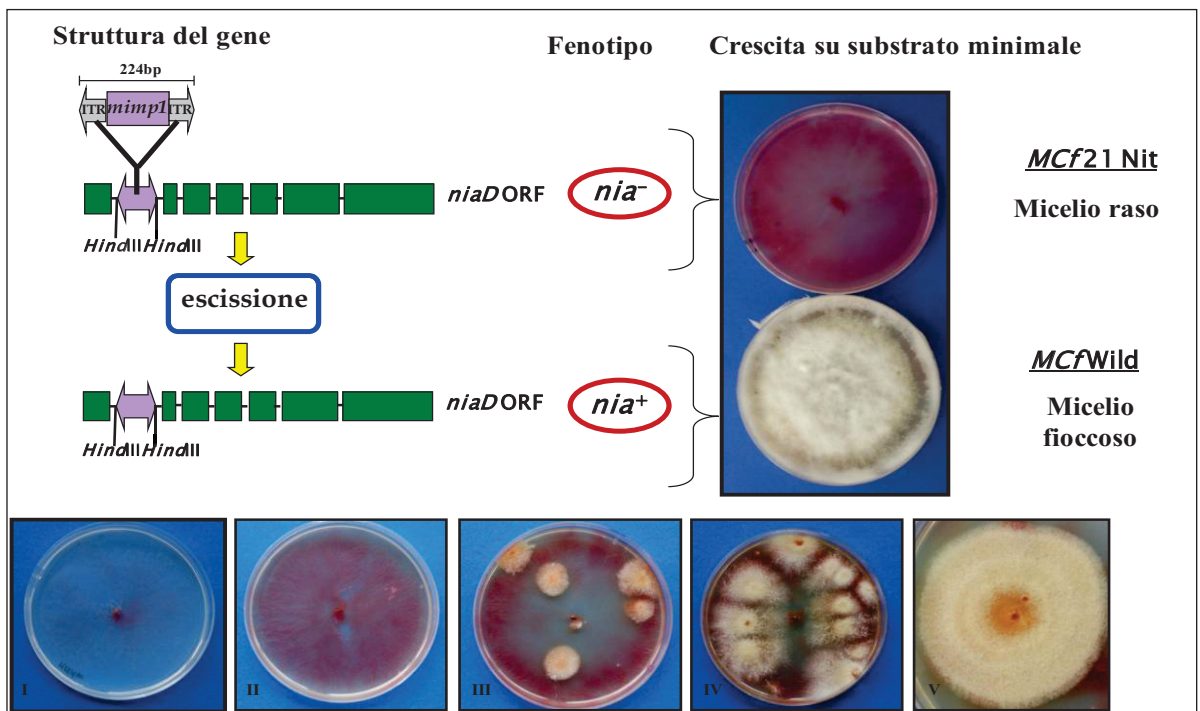


Figura 6: Eventi di escissione e riacquisizione della funzione della nitrato reductasi riconducibile a livello fenotipico dalla crescita di colonie con micelio fioccoso

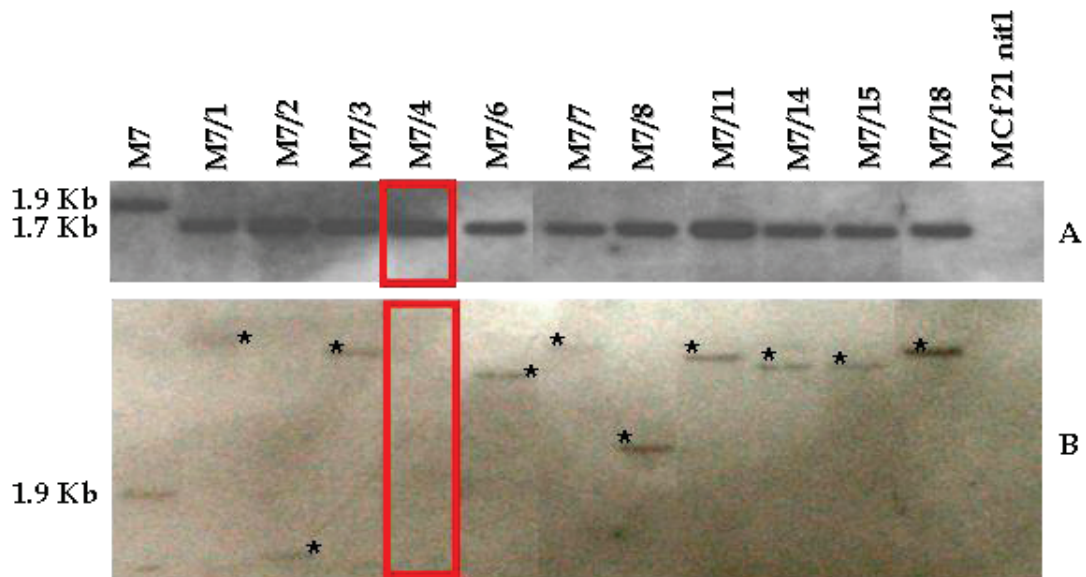


Figura 7: Southern blot dei revertanti *mimp1/impala*. A) Escissione dell'elemento trasponibile dal gene della nitrato reduttasi e produzione di una singola banda di 1.7 Kb, 200 bp più corta della banda di riferimento del cotrasformante; B) Gli asterischi indicano i siti di reinserzione dell'elemento *mimp1* (120 bp) in diversi loci del genoma. Nel rettangolo rosso è evidenziata l'escissione di *mimp1* al quale non è susseguito un fenomeno di reinserzione dell'elemento.

4.2 Screening fenotipico dei revertanti

Una volta accertata la reinserzione del trasposone *mimp1*, si è proceduto ad identificare nell'intera collezione di revertanti se l'elemento trasponibile si fosse o meno inserito in un punto del genoma responsabile di qualche attività metabolica. I risultati hanno permesso di isolare due revertanti, R38 e R386, che hanno mostrato entrambi una riduzione significativa del diametro di crescita dopo 3 g di incubazione a temperatura ambiente se comparati al ceppo di riferimento M7 (Fig. 8). Il test ci ha permesso di identificare i geni coinvolti nei processi metabolici che alterano il fenotipo di crescita di alcuni revertanti sottoposti a differenti condizioni di stress, sia osmotico che ossidativo.

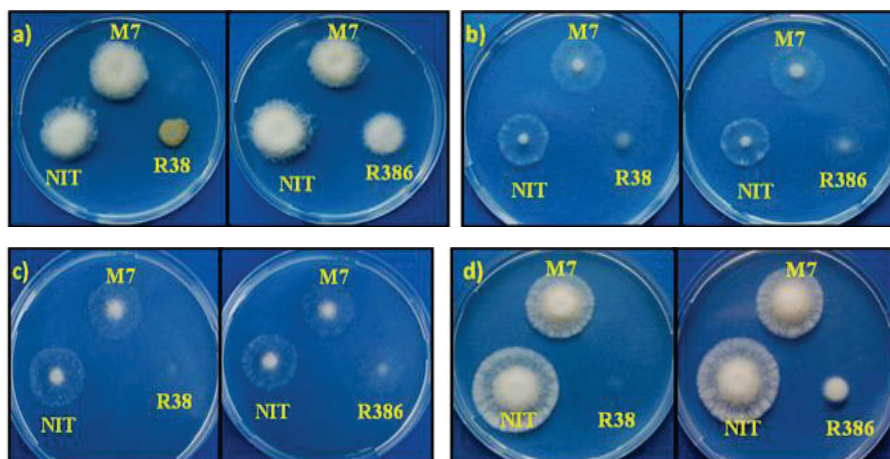


Figura 8: Saggio fenotipico. Revertanti cresciuti su piastre di Czapeck ammendate con A) 0.02% di SDS; B) 2M Sorbitolo; C) 1M NaCl e D) 30mM Persolfato di Potassio. La resistenza alle diverse condizioni di stress è stata stimata comparando il diametro di crescita dei revertanti con il ceppo MCf21 nit1 e il cotrasformante di controllo M7 di *F. culmorum*.

4.3 Analisi delle sequenze fiancheggianti e distribuzione del trasposone *mimp1* nel genoma di *Fusarium graminearum*

Per monitorare la trasposizione dell'elemento *mimp1* ed identificare le regioni fiancheggianti il sito di inserzione del trasposone, il DNA genomico è stato dapprima digerito con due enzimi di restrizione, *Bgl*III e *Bam*H1, e successivamente, sul prodotto digerito, è stata eseguita una splinkerette-PCR. La sp-PCR ha permesso di evidenziare una più alta efficienza dell'enzima *Bgl*III rispetto a *Bam*H1 permettendo di ottenere amplificati di taglia pari a 1700 bp, di 700 bp più grandi di quelli digeriti con *Bam*H1. Non essendo ancora disponibile il genoma di *F. culmorum*, la distribuzione dell'elemento *mimp1* è stata stimata sulla base della similitudine con il genoma di *F. graminearum*. Per stabilire in quale parte del genoma si fosse localizzato l'elemento *mimp1*, i prodotti della PCR sono stati caricati sul programma BLAST in "Fusarium graminearum genome database" ed analizzate le sequenze proteiche attraverso MIPS. Le analisi bioinformatiche hanno rivelato la presenza di due geni potenzialmente coinvolti nei processi di patogenesi e sviluppo delle malattie fungine. Uno è il mutante R38, per il quale il trasposone *mimp1* si è reinserito all'interno di un gene omologo in *F. graminearum* (FGSG 17209), nel cromosoma 4 del superconting 3.6. Il gene codifica

per una conserved hypothetical protein la cui sequenza amminoacidica consta di 318 amminoacidi contenente un dominio di leucine-zipper e sembra possedere un ruolo regolatore. Geni omologhi la cui funzione è sconosciuta, sono stati osservati in *F. oxysporum* (FOX_06114) e *F. verticillioides* (FVEG_03978) con una omologia pari al 83%. Il secondo mutante, R386, ha invece evidenziato che il trasposone *mimp1* si è reinserito nel terzo introne di un gene omologo in *F. graminearum* (FGSG_00332), ampiamente descritto e caratterizzato da Ding et al. (2009) e anch'esso coinvolto nei processi di patogenicità.

Tutte le sequenze fiancheggiatrici sono state depositate nel database Genome Sequence Service NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbGSS/>).

4.4 Ottenimento mutanti knock-out

Da una collezione di 12 trasformanti, 7 sono stati ottenuti da *F. culmorum* FcUK99 e i restanti 5 da *F. graminearum* PH-1. I risultati del Southern blot hanno confermato le analisi PCR, mettendo in risalto che 5 trasformanti di *F. culmorum* presentavano una completa delezione (trasformanti knock-out) mentre 2 sono risultati trasformanti ectopici (Fig. 9). Solo l'ectopico B6 insieme a B24 e B51 sono stati selezionati per le analisi successive. I mutanti ottenuti dal gene FGSG_17209 del ceppo *F. graminearum*, sono stati selezionati e solo i trasformanti knock-out G8 e G10 sono stati aggiunti ai precedenti (Fig. 9).

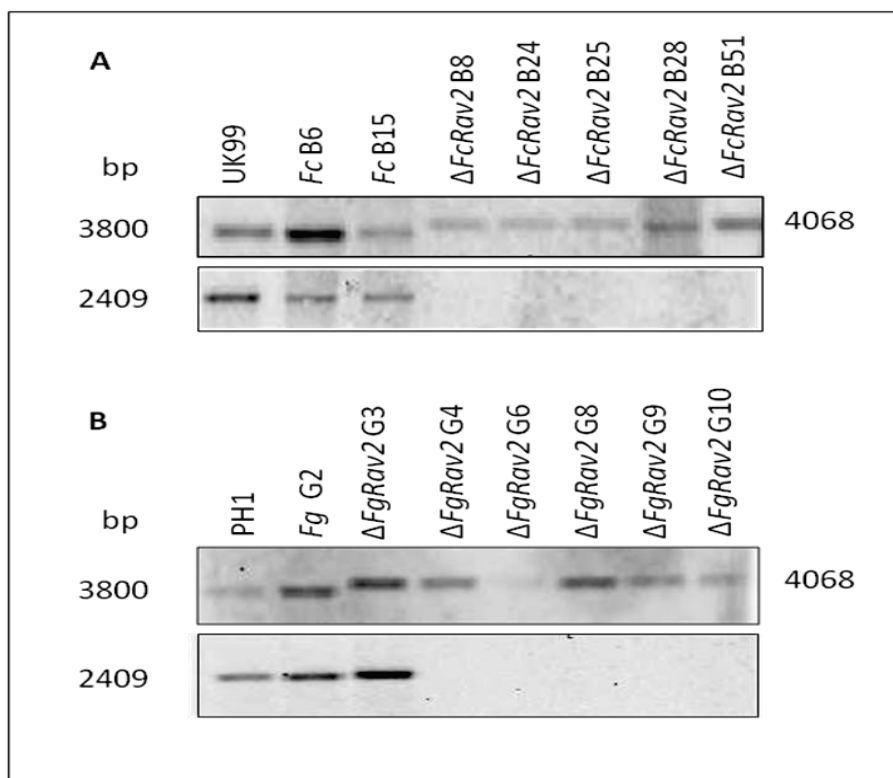


Figura 9: Trasformanti knock-out ed ectopici dei ceppi FcUK99 e PH-1 ottenuti mediante analisi Southern.

4.5 Test di patogenicità: “mal del piede”

Gli esperimenti di patogenicità, effettuati sull'intera collezione di revertanti, hanno permesso di selezionare i ceppi nei quali il trasposone *mimp1* fosse riuscito ad inserirsi all'interno o vicino ad un gene che condiziona la virulenza per il mal del piede di *F. culmorum* MCF21. La patogenicità dei revertanti R38 e R386, è stata confrontata rispetto ad un controllo negativo (senza il patogeno) e il cotrasformante di accertata virulenza M7 ed è emerso che R386 ha mostrato una moderata riduzione di incidenza della malattia e R38 una totale riduzione di incidenza, riferibile ad una più elevata emergenza e sviluppo delle cariossidi (Fig. 10). Il saggio *in planta* ha confermato i risultati ottenuti *in vitro* (Fig. 11).

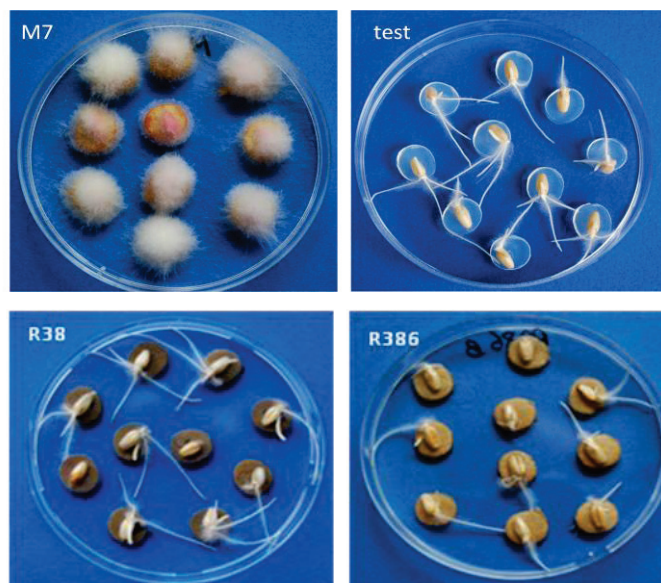


Figura 10: Saggio di patogenicità *in vitro*. I putativi mutanti R38 e R386 non hanno mostrato alcuna patogenicità nei confronti delle cariossidi di frumento determinando l'emergenza e lo sviluppo delle cariossidi a differenza del cotrasformante M7 che manifesta la sua accertata virulenza.

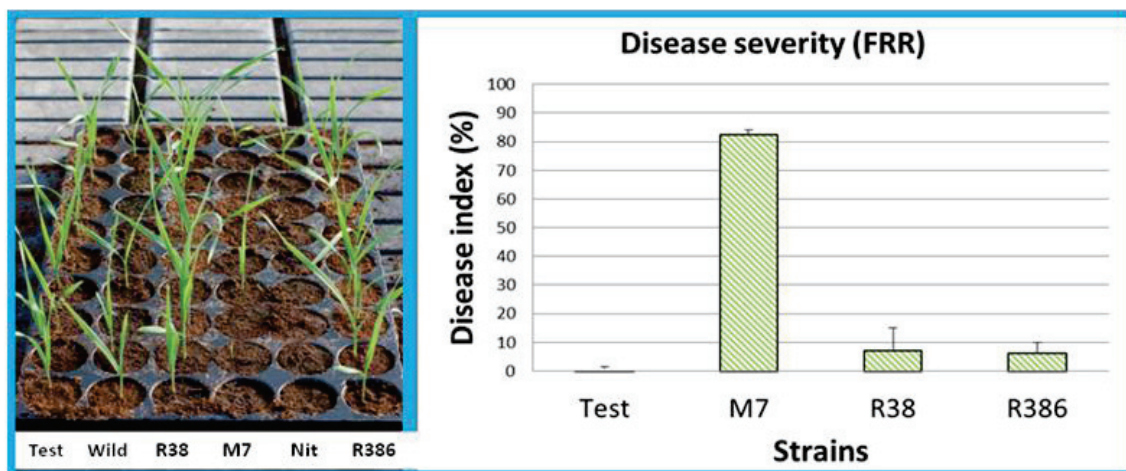


Figura 11: Saggio di patogenicità *in planta*. I revertanti saggiati confermano la perdita di patogenicità nel determinare il mal del piede.

4.6 Test di patogenicità: fusariosi della spiga

La patogenicità dei revertanti è stata valutata anche sulla base della loro aggressività nel determinare la fusariosi della spiga e la loro capacità di disseccamento del frumento. Le spighe infettate sono rimaste sotto osservazione per quattro settimane, rivelando al termine della prova una marcata differenza di attacco e ridotta manifestazione dei sintomi da parte dei putativi mutanti R38 e R386 rispetto al cotrasformante M7 (Fig. 12 e Fig 13). Questo ha confermato l'inserzione dell'elemento trasponibile in una regione del genoma legata inequivocabilmente alla patogenicità.

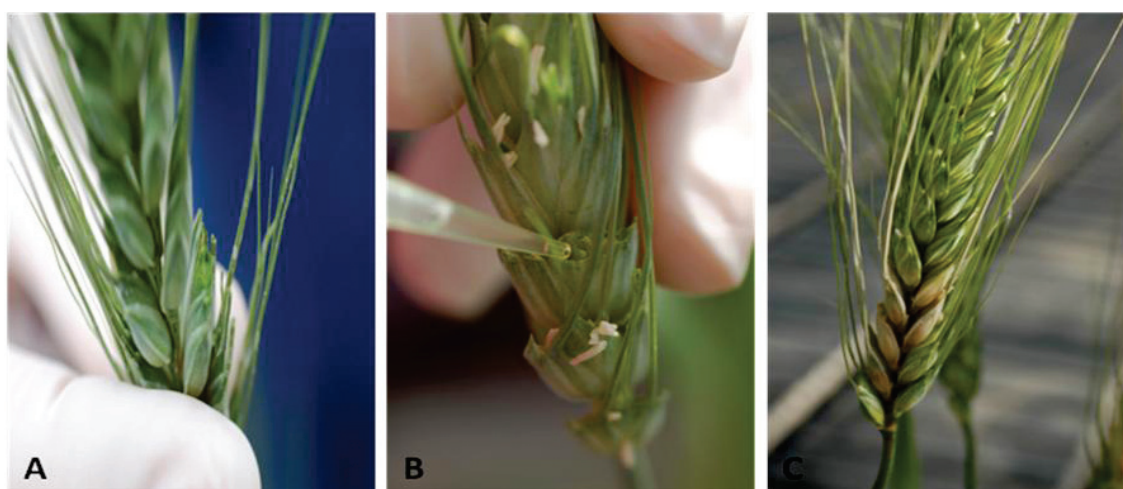


Figura 12: Point inoculation. A) taglio delle reste all'altezza della quinta spighetta; B) inocolo della sospensione conidica all'interno della spighetta; C) inizio di attacco e di disseccamento della spiga.

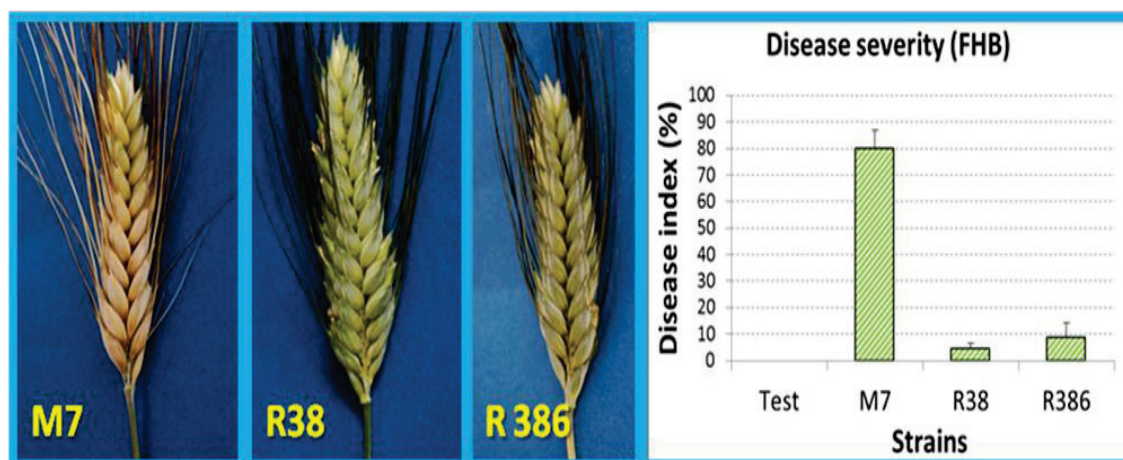


Figura 13: Gravità di attacco del cotrasformante M7 e dei revertanti R38 e R386.

4.7 Metabolizzazione di fonti di carbonio

Sulla base dell'osservazione delle curve di crescita dei ceppi saggiati, solo il mutante B24 e il rispettivo ectopico B6 sono stati selezionati e messi a confronto con il ceppo di riferimento FcUK99. Dopo accurata osservazione, sono state scelte le curve di crescita riferibili all'intervallo di tempo compreso tra le 60 e le 72 ore perché ritenute le più significative in termini di capacità di utilizzazione di fonti di carbonio da parte dei mutanti selezionati. Come si evince dalla tabella 5, il mutante B24 ha manifestato una differente capacità di metabolizzazione degli zuccheri a carico dei composti L-sorbose, D-xilosio, α -metil-D-glucoside, lattulosio, L-arabinosio, L-fucosio e palatinosio. Questa minor capacità di catabolismo glucidico si riflette in una crescita inferiore del mutante B24 stimata intorno al 40-60% rispetto al ceppo wild type e all'ectopico.

Tabella 5: Confronto dell'attività catabolica di B24, B6 e FcUK99 su differenti substrati

Carbon source	B24	B6	UK99
L-sorbose	106	234	238
D-Xylose	125	267	252
2-Amino Ethanol	62	107	113
Bromosuccinic Acid	77	133	138
α -Methyl-D-Glucoside	105	186	184
Lactulose	86	147	146
L-Arabinose	118	195	194
L-Fucose	78	135	127
Palatinose	170	274	272
β -Hydroxy-butyric Acid	71	107	112

4.8 Analisi quantitativa delle micotossine

Negli esperimenti condotti *in vitro* si sono osservate differenti capacità dei singoli mutanti nella produzione di micotossine, dovute non solo alle cultivar utilizzate ma anche al metodo impiegato. L'infezione di *cultivar* Simeto mediante point inoculation avvenuta in serra ha mostrato una notevole riduzione nella sintesi di micotossine da parte dei revertanti R38 ed R386 del ceppo *F. culmorum* se messi a confronto con il ceppo di riferimento M7 (Fig. 14).

<i>Ceppi</i>	<i>Tossina (ppm)</i>
Test senza inoculo	200±200
Cotrasformante M7	5300±700
Revertante R38	900±252
Revertante R386	367±273

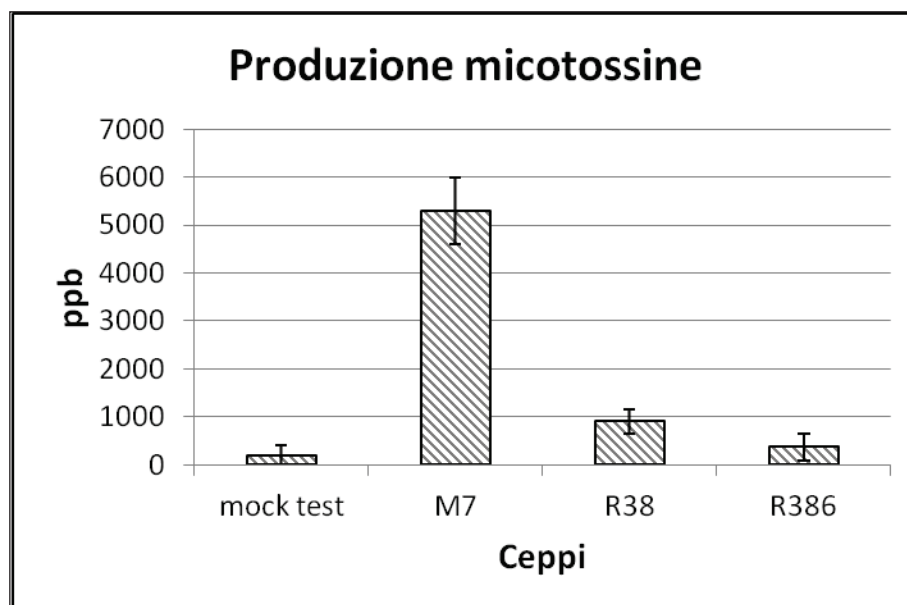
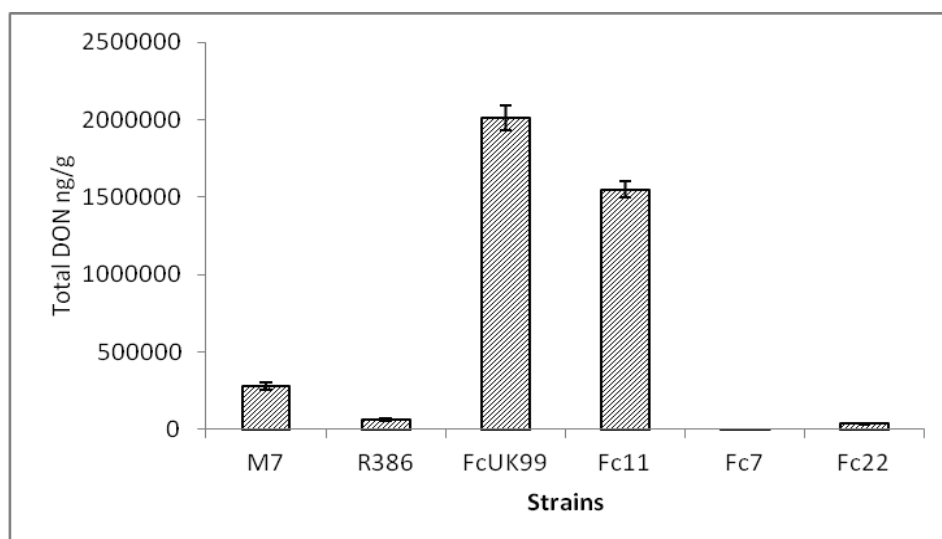
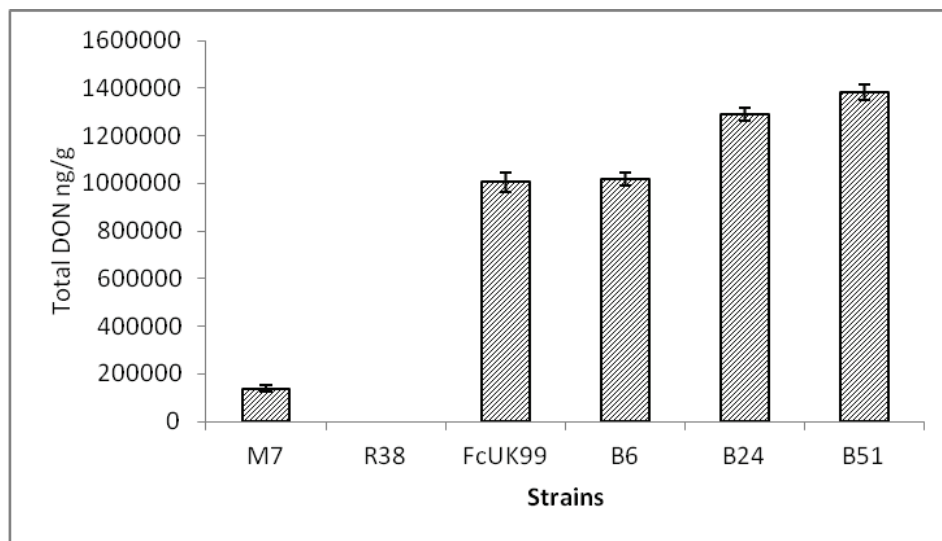


Figura 14: Produzione di micotossine del cotrasformante M7 e dei revertanti R38 e R386 su *cultivar* Simeto in serra

L'osservazione della produzione di micotossine dei mutanti selezionati e testati in laboratorio hanno messo in evidenza una totale perdita di produzione da parte dei revertanti R38 e Fc7 ed una riduzione significativa anche nei revertanti R386 e Fc22 se confrontati con i restanti mutanti del ceppo FcUK99 dove non si è osservata alcuna riduzione (Fig. 15 e 16). Tra i mutanti del ceppo *F. graminearum*, G10 ha mostrato una ridotta ma non così significativa incapacità di produrre tricoteceni.



5. CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

L'importanza che rivestono i cereali e l'interesse nei confronti delle malattie di origine fungina che spesso ne compromettono la produzione, perdita nel raccolto e danni alla salute umana dovuti all'accumulo di micotossine, ha incentivato la scelta di una linea di ricerca improntata sulla identificazione di fattori di virulenza del fungo fitopatogeno *Fusarium culmorum*, al fine di indagare possibili interventi di contenimento della malattia. I funghi fitopatogeni esplorano i tessuti vegetali alla ricerca di nutrienti necessari per la loro crescita e sviluppo, attuando differenti strategie di colonizzazione della pianta ospite. Numerose sono le ricerche scientifiche incentrate sullo studio dei meccanismi che regolano questi processi infettivi (Haueisen e Stukenbrock, 2016). I risultati conseguiti nel corso di questo dottorato di ricerca sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di una tecnica, "transposon tagging", in grado di marcare regioni del genoma di *F. culmorum* non ancora conosciute e coinvolte possibilmente nei meccanismi di virulenza e patogenicità. Il transposon tagging è un metodo di mutagenesi inserzionale che si avvale dell'utilizzo di elementi trasponibili capaci di muoversi liberamente nel genoma, integrarsi con esso e la cui inserzione annulla la funzione del gene bersaglio diventando così facilmente riconoscibili. Praticità e velocità di esecuzione di questa tecnica si sono rivelati elementi fondamentali nella creazione di una vasta collezione di mutanti costituita da oltre 2000 revertanti. I revertanti ottenuti sono stati saggiati attraverso differenti prove condotte sia *in vitro* che *in vivo*, per mettere in luce la presenza di anche un solo isolato mutato nei geni responsabili della virulenza e patogenicità. L'osservazione dei risultati ottenuti ha portato all'isolamento di mutanti con ridotta virulenza e aggressività del "mal del piede" e della fusariosi della spiga nei semenzali di frumento duro potendo affermare che i due geni "etichettati" in *F. culmorum*, svolgono un ruolo chiave nella regolazione dei meccanismi di patogenicità. I mutanti selezionati hanno ridotto la loro aggressività del 100%, mostrandosi completamente inattivi nel determinare l'insorgenza delle malattie del frumento. L'intera collezione di revertanti ottenuta è stata sottoposta a differenti stress metabolici. Dall'analisi dei risultati, sono stati selezionati due mutanti, R38 e R386, che hanno mostrato uno sviluppo vegetativo significativamente ridotto dovuto alla ridotta capacità del patogeno di far fronte a situazioni di stress derivanti dai meccanismi di difesa messi

in atto dalla pianta. Il fenotipo mutante ottenuto ha convalidato la tecnica del transposon tagging e l'escissione e reinserzione del trasposone.

La successiva caratterizzazione ha rivelato che entrambi i geni sono coinvolti nei processi di patogenesi e virulenza del fungo e ha permesso di identificare un nuovo gene non ancora scoperto nel genere *Fusaria*. E' stata osservata la sua presenza come proteina omologa in *Drosophila*, lieviti e uomo, ma questo studio mostra per la prima volta il suo coinvolgimento nei funghi filamentosi. Studi riguardo la funzionalità di questo gene nell'uomo hanno mostrato che una mutazione porta allo sviluppo di una patologia legata alla sfera neuronale (Schossing *et al*, 2012). Nel mutante R386 il trasposone *mimp1* si è reinserito all'interno di un gene omologo in *F. graminearum* (FGSG 00332), ampiamente descritto e caratterizzato da Ding *et al.* (2009) e anch'esso coinvolto nei processi di patogenicità. La caratterizzazione dei geni coinvolti nei processi di patogenicità/micotossicità è essenziale per poter sviluppare metodi di controllo alternativi di questa malattia e scoprire nuovi composti "no-fungicidal" capaci di ridurre o inattivare gli stessi processi (Dubos *et al.*, 2011, 2013; Serfling e Ordon, 2014). I risultati conseguiti in questo lavoro di ricerca hanno perciò messo le basi per continuare gli studi verso questa direzione e poter aggiungere più informazioni possibili alle poche che ancora oggi si hanno riguardo il genoma di *F. culmorum* arricchendo così la mappatura genetica del fungo. Inoltre il nostro lavoro ha confermato l'attendibilità e l'efficienza di un metodo in grado di mappare zone del genoma mediante l'utilizzo di trasposoni. La casualità con la quale l'elemento trasponibile si integra in regioni del genoma coinvolte nei processi di patogenicità presuppone l'allestimento di collezioni di mutanti sempre più numerose per poter incrementare tale probabilità e avere spunti per studi futuri.

Nella nostra ricerca, come modello d'indagine è stato scelto il cotrasformante monocopia M7, con una singola copia del costrutto *mimp1/impala* integrato nel proprio genoma, ottenuto dal ceppo MCF 21 nit 1 mutato nel gene della nitrato reductasi. Il sistema *mimp1/impala* in *F. culmorum* ha mostrato un'ottima frequenza di escissione (5-10 revertanti per ciascuna piastra inoculata con 10^6 spore) che ha contribuito all'ottenimento di una collezione di 2300 revertanti a partire da un singolo evento di trasformazione, similmente a quanto osservato per lo stesso costrutto in *F. oxysporum* e *F. graminearum* da Dufresne *et al.* (2007-2008) e per l'elemento *impala* di *F.*

oxysporum in *Penicillium griseoroseum* (de Queiroz *et al.*, 2003). Ad un efficiente meccanismo di inserzione è seguito un'eccellente frequenza di reinserzione del costrutto *mimp1/impala*, pari al 97% dei casi, similmente a quanto osservato in *F. graminearum* (Dufresne *et al.*, 2008) ma superiore rispetto a quanto dimostrato in altri sistemi basati sull'impiego del trasposone *impala* (de Queiroz *et al.*, 2003; Hua-Van *et al.*, 2001; Li Destri Nicosia *et al.*, 2001; Lopéz *et al.*, 2009; Migheli *et al.*, 2000) che, invece, hanno presentato una frequenza di reinserzione intorno al 50-75%. Pertanto in *F. culmorum* il sistema a doppia componente *mimp1/impala* si è dimostrato un sistema ad alto rendimento. La clonazione di sequenze fiancheggianti il trasposone ha permesso di identificare il sito di reinserzione e la distribuzione di *mimp1* nel genoma di *F. graminearum*. Sulla collezione di mutanti di *F. culmorum* è stato possibile indagare l'interazione tra la produzione del deossinivalenolo e l'aggressività del fungo nei confronti delle piantine di grano duro. Da questo studio è emerso che i mutanti R38 e R386 in *F. culmorum* hanno mostrato una ridotta virulenza e aggressività nello sviluppo della fusariosi della spiga e del "mal del piede" in semenzali di frumento duro in concomitanza a una minore produzione di deossinivalenolo. La sovraespressione di DON del ceppo wild type era seguita, per contro, da una maggiore virulenza. I meccanismi di controllo nell'accumulo delle micotossine nella pianta, conseguente all'instaurarsi del processo infettivo dei tessuti vegetali, apre nuovi scenari allo sviluppo di metodi alternativi nel contenimento della patologia.

Il nostro obiettivo è stato quello di poter identificare ed indagare nuovi geni coinvolti nei processi fisiologici e metabolici del fungo attraverso la creazione di una copiosa collezione di mutanti di *F. culmorum*, possibilmente a singola integrazione con distribuzione casuale dell'elemento nell'intero genoma, al fine di determinare nuovi target per il contenimento del patogeno. Poiché la tecnica del "transposon tagging" si è rivelata efficace nel riconoscimento di sequenze geniche in *F. culmorum* attraverso l'inserzione del trasposone nel gene bersaglio, ci si auspica di effettuare ulteriori studi futuri per meglio comprendere il ruolo e la funzione dei geni che popolano il genoma di *F. culmorum*.

In conclusione, nel corso del dottorato è stato possibile identificare due nuovi geni coinvolti nei meccanismi di patogenicità e nei processi di sviluppo morfologico, produzione di tossine e capacità di resistenza ai diversi stress ossidativi che si

aggiungono ad altri pochi geni conosciuti come importanti fattori di patogenicità in *F. culmorum* (Skov *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2010).

In una prospettiva futura, l'intenzione è quella di sviluppare metodi di controllo alternativi nei confronti dei funghi fitopatogeni e sulla contaminazione degli alimenti, in grado non solo di contrastare l'attività micotossigena dei funghi, prevenendo la biosintesi di micotossine, ma garantire una salubrità degli alimenti nel rispetto della salute umana.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Al-Snafi, A. E. (2016). Medical importance of *Cupressus sempervirens*: a review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6, 66-76

Atanasova, L., & Druzhinina, I. S. (2010). Global nutrient profiling by Phenotype MicroArrays: a tool complementing genomic and proteomic studies in conidial fungi. *Journal of Science, University of Zhejiang*, 11, 151-168

Aziz, N. H., Attia, E. S., & Farag, S. A. (1997). Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. *Food/Nahrung*, 41, 34-37

Backhouse, D., Abubakar, A. A., Burgess, L. W., Dennisc, J. I., Hollaway, G. J., Wildermuth, G. B., Wallwork, H., & Henry, F. J. (2004). Survey of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat and barley in eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33, 255-261

Bai, G. H., Desjardins, A. E., & Plattner, R. D. (2002). Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, 153, 91-98

Baldwin T.K., Urban M., Brown N., & Hammond-Kosac K. (2010). A role for topoisomerase I in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* pathogenesis and sporulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 566-577

Balmas, V., Santori, A., & Corazza, L. (1998). Furariosi della spiga di frumento duro. *L'Informatore Agrario*, 54, 53-56

Balmas, V., Corazza, L., & Santori, A. (2000). Le specie di *Fusarium* più comuni in Italia: suggerimenti per il loro riconoscimento. *Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale*

- Balmas, V., Delogu, G., Sposito, S., Rau, D., & Migheli, Q. (2006). Use of a complexation of tebuconazole with β -cyclodextrin for controlling foot and crown rot of durum wheat incited by *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 480-484
- Balmas, V., Scherm, B., Marcello, A., Beyer, M., Hoffmann, L., Migheli, Q., & Pasquali, M. (2015). Fusarium species and chemotypes associated with fusarium head blight and fusarium root rot on wheat in Sardinia. *Plant Pathology*, *64*, 972-979.
- Baroncelli, R., Zapparata, A., Piaggieschi, G., Sarrocco, S., & Vannacci, G. (2016). Draft whole-genome sequence of *Trichoderma gamsii* T6085, a promising biocontrol agent of Fusarium head blight on wheat. *Genome Announcements*, *4*, e01747-15.
- Bensassi, F., Zaied, C., Abid, S., Hajlaoui, M. R., & Bacha, H. (2010). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. *Food Control*, *21*, 281-285.
- Beyer, M., Pogoda, F., Pallez, M., Lazic, J., Hoffmann, L., & Pasquali, M. (2014). Evidence for a reversible drought induced shift in the species composition of mycotoxin producing Fusarium head blight pathogens isolated from symptomatic wheat heads. *International Journal of Food Microbiology*, *182*, 51-56
- Bezerra, P., & De Costa, P. (2009). Fungicides: chemistry, environmental impact, and health effects. *Nova Biomedical Books*
- Bochner, B. (1989). Sleuthing out bacterial identities. *Nature*, *339*, 157-158
- Bochner, B. R., Gadzinski, P., & Panomitros, E. (2001). Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Research*, *11*, 1246-1255
- Bochner, B. R. (2003). New technologies to assess genotype–phenotype relationships. *Nature Reviews Genetics*, *4*, 309-314
- Boeke J.D. (1989). Transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mobile DNA* (Burgh D.E., Howe M. eds), pp 335-374. ASM, Washington DC

- Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, *108*, 611-624
- Boutigny, A. L., Atanasova-Pénichon, V., Benet, M., Barreau, C., & Richard-Forget, F. (2010). Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *European Journal of Plant Pathology*, *127*, 275-286
- Brennan, J. M., Fagan, B., Van Maanen, A., Cooke, B. M., & Doohan, F. M. (2003). Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology*, *109*, 577-587
- Brera, C., De Santis, B., Debegnach, F., Gregori, E., Pannunzi, E., & Toscan, M. C. B. (2012). 4 Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. *Istituto Superiore di Sanità*. Roma, 11-13 giugno 2012. Riassunti
- Burgess, L. W. L., Summerell, C. M., & Brett, A. (1988). *Laboratory Manual for Fusarium Research, 2nd Edition*, pp 156. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology, University of Sydney, Australia
- Cappellini, R.A., & Peterson, J. L. (1965). Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, *57*, 962-966
- Cariddi, C., & Catalano, M. (1990). Water stress and *Fusarium culmorum* infections on durum wheat. *Phytopathologia Mediterranea*. *29*, 51–55
- Cavret, S., & Lecoœur, S. (2006). Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology*, *44*, 444-453
- Champeil A., Dorè T., & Fourbet J.F. (2004). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* *166*, 1389–1415
- Chen, W., Kastner, C., Nowara, D., Oliveira-Garcia, E., Rutten, T., Zhao, Y., Deising, H. B., Kumlehn, J. & Schweizer, P. (2016). Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection. *Journal of Experimental Botany* *67*, 4979-4991

Clement, J. A., & Parry, D. W. (1998). Stem-base disease and fungal colonisation of winter wheat grown in compost inoculated with *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *Microdochium nivale*. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 323-330

Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A., & Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 10352-10357

Corazza, L., & Balmas, V. (1994). Le malattie fungine del frumento trasmesse attraverso il terreno. *Sementi Elette*, 40, 39-43

Corazza, L., Balmas, V., Santori, A., Vitale, S., Luongo, M. & Maccaroni, M. (2002). Head blight and foot rot of wheat in Italy. *Petria* 12, 25-36

Covarelli, L., Beccari, G., Prodi, A., Generotti, S., Etruschi, F., Juan, C., Ferrer, E. & Mañes, J. (2015). *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 540-551

Crespo-Sempere, A., Estiarte, N., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos A. J. (2015). Targeting *Fusarium graminearum* control via polyamine enzyme inhibitors and polyamine analogs. *Food Microbiology*, 49, 95-103

Daboussi, M. J. (1996). Fungal transposable elements: generators of diversity and genetic tools. *Journal of Genetics*, 75, 325-339

Degraeve, S., Madege, R. R., Audenaert, K., Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya, M., Tiisekwa, B., De Meulenaer, B. & Haesaert, G. (2016). Impact of local pre-harvest management practices in maize on the occurrence of *Fusarium* species and associated mycotoxins in two agro-ecosystems in Tanzania. *Food Control*, 59, 225-233

de Queiroz M.V., & Daboussi M.J. (2003). *Impala*, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum* *FEMS Microbiology Letters* 218, 317-321

Desjardins, A. E., Hohn, T. M., & McCormick, S. P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57, 595-604

Desjardins, A. E., Proctor, R. H., Bai, G., McCormick, S. P., Shaner, G., Buechley, G., & Hohn, T. M. (1996). Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 9, 775-781

Desjardins, A. E., Manandhar, G., Plattner, R. D., Maragos, C. M., Shrestha, K., & McCormick, S. P. (2000). Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1377-1383

Ding, S., Mehrabi, R., Koten, C., Kang, Z., Wei, Y., Seong, K., Kistler, H. C., & Xu, J. R. (2009). Transducin beta-like gene FTL1 is essential for pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Eukaryotic Cell*, 8, 867-876

Dubos, T., Pasquali, M., Pogoda, F., Hoffmann, L., & Beyer, M. (2011). Evidence for natural resistance towards trifloxystrobin in *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 130, 239-248

Dubos, T., Pasquali, M., Pogoda, F., Casanova, A., Hoffmann, L., & Beyer, M. (2013). Differences between the succinate dehydrogenase sequences of isopyrazam sensitive *Zymoseptoria tritici* and insensitive *Fusarium graminearum* strains. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105, 28-35

Dufresne, M., Hua-Van, A., El Wahab, H. A., M'Barek, S. B., Vasnier, C., Teyssset, L., Kema G.H.J., & Daboussi, M. J. (2007). Transposition of a fungal miniature inverted-repeat transposable element through the action of a Tc1-like transposase. *Genetics*, 175, 441-452

Dufresne, M., Van Der Lee, T., M'Barek, S. B., Xu, X., Zhang, X., Liu, T., Waalwijk C., Zhang W., Kema G.H.J., & Daboussi, M. J. (2008). Transposon-tagging identifies novel pathogenicity genes in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 1552-1561

Duthie, S. J., Ma, A., Ross, M. A., & Collins, A. R. (1996). Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, 56, 1291-1295

Fakhfakh, M. M., Yahyaoui, A., Rezgui, S., Elias, E. M., & Daaloul, A. (2011). Identification and pathogenicity assessment of *Fusarium spp.* sampled from durum wheat fields in Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10, 6529-6539

Gauthier, L., Bonnin-Verdal, M. N., Marchegay, G., Pinson-Gadais, L., Ducos, C., Richard-Forget, F., & Atanasova-Penichon, V. (2016). Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: new insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 221, 61-68

Gale, L. R., Ward, T. J., Balmas, V., & Kistler, H. C. (2007). Population subdivision of *Fusarium graminearum* sensu stricto in the upper Midwestern United States. *Phytopathology*, 97, 1434-1439

Gardiner, D. M., Kazan, K., & Manners, J. M. (2009). Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 604-613

Geldreich, E. E., Taylor, R. H., Blannon, J. C., & Reasoner, D. J. (1985). Bacterial colonization of point-of-use water treatment devices. *Journal of American Water Works Association*, 77, 72-80

Goswami, R. S., & Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525

Häberle, J., Holzapfel, J., Schweizer, G., & Hartl, L. (2009). A major QTL for resistance against *Fusarium* head blight in European winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 119, 325-332

Haidukowski, M., Pascale, M., Perrone, G., Pancaldi, D., Campagna, C., & Visconti, A. (2005). Effect of fungicides on the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 191-198

Harris, L. J., Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Nicholson, P., Butler, G., Young, J. C., Weston G., Proctor R.H. & Hohn, T. M. (1999). Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease*, 83, 954-960

Haueisen, J., & Stukenbrock, E. H. (2016). Life cycle specialization of filamentous pathogens—colonization and reproduction in plant tissues. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 31-37

- Hua-Van A., Pamphile J.A., Langin T., & Daboussi M.J. (2001). Transposition of autonomous and engineered *impala* transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. *Molecular and General Genetics* 264, 724–731
- Hugget, A. C., & Schliter, B. (1996). Research needs for establishing the safety of functional foods. *Nutrition Reviews*, 54, 143-148
- Jones, R. K. (2000). Assessments of *Fusarium* head blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. *Plant Disease*, 84, 1021-1030
- Khalil, S., & Alsanius, B. W. (2009). Utilisation of carbon sources by *Pythium*, *Phytophthora* and *Fusarium* species as determined by Biolog® microplate assay. *The Open Microbiology Journal*, 3
- Kordali, S., Usanmaz, A., Cakir, A., Komaki, A., & Ercisli, S. (2016). Antifungal and herbicidal effects of fruit essential oils of four *Myrtus communis* genotypes. *Chemistry & Biodiversity*, 13, 77-84
- Infantino, A., Pucci, N., Conca, G., & Santori, A. (2007). First report of *Fusarium langsethiae* on durum wheat kernels in Italy. *Plant Disease*, 91, 1362-1362
- Lacey, J., Bateman, G. L., & Mirocha, C. J. (1999). Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium spp.* in wheat. *Annals of Applied Biology*, 134, 277-283
- Lamberti, I., & Pancaldi, D. (2004). Le principali malattie epigee del frumento in post-sigatura. *L'Informatore Agrario*, 60(17), 49
- Lee, H. J., & Ryu, D. (2015). Advances in mycotoxin research: public health perspectives. *Journal of Food Science*, 80, 2970-2983
- Liang, J., Lofgren, L., Ma, Z., Ward, T. J., & Kistler, H. C. (2015). Population subdivision of *Fusarium graminearum* from barley and wheat in the upper midwestern United States at the turn of the century. *Phytopathology*, 105, 1466-1474
- Li Destri Nicosia, M.G., Brocard-Masson, C., Demais, S., Hua-Van, A., Daboussi, M.J., & Scazzocchio, C. (2001). Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 39, 1330–1344

- Lyon, G. D., Reglinski, T., & Newton, A. C. (1995). Novel disease control compounds: the potential to 'immunize' plants against infection. *Plant Pathology*, *44*, 407-427
- Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., & Bottalico, A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* *108*, 597–609
- López-Berges M.S., Di Pietro A., Daboussi M.J., Wahab H.A., Vasnier C., Roncero M.I.G., Dufresne M., & Hera C. (2009). Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Molecular Plant Pathology* *10*, 95–107
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., & Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, *109*, 723-730
- Magan N., Hope R., Colleate A., & Baxter E.S. (2002). Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* *108*, 685–690
- Maier, F. J., Miedaner, T., Hadel, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner H. & Schäfer W. (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology*, *7*, 449-461
- Martin, R. A., MacLeod, J. A., & Caldwell, C. (1991). Influences of production inputs on incidence of infection by *Fusarium* species on cereal seed. *Plant Disease*, *75*, 784-788
- McCormick, S., Leonard, K. J., & Bushnell, W. R. (2003). The role of DON in pathogenicity. *Fusarium head blight of wheat and barley*, 165-183
- McGinnis, M. R., Molina, T. C., Pierson, D. L., & Mishra, S. K. (1996). Evaluation of the Biolog MicroStation system for yeast identification. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, *34*, 349-352
- McMullen, M., Jones, R., & Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* *81*, 1340–1348

McKinney H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26, 195–217

Migheli, Q., Steinberg, C., Davière, J.M., Olivain, C., Gerlinger, C., Gautheron, N., Alabouvette, C., & Daboussi, M.J. (2000). Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *Impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 90, 1279–1284

Miraglia, M., & Brera, C. (2004). 1 Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. *Istituto Superiore di Sanità*. Roma, 29-30 novembre 2004. Riassunti

Monbaliu, S., Van Peteghem, C., & De Saeger, S. (2012). Detection and determination of natural toxins (mycotoxins and plant toxins) in feed. *Animal Feed Contamination: Effects on Livestock and Food Safety*. Woodhead Publ Ltd., Cambridge, 286-325

Nicholson, P., Turner, J. A., Jenkinson, P., Jennings, P., Stonehouse, J., Nuttall, M., Dring, D., Weston, G. & Thomsett, M. (2003). Maximising control with fungicides of *Fusarium* ear blight (FEB) in order to reduce toxin contamination of wheat. *HGCA Project Report*

Oerke, E. C., Meier, A., Dehne, H. W., Sulyok, M., Krska, R., & Steiner, U. (2010). Spatial variability of *Fusarium* head blight pathogens and associated mycotoxins in wheat crops. *Plant Pathology*, 59, 671-682

Pancaldi, D., Tonti, S., Prodi, A., Salomoni, D., Dal Pra, M., Nipoti, P., Alberti, I. & Pisi, A. (2010). Survey of the main causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 258-266

Pani, G., Scherm, B., Azara, E., Balmas, V., Jahanshiri, Z., Carta, P., Fabbri, D., Dettori, M. A., Fadda, A., Dessì, A., Dallochio, R., Migheli, Q., & Delogu, G. (2014). Natural and natural-like phenolic inhibitors of type B trichothecene in vitro production by the wheat (*Triticum sp.*) pathogen *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4969-4978

- Pani, G., Dessì, A., Dallochio, R., Scherm, B., Azara, E., Delogu, G., & Migheli, Q. (2016). Natural phenolic inhibitors of trichothecene biosynthesis by the wheat fungal pathogen *Fusarium culmorum*: a computational insight into the structure-activity relationship. *PloS One*, *11*, 0157316
- Pasquali, M., Giraud, F., Brochot, C., Cocco, E., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2010). Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. *International Journal of Food Microbiology*, *137*, 246-253
- Pasquali, M., & Migheli, Q. (2014). Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing *Fusaria*. *International Journal of Food Microbiology*, *189*, 164-182
- Pasquali, M., Cocco, E., Guignard, C., & Hoffmann, L. (2016). The effect of agmatine on trichothecene type B and zearalenone production in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. poae*. *Peer Journal*, *4*, 1672
- Patenaude, C., Zhang, Y., Cormack, B., Köhler, J., & Rao, R. (2013). Essential role for vacuolar acidification in *Candida albicans* virulence. *Journal of Biological Chemistry*, *288*, 26256-26264
- Peglion, V. (1900). Sulla cosiddetta "Golpe Bianca" del frumento. *Bollettino Notiziario Agrario* *20*, 17-26
- Pereyra, S. A., Dill-Macky, R., & Sims, A. L. (2004). Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease*, *88*, 724-730
- Pestka, J. J., & Smolinski, A. T. (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, *8*, 39-69
- Piec, J., Pallez, M., Beyer, M., Vogelgsang, S., Hoffmann, L., & Pasquali, M. (2016). The Luxembourg database of trichothecene type B *F. graminearum* and *F. culmorum* producers. *Bioinformatics*, *12*, 1
- Piredda, M., & Cannella, C. (2006). I cereali nella dieta mediterranea. *L'Informatore Agrario*, *62*(12), 7-8

Proctor, R. H., Hohn, T. M., & McCormick, S. P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 8, 593-601

Proctor, R. H., Desjardins, A. E., McCormick, S. P., Plattner, R. D., Alexander, N. J., & Brown, D. W. (2002). Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *Mycotoxins in Plant Disease*, Springer Netherlands pp. 691-698

Prodi, A., Tonti, S., Nipoti, P., Pancaldi, D., & Pisi, A. (2009). Identification of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from durum wheat in a restricted area of northern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 727-731

Prodi, A., Purahong, W., Tonti, S., Salomoni, D., Nipoti, P., Covarelli, L., & Pisi, A. (2011). Difference in chemotype composition of *Fusarium graminearum* populations isolated from durum wheat in adjacent areas separated by the Apennines in Northern-Central Italy. *The Plant Pathology Journal*, 27, 354-359

Rebib, H., Bouraoui, H., Rouaissi, M., Brygoo, Y., Boudabbous, A., Hajlaoui, M. R., & Sadfi-Zouaoui, N. (2014). Genetic diversity assessed by SSR markers and chemotyping of *Fusarium culmorum* causal agent of foot and root rot of wheat collected from two different fields in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 481-495

Reynoso, M. M., Ramirez, M. L., Torres, A. M., & Chulze, S. N. (2011). Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 444-448

Rotter, B. A. (1996). Invited review: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48, 1-34

Sakai, A., Suzuki, C., Masui, Y., Kuramashi, A., Takatori, K., & Tanaka, N. (2007). The activities of mycotoxins derived from *Fusarium* and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 630, 103-111

Scherm, B., Orru, M., Balmas, V., Spanu, F., Azara, E., Delogu, G., Hammond T.M., Keller N.P. & Migheli, Q. (2011). Altered trichothecene biosynthesis in TRI6-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings. *Molecular Plant Pathology*, 12, 759-771

Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., & Migheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14, 323-341

Schmolke, M., Zimmermann, G., Schweizer, G., Miedaner, T., Korzun, V., Ebmeyer, E., & Hartl, L. (2008). Molecular mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in a European winter wheat population. *Plant Breeding*, 127, 459-464

Schroeder, H.W. & Christensen, J.J. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zea*. *Phytopathology*, 53, 831-838

Skov, J., Lemmens, M., & Giese, H. (2004). Role of a *Fusarium culmorum* ABC transporter (*FcABC1*) during infection of wheat and barley. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64, 245-254

Smiley, R.W. & Patterson, L.M. (1996). Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid pacific northwest. *Plant Disease* 80, 944-949

Spanu, F., Pasquali, M., Scherm, B., Balmas, V., Marcello, A., Ortu, G., Dufresne, M., Hoffman, L., Daboussi, M.J., & Migheli, Q. (2012). Transposition of the miniature inverted-repeat transposable element *mimp1* in the wheat pathogen *Fusarium culmorum*. *Molecular Plant Pathology*, 13, 1149-1155

Stack, R. W., & McMullen, M. P. (1985). Head blighting potential of *Fusarium* species associated with spring wheat heads. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7, 79-82

Stępień, Ł., Popiel, D., Koczyk, G., & Chełkowski, J. (2008). Wheat-infecting *Fusarium* species in Poland, their chemotypes and frequencies revealed by PCR assay. *Journal of Applied Genetics*, 49, 433-441

Strunnikova, O.K., Shakhnasarova, V.Y., & Vishnevskaya, N.A. (2000). Influence of different soil conditions on *Fusarium culmorum*. *Mitteilwngen aus der Biologischen Bundesanstalt für Landind-Forstwirtschaft* 377-76

Sudakin, D. L. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters*, 143, 97-107

- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2007). *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26, 877-885
- Wang, H., Hwang, S.F., Eudes, F., Chang, K.F., Howard, R.J., & Turnbull, G.D. (2006). Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. *Plant Pathology* 55, 224–30
- Ward, T. J., Clear, R. M., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D. E., Gilbert, J., Geiser, D. M. & Nowicki, T. W. (2008). An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 473-484
- Wei, C. M., & McLaughlin, C. S. (1974). Structure-function relationship in the 12, 13-epoxytrichothecenes novel inhibitors of protein synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 57, 838-844
- Wisniewska, H., & Kowalczyk, K. (2005). Resistance of cultivars and breeding lines of spring wheat to *Fusarium culmorum* and powdery mildew. *Journal of Applied Genetics*, 46, 35-40
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T. J., Aoki, T., Kistler, H. C., & O'Donnell, K. (2009). A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, 101, 841-852
- Yli-Mattila, T., & Gagkaeva, T. Y. (2016). *Fusarium* toxins in cereals in Northern Europe and Asia. *Fungi: Applications and Management Strategies*, 293
- Yumbe-Guevara, B. E., Imoto, T., & Yoshizawa, T. (2003). Effects of heating procedures on deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels in naturally contaminated barley and wheat. *Food Additives and Contaminants*, 20, 1132-1140
- Zhang, H., Zhang, Z., Van der Lee, T., Chen, W. Q., Xu, J., Xu, J. S., Yang, L., Yu, D., Waalwijk, C. & Feng, J. (2010). Population genetic analyses of *Fusarium asiaticum* populations from barley suggest a recent shift favoring 3ADON producers in southern China. *Phytopathology*, 100, 328-336

Zöllner, P. & Mayer-Helm, B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136, 123–69

RINGRAZIAMENTI

Voglio dire grazie alle tante persone che in questi anni di dottorato mi hanno supportato e ancora più spesso sopportato e hanno fatto del dottorato il posto per imparare, crescere professionalmente e soprattutto per intrecciare rapporti umani duraturi nel tempo.

Un ringraziamento al mio tutor prof. Migheli per avermi dato la possibilità e i mezzi per poter svolgere il lavoro di dottorato accompagnati sempre da supporto scientifico.

Vielen Dank alla mia co-tutor, la dott.ssa Barbara Scherm, fonte inesauribile di conoscenza e dispensatrice di preziosi consigli, perchè in lei ho trovato conforto nei momenti più difficili e per avermi insegnato la “disciplina” in laboratorio.

Un grazie a tutto il gruppo Migheli, a partire dal dott. Balmas per noi tutti semplicemente...Virgilio, Stefano, Giovanna, Patrizia, Giammario, Safa e il piccolo Nicola, che ormai è uno di noi.

Un grazie particolare a Francesca Spanu per avermi “instradata” in questo tortuoso cammino.

Un affettuoso GRAZIE ad Angela e Maria Grazia...amicizia pura.

Un sincero ringraziamento anche al dott. Matias Pasquali perché la permanenza in Lussemburgo, presso il centro Lippmann, mi ha arricchita a livello lavorativo e personale.

Il mio ringraziamento va anche alla sig.ra Emanuela Azara del CNR di Sassari per le analisi delle tossine mediante HPLC/MS, alla sezione di Microbiologia del Dipartimento di Agraria per l'utilizzo del lettore piastre Biolog e alle bibliotecarie Angela e Daniela per il supporto “tecnico”.

Un grazie infinito alla mia famiglia, Roby e gli amici per il sostegno morale e a tutti coloro che in qualche modo hanno condiviso e preso parte anche per poco a questa straordinaria avventura che si chiama VITA.