



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

EFFETTI DELLA LUCE ULTRAVIOLETTA
UV-C SULLA CRESCITA E SUI CAMBIAMENTI
DELL'ESPRESSIONE GENICA NEL FUNGO
MICOTOSSIGENO *ASPERGILLUS NIGER*
ISOLATO DA UN VIGNETO MARCHIGIANO

Effects of UV-C light on growth and changes in gene expression
in the mycotoxigenic *Aspergillus niger* fungi isolated from a
Marche vineyard

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
GIORGIA IURINI

Relatore:
PROF.SSA LUCIA LANDI

Correlatore:
PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

Indice

ABSTRACT	9
RIASSUNTO	11
1. INTRODUZIONE.....	12
1.1 Significato della produzione di uva nel mondo e in Italia	12
1.2 Il genere <i>Aspergillus</i>	13
1.3 Micotossine e funghi micotossigeni che colpiscono la vite	15
1.4 Ocratossina A	17
1.4.1 Caratteristiche chimiche.....	18
1.4.2 Biosintesi.....	19
1.4.3 Tossicità	22
1.4.4 Produzione di OTA da diverse specie di <i>Aspergillus</i>	22
1.5 Fumonisine.....	24
1.6 Metodi innovativi di decontaminazione.....	25
1.7 La PCR Real Time: la tecnologia SYBR Green	27
2. SCOPO DELLA TESI.....	30
3. MATERIALI E METODI.....	32
3.1 Materiale fungino	32
3.2 Allevamento degli isolati fungini.....	33
3.3 Analisi molecolare mediante PCR Real Time per l'identificazione degli isolati fungini	33
3.3.1 Estrazione DNA	33
3.3.2 Amplificazione quantitativa Real Time (q)PCR mediante la tecnologia SYBR Green	34
3.4 Effetto del trattamento alla luce ultravioletta UV-C sulla crescita del micelio	35

3.4.1 Allestimento della prova sperimentale: allevamento dell'isolato fungino	36
3.5 Studio di espressione dei geni chiave associati allo stress fungino	36
3.6 Estrazione dell'RNA fungino.....	39
3.7 Generazione del cDNA mediante trascrittasi inversa	39
3.8 PCR quantitativa Real Time	40
3.9 Validazione dei geni referenti	40
3.10 Analisi dei dati	41
4. RISULTATI.....	42
4.1 Identificazione degli isolati	42
4.2 Trattamento alla luce ultravioletta UV-C dell'isolato F10B2.....	43
4.2.1 Accrescimento della colonia	43
4.3 Studio di espressione mediante PCR quantitativa Real Time (RT-qPCR) in seguito ai trattamenti UV-C	46
4.3.1 Validazione del protocollo RT-qPCR.....	46
4.3.2 Variazione nell'espressione dei geni analizzati	48
4.3.2.1 Polichetide sintasi-Ocratossina A (<i>pks1</i>).....	48
4.3.2.2 Polichetide sintasi-Ocratossina A (<i>pks2</i>).....	49
4.3.2.3 Polichetide sintasi-Fumonisine (<i>fum1</i>)	50
4.3.2.4 Superossido dismutasi (<i>sodB</i>)	51
4.3.2.5 Glutazione S-transferasi (<i>gst2</i>).....	52
4.3.2.6 Trealosio 6-fosfato sintasi (<i>tps1</i>)	53
5. DISCUSSIONE.....	54
6. CONCLUSIONI.....	59
7. BIBLIOGRAFIA.....	60

Indice delle tabelle

Tabella 1. Specie di <i>Aspergillus</i> produttrici di OTA (Garcia Cela, 2014).....	23
Tabella 2. lista dei primers utilizzati per l'identificazione molecolare	35
Tabella 3. Elenco geni utilizzati	38
Tabella 4. Sequenze dei primers selezionati	39

Indice delle figure

Figura 1. Visualizzazione in rete delle parole chiave emergenti delle pubblicazioni relative al genere <i>Aspergillus</i> . Più grande è il testo e il cerchio, più frequentemente l'argomento è stato citato. Figura estratta da Bhunjun et al., 2024..	15
Figura 2. Struttura chimica dell'ocratossina.	19
Figura 3. Schema delle diverse ipotesi della via biosintetica di OTA (Gallo et al., 2012)..	21
Figura 4. Struttura chimica della fumonisina FB1 (Chen et al., 2021)	25
Figura 5. Vigneto dell'azienda agricola "Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agr." Da cui sono stati prelevati gli isolati fungini..	32
Figura 6. Immagini scattate al microscopio ottico. Nella figura è mostrata la tipica forma di <i>Aspergillus</i> con testa conidale (a), (b) e (c), e il tipico micelio settato (d)	42
Figura 7. Curva di Melting relativa all'amplificazione qPCR dei primers <i>AN-tub</i> usati per l'identificazione molecolare di <i>Aspergillus niger</i> .	43
Figura 8. Accrescimento medio delle colonie osservato a 48 ore dal trattamento con luce UV-C per 1h (b) e 2h (c), rispetto ai controlli non trattati (a).....	44
Figura 9. Accrescimento medio delle colonie osservato a 24 e 48 ore dal trattamento con luce UV-C per 1h e 2h, rispetto ai controlli non trattati a 24h (C24) e 48h (C48). Il grafico rappresenta la media + SD di quattro repliche tecniche (n=4).	

Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$)..... 44

Figura 10. Confronto tra il campione non trattato e trattato per 2h alla luce UV-C. Nell'immagine si può osservare un ramo conidioforo integro prima del trattamento (a; freccia rossa); in seguito al trattamento sono evidenti delle lacerazioni sul ramo conidioforo (b; freccia rossa). Differenze si possono osservare nei conidi del fungo non trattato (c) che si presentano sferici (freccia gialla), mentre in seguito al trattamento i conidi risultano danneggiati (d) 45

Figura 11. Curve di dissociazione relative all'amplificazione in RT-qPCR dei geni target (*pks1*, *pks2*, *fum1*, *tps1*, *sodB*, *gst2*) e referenti (*actina* e β -*tubulina*). La specificità dei primers utilizzati è evidenziata dalla presenza di un unico picco caratteristico per ognuno dei geni analizzati. La foto rappresenta l'amplificazione di un campione 47

Figura 12. Espressione genica relativa del gene *pks1*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$) 48

Figura 13. Espressione genica relativa del gene *pks2*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo

non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$) 49

Figura 14. Espressione genica relativa del gene *fum1*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$) 50

Figura 15. Espressione genica relativa del gene *sodB* osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$) 51

Figura 16. Espressione genica relativa del gene *gst2*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere

differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$) 52

Figura 17. Espressione genica relativa del gene *tps1*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$) 53

Abstract

Fungal diseases in the vineyard reduce grape quality by affecting the aroma, taste and colour of the juice and wine. In addition to this sensory effect, the presence of filamentous fungi in grapes can cause the accumulation of mycotoxins, including, fumonisin B2, ochratoxin A (OTA). The latter is the most studied mycotoxin in grape products and can pose a serious threat to food safety that can occur throughout the food chain causing diseases in humans and animals, as well as economic losses. Mycotoxins in grapes are secondary metabolites produced by fungi mainly belonging to the genus *Aspergillus*. An investigation was carried out in this thesis to understand which mycotoxigenic fungal species was most widespread within a vineyard in the Marche region located on Montecarotto (AN) planted with the Verdicchio cultivar. The investigation carried out on 18 isolates sampled in the vineyard by Real Time PCR molecular investigation identified the presence of the *Aspergillus niger* species. Subsequently, one of the previously characterized isolates, i.e. isolate F10B2, was subjected to treatment for 1h or 2 h under UV-C shortwave light (253.7 nm), in order to investigate how mycotoxigenic fungi react to decontamination treatments with ultraviolet light. Afterwards, it was observed the *in vitro* mycelium growth reduction at 24h from treatment ~ by 30% and at 48h of treatment ~ by 18%. In both cases, no significant differences were observed between exposure to UV-C light for 1h or 2h. At the same time, a gene expression study was carried out in quantitative Real Time PCR by analyzing the expression variations of key genes involved in the synthesis of OTAs (*pks1* and *pks2*), FB2 (*fum1*) and genes associated with oxidative cellular stress such as the *gst2* gene, which encodes for glutathione synthetase, and the *sodB* gene, which encodes for superoxide dismutase. In addition, the *tps1* gene associated with the synthesis of trehalose, a sugar accumulated in microorganisms living under environmental stress, was analyzed. The study showed the upregulation of the *pks1* and *pks2* genes immediately after both 1h and 2h treatment, while the *fum1* gene was downregulated. This result suggested a preferential involvement of OTA mycotoxin over FB2 in the early stages of treatment. At the same time, an involvement of the *gst2* and *tps1* genes was observed, suggesting that fungal cells react to oxidative stress

and tend to accumulate reserve substances. This preliminary study suggests that UV-C light-induced stress may be beneficial to the decontamination of mycotoxigenic fungi, but sublethal treatment may activate defence responses in fungal cells involving mycotoxin production.

Riassunto

Le malattie fungine nel vigneto riducono la qualità dell'uva influenzando l'aroma, il gusto e il colore del succo e del vino. Oltre a questo effetto sensoriale, la presenza di funghi filamentosi nell'uva può causare l'accumulo di micotossine, tra cui, fumonisina B2, ocratossina A (OTA). Quest'ultima è la micotossina più studiata nei prodotti a base di uva e può effettivamente rappresentare una grave minaccia per la sicurezza alimentare che può verificarsi lungo tutta la catena alimentare causando malattie nell'uomo e negli animali, oltre a causare perdite economiche. Le micotossine nell'uva sono metaboliti secondari prodotte dai funghi principalmente appartenenti al genere *Aspergillus*. In questo lavoro di tesi è stata effettuata un'indagine per comprendere quale specie fungina micotossigena era maggiormente diffusa all'interno di un vigneto marchigiano collocato presso Montecarotto (AN) impiantato con la cultivar Verdicchio. L'indagine, effettuata su 18 isolati campionati nel vigneto mediante analisi molecolare in PCR Real Time, ha individuato la presenza della specie *Aspergillus niger*. Successivamente, con lo scopo di indagare come i funghi micotossigeni reagiscono ai trattamenti di decontaminazione con luce ultravioletta, uno degli isolati precedentemente caratterizzato, ovvero l'isolato F10B2, è stato sottoposto al trattamento per 1h o 2 h alla luce ad onda corta UV-C (253,7 nm). In seguito, è stato osservato che la crescita del micelio *in vitro* veniva ridotta a 24h dal trattamento ~ del 30% e a 48h del trattamento ~ del 18%. In entrambi i casi non si sono osservate differenze significative tra l'esposizione alla luce UV-C per 1h o per 2h. Contestualmente è stato effettuato uno studio di espressione genica in PCR quantitativa Real Time analizzando le variazioni di espressione di geni chiave coinvolti nella sintesi delle OTA (*pks1* e *pks2*), delle FB2 (*fum1*) e geni associati allo stress cellulare di tipo ossidativo come il gene *gst2*, che codifica per la glutatione S-transferasi, e il gene *sodB*, che codifica per la superossido dismutasi; inoltre è stato analizzato il gene *tps1* associato alla sintesi del trealosio, uno zucchero accumulato nei microrganismi che vivono in condizioni di stress ambientale. Lo studio ha evidenziato un incremento rispetto al controllo non trattato nell'espressione dei geni *pks1* e *pks2* maggiormente appena dopo il trattamento sia protratto per 1h che per 2h, mentre il gene *fum1* veniva sotto espresso. Questo risultato ha suggerito un

coinvolgimento preferenziale della micotossina OTA rispetto alle FB2 nelle prime fasi del trattamento. Contestualmente è stato osservato un coinvolgimento dei geni *gst2* e *tps1*, suggerendo che le cellule fungine reagiscono allo stress ossidativo e tendono ad accumulare sostanze di riserva. Questo studio preliminare suggerisce che lo stress indotto dalla luce UV-C può essere utile alla decontaminazione dei funghi micotossigeni ma il trattamento subletale può attivare risposte di difesa nelle cellule fungine che coinvolgono la produzione di micotossine.

1. INTRODUZIONE

1.1 Significato della produzione di uva nel mondo e in Italia

La vite (*Vitis vinifera* L.) è considerata una delle colture frutticole perenni più coltivate ed economicamente importanti al mondo. Inoltre, l'uva e i prodotti derivati, come il vino, mostrano un contenuto elevato di importanti nutrienti (Crespan et al., 2021). Secondo il rapporto dell'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino, nel 2022 la superficie vitata globale era di 7,2 milioni di ettari e la produzione mondiale di uva era di 71,3 milioni di tonnellate (di cui il 47,8% rappresentato da uva da vino) (OIV, 2022). Secondo il rapporto stilato nel 2018, la produzione di uva dei paesi mediterranei rappresenta oltre il 40% della produzione mondiale, con l'Italia primo produttore con 8,6 milioni di tonnellate (OIV, 2019).

La viticoltura, infatti, è iniziata fin dall'antichità nei paesi del bacino del Mediterraneo grazie ai Fenici e ai Cartaginesi. In Italia, il settore vitivinicolo ha una lunga tradizione e occupa un posto importante nel settore dello sviluppo agricolo. La vite era coltivata nella penisola già in tempi preistorici. Gli Etruschi, i Greci e i Celti della Pianura Padana mantennero vive le tecniche di coltivazione e produzione del vino; in seguito, i Romani nel corso delle invasioni, diffusero in Europa sia le piante di vite che le relative tecniche di viticoltura apprese dai popoli conquistati.

Attualmente in Italia la superficie vitata è di circa 720 mila ettari, posizionandosi al quarto posto nella classifica nazionale. Per quanto riguarda la produzione di vino, l'Italia è al secondo posto con una stima di 38 milioni di ettolitri, dietro la Francia al primo posto che invece vanta una produzione di circa 48 milioni di ettolitri (OIV, 2023).

Nonostante l'importanza del settore vitivinicolo, la produzione rimane sempre dipendente dalle condizioni climatiche, dalle malattie fungine e dai parassiti che sembrano essere le cause principali della riduzione della resa dell'uva e del declino qualitativo dei vigneti.

1.2 Il genere *Aspergillus*

Il nome *Aspergillus* fu introdotto da Micheli (1729), ispirandosi alla somiglianza tra i caratteristici conidiofori vescicolati del fungo e un aspergillum, ovvero il tipico aspersionario dell'acqua santa. Il nome è stato più tardi convalidato da Von Haller (1768) e sancito da Fries (1832). Attualmente, dopo una serie di aggiornamenti e revisioni tassonomiche,

sono descritte 467 specie classificate in 6 sottogeneri, 27 sezioni e 75 serie. L'ultimo aggiornamento risale al 2024, effettuato da Visagie et al. (2024). L'*Aspergillus* è tra i generi fungini con un impatto economico tra i più importanti (Samson et al., 2014). Questi funghi hanno una distribuzione geografica molto ampia, uno stile di vita prevalentemente saprofito e crescono soprattutto su materiale vegetale in decomposizione, ma a questo genere vi appartengono sia specie benefiche che dannose. (Perrone e Gallo, 2017). Sono tra i gruppi di maggior successo anche per gli importanti ruoli che ricoprono negli ecosistemi naturali e per l'economia dell'uomo. Gli aspergilli, ad esempio, sono molto importanti negli alimenti fermentati delle cucine asiatiche (Bennett, 2010). Vi sono specie utilizzate per le fermentazioni di molte bevande tipiche asiatiche, come il sake (un distillato), il mirin (un condimento alcolico dolce), lo Huang-chiu (vino giallo cinese) e molte altre (Kitagaki e Kitamoto, 2013; Ashu et al., 2016). Purtroppo, nonostante la maggior parte delle specie di *Aspergillus* conducano una vita saprofito, in alcuni casi possono essere patogene e rappresentare una delle principali cause di degradazione dei prodotti agricoli, in quanto possono contaminare alimenti e mangimi in diverse fasi, sia in pre e post-raccolta, lavorazione e manipolazione (Perrone e Gallo, 2017). Quindi, sebbene importanti negli alimenti fermentati, possono causare cambiamenti indesiderati di natura sensoriale, nutrizionale e qualitativa come la pigmentazione, scolorimento, marciumi e sviluppo di odori sgradevoli, ma soprattutto possono produrre micotossine, sostanze pericolose che contaminano i prodotti agricoli e alimentari (Perrone et al., 2007; Bennet, 2010; Taniwaki et al., 2018). Tuttavia, solo poche specie sono produttrici in modo significativo di micotossine, e appartengono principalmente al sottogenere *Circumdati*. In particolare, tre gruppi di specie sono rappresentati: *A. flavus* - *A. parasiticus* e specie strettamente correlate; *A. westerdijkiae* - *A. steynii* e specie strettamente correlate; *A. carbonarius* e specie strettamente correlate (Visagie et al., 2014; Frisvad et al., 2019; Houbraken et al., 2020). Le principali micotossine prodotte sono le aflatossine, le ocratossine e le fumonisine. Ad esempio, le specie appartenenti al gruppo *Flavi* sono produttrici di aflatossine su arachidi e mais. Queste specie sono in grado di crescere in condizioni sfavorevoli per le piante, come sotto stress da siccità, che consente infezioni di noci o cereali in via di sviluppo, con produzione di aflatossine prima del raccolto (Saori & Keller, 2011). Le specie appartenenti ai sottogeneri *Circumdati* e *Nigri* invece si presentano principalmente come infezioni post raccolta, non avendo affinità con le piante

coltivate, anche se con alcune eccezioni come *A. carbonarius*, *A. niger* e specie strettamente correlate sulla vite (Perrone et al., 2008; Perrone & Gallo, 2017). Gli *Aspergillus* spp. possono crescere in una gamma molto ampia di temperature, attività dell'acqua, pH, perciò sono diffusi in diversi ecosistemi e in una grande varietà di zone ambientali e climatiche (Klich, 2002; Abdel-Azeem et al., 2016). Sono ampiamente presenti nei suoli (Klich, 2002; Jaime-Garcia & Cotty, 2010), nelle paludi salmastre (Butinar et al., 2011), negli ecosistemi agricoli (Perrone et al., 2007), eccetera.

(Figura 1)

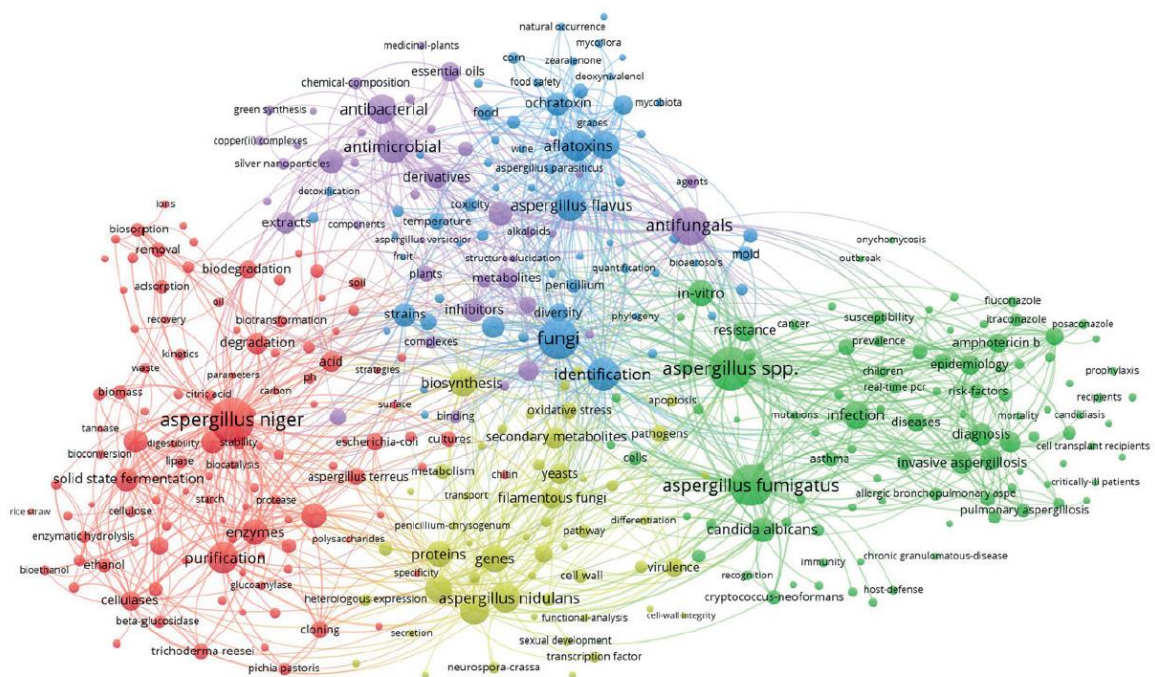


Figura 1- Visualizzazione in rete delle parole chiave emergenti delle pubblicazioni relative al genere *Aspergillus*. Più grande è il testo e il cerchio, più frequentemente l'argomento è stato citato. Figura estratta da Bhunjun et al. (2024).

1.3 Micotossine e funghi micotossigeni che colpiscono la vite

Le micotossine sono metaboliti secondari a bassa massa molecolare (MW ~700 Da) prodotte da molti funghi filamentosi appartenenti al phylum Ascomycota. (Liew e Mohod-Redzwan, 2018; Alshannaq e Yu, 2017), che possono avere effetti tossici sull'uomo anche a basse concentrazioni, ma anche su piante e animali.

Il termine micotossina è stato coniato solo nel 1962, dopo la morte improvvisa di 100.000 giovani tacchini in Inghilterra, che avevano ingerito farina di arachidi contaminata da aflatoossina B1 prodotta da *Aspergillus flavus*. Bennett (1987) ha definito le micotossine come "composti naturali prodotti da funghi che evocano una risposta tossica quando vengono introdotti a basse concentrazioni nei vertebrati superiori e altri animali per via naturale".

Lo sviluppo di micotossine può verificarsi in quasi tutti gli alimenti: dalle materie prime in campo all'alimento lavorato, inclusi i mangimi ad uso animale. Quindi possono svilupparsi da funghi presenti nelle colture in campo durante la stagione di crescita oppure possono essere prodotte da funghi che si sviluppano nelle derrate alimentari in postraccolta durante lo stoccaggio. In entrambi i casi possono permanere lungo tutta la filiera alimentare perché in parte resistenti ai trattamenti usati nell'industria alimentare. La loro biosintesi dipende dalle condizioni ambientali e dai parametri fisico-chimici (quantità di acqua libera $-a_w$), temperatura, contenuto di ossigeno, composizione chimica e pH del substrato), ma anche dalla predisposizione genetica delle muffe del ceppo a formare metaboliti secondari su un substrato favorevole (Mannaa e Kim, 2017; Kos et al., 2023). La temperatura ottimale per la produzione della maggior parte dei funghi micotossigeni è compresa tra 20 e 30 °C con attività dell'acqua (a_w) superiore a 0,7. I funghi possono resistere a un'ampia gamma di pH, sebbene il substrato estremamente acido o basico non ne consenta la crescita (Bennett e Klich, 2003).

Le micotossine sono strutture chimicamente molto diverse con diversi effetti biologici. Possono entrare nella catena alimentare umana o animale attraverso la contaminazione diretta o indiretta. In caso di contaminazione diretta, il materiale nutrizionale è contaminato da muffe micotossigene, mentre la contaminazione indiretta si verifica più spesso attraverso il consumo di carne, latte o uova di animali che hanno consumato alimenti contaminati da funghi micotossigeni o dalle sole micotossine. Poiché i funghi producono micotossine, l'unico modo in cui queste possono entrare nella filiera alimentare è contaminare il cibo con i funghi. Se si riuscisse a contenere lo sviluppo dei funghi micotossigeni in tutte le fasi della produzione alimentare, il problema della contaminazione da micotossine scomparirebbe (Murphy et al., 2006). Tuttavia, va sottolineato che le micotossine, una volta prodotte, possono permanere nelle derrate

alimentari indipendentemente dalla presenza del fungo che le ha prodotte. Questo aspetto le rende particolarmente pericolose.

I principali funghi che causano la contaminazione di alimenti e mangimi con micotossine sono principalmente specie dei generi fungini *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria* (Alshannaq e Yu, 2017). Ad oggi sono state rilevate circa quattrocento specie di micotossine. L'aflatossina (AFB), l'ocratossina A (OTA) e B (OTB), lo zearalenone (ZEA), il deossinivalenolo (DON), la fumonisina B1 (FB1) e B2 (FB2) e la tossina del tricotecene (T2) sono le principali ampiamente studiate per le quali l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (ESFA), che raccoglie e valuta i dati sulla presenza di micotossine in alimenti e mangimi preparando le linee guida per gli operatori del settore, ha previsto dei limiti di presenza nei vari alimenti e nelle materie prime. Queste micotossine possono produrre effetti nefrotossici, epatotossici, cancerogeni, mutageni, teratogeni e immunosoppressivi che portano a malattie acute e croniche, danni al fegato e ai reni, cancro o immunosoppressione (Zain, 2011; Zhu et al., 2017).

Per quanto riguarda l'uva, questa è suscettibile all'infezione da funghi filamentosi che causano marciumi e che possono contaminare i prodotti con micotossine lungo la sua catena di produzione, dal campo al post-raccolta. In campo durante la maturazione, le specie responsabili del deterioramento e sviluppo di marciumi appartengono ai generi *Botrytis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Rhizopus*. La muffa grigia causata dalla *Botrytis cinerea* è la più diffusa e devastante per l'uva. Tuttavia, quando la temperatura aumenta oltre i 37°C, predominano le specie appartenenti alla sezione *Aspergillus* section Nigri, solitamente chiamate "Aspergilli neri" principalmente coinvolte nella produzione di micotossine nell'uva (Valero et al., 2005; Somma et al., 2012).

Le micotossine di maggiore importanza nell'uva e nei prodotti a base di uva includono OTA, AFB, FB2 e la patulina (Susca et al., 2010).

1.4 Ocratossina A

Le ocratossine (OT) sono un gruppo di micotossine prodotte da diverse muffe dei generi *Penicillium* e *Aspergillus* che contaminano le colture in campo (Bennet e Klich, 2003).

La famiglia delle ocratossine è composta da tre membri, OTA, OTB (forma non clorurata di OTA) e OTC (un estere etilico di OTA).

L'OTA si distingue come la tipologia più abbondante e più tossica e per questo è stata ampiamente studiata. È la micotossina più comunemente rilevata nell'uva e nei prodotti derivati dall'uva, come succhi d'uva, vini e frutti di vite secchi (Aksoy et al., 2007; Visconti et al., 2008). Diverse indagini hanno riportato che i prodotti vitivinicoli provenienti dalle regioni mediterranee dell'Europa meridionale e del Nord Africa erano i più contaminati dall'OTA (Battilani et al., 2003; Lasram et al., 2012), a causa della contaminazione dell'uva da parte di funghi micotossigeni (Welkie et al., 2009). La contaminazione del vino con OTA è stata segnalata per la prima volta nel 1996 (Zimmerli e Dick, 1996). Attualmente, il vino è riconosciuto come la seconda fonte più significativa di esposizione umana all'OTA, dopo i cereali. I principali produttori di OTA nell'uva e nei frutti secchi sono funghi filamentosi appartenenti ai generi *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (Amezqueta et al., 2012). La contaminazione da OTA può verificarsi in qualsiasi fase del processo di vinificazione, dalla colonizzazione precoce di funghi micotossigeni nell'uva alle fasi finali del processo enologico. Tuttavia, la principale fonte di contaminazione nel prodotto finale deriva dal trasferimento di micotossine dall'uva (Abrunhosa et al., 2010).

Inoltre, il processo di vinificazione influenza in modo significativo il contenuto di OTA (Grazioli et al., 2006; Quintela et al., 2013; La Placa et al., 2023), con concentrazioni più elevate riportate nei vini rossi (<0,01-7,63 µg/L), rispetto ai vini rosati (<0,01-2,40 µg/L) e ai vini bianchi (<0,01-1,72 µg/L) in generale (Lasram et al., 2008; Blesa et al., 2006; Brera et al., 2008). Per i vini rossi, il processo di macerazione può portare ad un aumento del contenuto di OTA (circa il 20%) (Freire et al., 2020) a causa del contatto prolungato tra le bucce dell'uva e il succo d'uva, facilitando la solubilità e la diffusione di questa micotossina dalle bucce contaminate (Gonçalves et al., 2020). Al contrario, l'assenza di macerazione nei vini bianchi e rosati sembra essere un fattore critico che contribuisce a bassi livelli di OTA in questi vini (Dachery et al., 2017).

1.4.1 Caratteristiche chimiche

Chimicamente, l'OTA è composto da un'isocumarina polichetide e dall'amminoacido (modificato) fenilalanina, che sono legati tramite un legame peptidico (**Figura 2**). Recentemente è stato dimostrato che le polichetidi sintasi fungine (PKS) sono coinvolte nella biosintesi dell'OTA sia nelle specie di *Penicillium* che in quelle di *Aspergillus*

(Khoury e Atoui, 2010). Il suo nome chimico è L-fenilalanina-N - ((5-cloro-3, 4-diidro-8-idrossi-3-metil-1-ossoH-2-benzopiran-7-il) carbonile) - (R) – isocumarina.

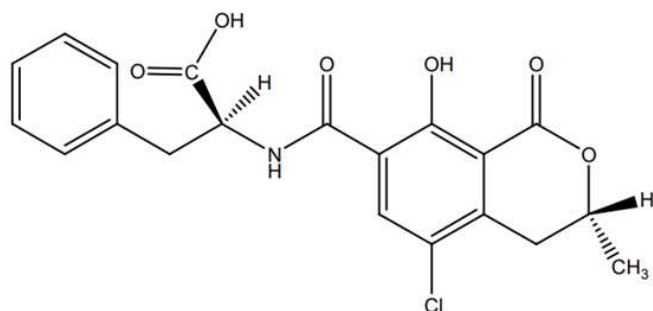


Figura 2- Struttura chimica dell'ocratossina A.

È un composto cristallino incolore solubile in solventi organici polari come alcoli, cloroformio e chetoni, leggermente solubile in H₂O e insolubile in eteri di petrolio e idrocarburi saturi; alla luce UV mostra una fluorescenza verde intenso in mezzo acido e una fluorescenza blu in condizioni alcaline. Inoltre, è una molecola moderatamente stabile che è in grado di resistere ad ambienti acidi e rimane invariata nella maggior parte dei processi nutrizionali come la tostatura, il riscaldamento, la salatura e la cottura al forno (Varga et al., 2010; Alshannaq e Yu, 2017; Hussein e Brasel, 2001; Khoury e Atoui, 2010).

1.4.2 Biosintesi

Sono stati condotti diversi studi per prevedere la via biosintetica dell'OTA, anche se non è stata ancora completamente chiarita nel dettaglio e il suo meccanismo di regolazione è rimasto sconosciuto. Tuttavia, questa via coinvolge alcuni passaggi cruciali, come la biosintesi del gruppo isocumarina attraverso l'azione catalizzante di una polichetide sintasi (PKS), il suo legame con l'amminoacido fenilalanina attraverso il gruppo carbossilico in una reazione catalizzata da una peptide sintasi, e la fase di clorazione, ma l'ordine delle reazioni non è ancora ben definito (Huff e Hamilton, 1979; Harris e Mantle, 2001; Gallo et al., 2012). A questo proposito, secondo i dati disponibili in letteratura, sono stati proposti diversi schemi (**Figura 3**). Infatti, la via biosintetica dell'OTA coinvolge la fenilalanina e l'acetato di sodio come materiale di partenza e diversi enzimi. È stato dimostrato che le PKS sono enzimi chiave coinvolti nella biosintesi dell'OTA (El Khoury e Atoui, 2010).

La produzione di OTA dipende dai tratti genetici dei funghi. I geni delle PKS e della peptide sintasi non ribosomiale (NRPS) sono tra i geni coinvolti nella biosintesi dell'OTA

(Gallo et al., 2012). Inoltre, molti studi ecofisiologici hanno riportato che la biosintesi dell'OTA da parte di specie ocratossigeniche appartenenti alla sezione *Aspergillus Nigri*, come l'aggregato di *A. niger* e *A. carbonarius*. è stata influenzata da aw, dalla temperatura e dalla composizione del mezzo nutritivo (Mitchell et al., 2003; Bellí et al., 2004). Infatti, la temperatura e l'intervallo di aw sono più restrittivi per la produzione di OTA che per la crescita fungina, sia su substrati naturali che su terreni di coltura. La produzione di OTA nel genere *Aspergillus* avviene generalmente a temperature inferiori a quelle ottimali per la crescita fungina tra le due (20 - 30°C).

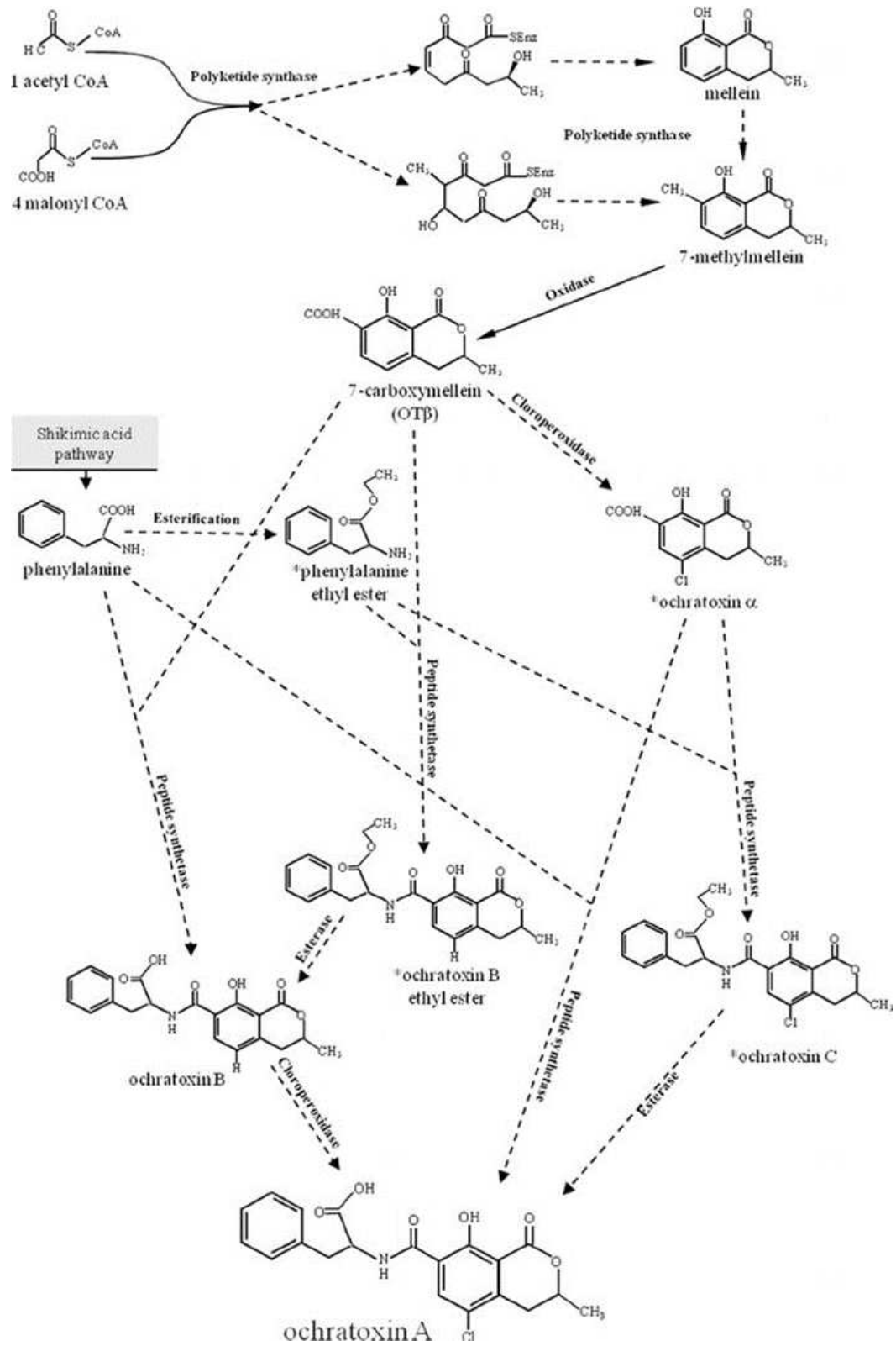


Figura 3- Schema delle diverse ipotesi della via biosintetica di OTA (Gallo et al., 2012).

1.4.3 Tossicità

La presenza di OTA nei prodotti a base di uva comporta un rischio per la salute dei consumatori, poiché questa tossina è classificata come possibile cancerogena per l'uomo (gruppo 2B) dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC, 1993). Ha effetti deleteri sui reni umani e animali, e sul sistema immunitario (Battilani e Camardo, 2015). Si ritiene che svolga un ruolo importante anche nella nefropatia endemica dei Balcani (BEN) e nella nefropatia interstiziale cronica (CIN) (Abid et al., 2003). Inoltre, sono stati segnalati una serie di effetti tossici nei confronti di vari animali da laboratorio: effetti neurotossici, genotossici, cancerogeni, mutageni, teratogeni e immunosoppressivi (Sava et al., 2006; Tozlovanu et al., 2006; Brown et al., 2007; Palma et al., 2007; Rossiello et al., 2008). Nell'uomo, sono stati registrati altri sintomi, tra cui anemia, anoressia, scolorimento della pelle, affaticamento, mal di testa e una serie di parametri clinici anormali come aumento del tempo di coagulazione, leucociti, neutrofili, eosinofili. Sulla base dei dati scientifici tossicologici e di esposizione disponibili e del parere del gruppo di esperti scientifici sui contaminanti negli alimenti, l'ESFA ha stabilito i livelli massimi tollerabili di OTA a 2 µg/kg nei vini, nei mosti e nei succhi d'uva; e 8 µg/kg nei frutti di vite secchi (uvetta e uva sultanina) (Commissione Europea. Regolamento (CE) n. 195/2023).

1.4.4. Produzione di OTA da diverse specie di *Aspergillus*

Diverse specie di *Aspergillus* hanno la capacità di produrre OTA. Alcune specie di aggregati di *A. niger* sono state tradizionalmente considerate importanti produttori di OTA principalmente nell'uva e nei prodotti a base di uva (Gil-Serna et al., 2019). Tuttavia, la loro capacità di produrre questa tossina sembra essere limitata a un piccolo numero di ceppi. Recentemente, il cluster completo di geni coinvolti nella produzione di OTA è stato descritto in specie aggregate di *A. niger* (Susca et al., 2016; Gil-Serna et al., 2018a). Questa regione è formata da cinque geni che codificano per un'alogenasi (HAL), un fattore di trascrizione (bZIP), un citocromo p450 monoossigenasi (P450), un peptide sintetasi non ribosomiale (NRPS) e una polichetide sintasi (PKS). Diversi studi molecolari hanno riportato che molti isolati aggregati di *A. niger* presentano una delezione della maggior parte dei geni biosintetici OTA, rimanendo solo una piccola parte non funzionale di quello codificante per la polichetide sintasi. La perdita di produzione di

OTA sembra essere correlata alla presenza di tale delezione nei genomi fungini (Susca et al., 2016; Gil-Serna et al., 2018a). La seguente tabella (**Tabella 1**) presenta i risultati delle specie di *Aspergillus* che producono OTA.

Tabella 1- Specie di *Aspergillus* produttrici di OTA (Garcia Cela, 2014)

	Species	OTA
1.	<i>A. auricomus</i>	-
2.	<i>A. bridgeri</i>	-
3.	<i>A. cretensis</i>	+
4.	<i>A. elegans</i>	-
5.	<i>A. flocculosus</i>	+
6.	<i>A. insulicola</i>	-
7.	<i>A. melleus</i>	-*
8.	<i>A. neobridgeri</i>	-
9.	<i>A. ochraceus</i>	+/-
10.	<i>A. ostianus</i>	-*
11.	<i>A. perseii</i>	-*
12.	<i>A. petrakii</i>	-*
13.	<i>A. pseudoelegans</i>	+
14.	<i>A. roseoglobulosus</i>	+
15.	<i>A. sclerotium</i>	+/-
16.	<i>A. steynii</i>	+
17.	<i>A. sulphurous</i>	+
18.	<i>A. westerdijkiae</i>	+
19.	<i>A. acidus</i>	-
20.	<i>A. aculeantinus</i>	-
21.	<i>A. aculeatus</i>	-
22.	<i>A. awamori</i>	+
23.	<i>A. brasiliensis</i>	-
24.	<i>A. carbonarius</i>	+/-

25.	<i>A. costaricaensis</i>	-
26.	<i>A. ellipticus</i>	-
27.	<i>A. foetidus</i>	-
28.	<i>A. heteromorphus</i>	-
29.	<i>A. homomorphus</i>	-
30.	<i>A. ibericus</i>	-
31.	<i>A. japonicas</i>	-
32.	<i>A. lactoffeatus</i>	+
33.	<i>A. niger</i>	+/-
34.	<i>A. piperis</i>	-
35.	<i>A. scleroticarbonarius</i>	-
36.	<i>A. sclerotiniger</i>	+
37.	<i>A. tubingensis</i>	+/-
38.	<i>A. uvarum</i>	-
39.	<i>A. vadensis</i>	-

+ produzione; - nessuna produzione; * producono tracce

1.5 Fumonisine

Le fumonisine (FUM) sono metaboliti secondari inizialmente individuati nel genere *Fusarium*, ma sono attualmente indicate come micotossine prodotte anche dal genere *Aspergillus* (Frisvad et al., 2007). Furono scoperte nel 1988 in un campione di mais prodotto in una regione sudafricana. Il mais e i prodotti a base di mais sono i più comunemente infettati, ma è stata verificata la loro presenza in diversi altri cereali (riso, grano, orzo, mais, segale, avena e miglio), prodotti a base di cereali (tortillas, fiaschetta di mais, patatine), arachidi e uva.

Ad oggi sono stati individuati in tutto 15 diversi omologhi di fumonisine, tra cui i più abbondanti sono B1 (FB1), B2 (FB2) e B3 (FB3). Dal punto di vista strutturale, sono formate da una catena idrocarburica e sono classificate come esteri dell'acido tricarballylico (**Figura 4**). La FB1 è considerata la più comune e più tossica. È un composto altamente polare, è solubile in acqua e insolubile nei solventi organici. Sono

pollo, alimenti liquidi, latte, succhi di frutta o sidro (Akhila et al., 2021). Sono stati descritti due diversi meccanismi nella degradazione dei contaminanti mediata dall'irradiazione UV: fotolisi e fotocatalisi. Nel primo caso la degradazione è dovuta all'assorbimento di radiazione elettromagnetica, mentre nel secondo viene utilizzato un fotocatalizzatore (ossido metallico, calcogenuro metallico o materiale a base di carbonio) per favorire la degradazione: TiO₂ (biossido di titanio) e ZnO (ossido di zinco) sono tra i catalizzatori più utilizzati.

La fotolisi avviene quando le molecole reagenti assorbono fotoni; gli elettroni vengono eccitati fino a raggiungere uno stato energetico elevato e, quando l'energia viene rilasciata, la struttura chimica della molecola viene alterata. La lunghezza d'onda della radiazione UV è inversamente proporzionale all'energia dei fotoni. Pertanto, le radiazioni UV-C hanno mostrato gli effetti più promettenti per la decontaminazione microbica e da micotossine (Shen e Singh, 2021). La luce UV può anche essere somministrata in forma concentrata, in modo che i brevi lampi (impulsi) intensi abbiano una maggiore capacità di penetrazione. Questa tecnologia è quindi chiamata "UV pulsato". Le aflatossine sono fotosensibili e possono essere degradate mediante fotolisi o fotocatalisi. Si suppone che la degradazione fotocatalitica dell'AFB₁ avvenga mediante l'ossidazione diretta dei radicali liberi idrossilici ($\bullet\text{OH}$), H⁺ e altre specie ossidative generate da UV/fotocatalizzatore. Il trattamento UV porta a profonde modifiche nella struttura chimica di AFB₁, che partono preferenzialmente dal doppio legame sulla porzione bifuranica. Altri percorsi di degradazione coinvolgono la reazione di cicloadizione sull'anello furanico e sull'anello lattonico, seguita da ulteriori riarrangiamenti strutturali (Sun et al., 2019; Murugesan et al., 2021; Song et al., 2022). Il trattamento UV è stato impiegato per la degradazione delle micotossine nei prodotti alimentari, come oli, latte, grano e arachidi. La fotocatalisi UV ha mostrato diverse limitazioni quando applicata agli alimenti, come l'ossidazione di preziosi componenti nutrizionali e la bassa penetrazione nei solidi e nei liquidi torbidi (Shen e Singh, 2022). La fotolisi/fotocatalisi UV è considerata un metodo di ossidazione avanzato con vantaggi significativi: nessun inquinamento secondario, condizioni operative facili e miti, basso costo, operabilità e applicabilità nell'industria alimentare (Shen e Singh, 2022). Per questi motivi è stato impiegato con successo per la degradazione degli inquinanti organici nelle acque reflue e nell'ambiente atmosferico. Tuttavia, a causa della sua natura ossidativa, per ottenere

un'applicazione soddisfacente è necessario eseguire un'attenta valutazione dell'effetto dannoso sugli alimenti in termini di profili sensoriali e nutrizionali e di residui di tossine. L'ampliamento della tecnologia per applicazioni di massa, la sostenibilità e la riutilizzabilità dei fotocatalizzatori sono caratteristiche importanti che meritano ulteriori studi (Magzoub et al., 2019).

1.7 La PCR Real Time: la tecnologia SYBR Green

Una delle tecnologie innovative più in uso per lo studio dell'espressione genica è quella che utilizza la tecnologia molecolare Quantificazione in Tempo Reale della Reazione a Catena della Polimerasi (RT qPCR) (Deepak et al., 2007; Landi et al., 2014).

La RT qPCR si basa sulla tecnologia PCR in grado di amplificare gli acidi nucleici in vitro. L'amplificazione permette una sintesi esponenziale di un segmento di DNA o cDNA, chiamato stampo, utilizzando l'enzima Taq polimerasi, il quale è in grado di operare anche ad elevate temperature (Williams et al., 1990). La tecnica PCR è nata come tecnologia qualitativa in quanto utilizza come metodo di analisi dei risultati, l'elettroforesi su gel di agarosio, che si effettua alla fine della reazione. Ciò, tuttavia, rende impossibile quantificare la presenza del gene di interesse in quanto non è possibile controllare la dinamica della reazione durante i cicli di PCR (fasi esponenziale, latente e plateau della reazione di sintesi). Nel corso degli anni è stata fondamentale un'evoluzione della tecnica PCR che, utilizzando traccianti della reazione di sintesi come delle molecole fluorescenti, consente di monitorare le dinamiche interne della PCR, rendendola idonea per la quantificazione.

La qPCR (PCR quantitativa), consente di quantificare la sintesi del prodotto di PCR ad ogni ciclo di amplificazione in tempo reale. Questo permette di effettuare un'analisi quantitativa della quantità di DNA stampo iniziale. Il segnale che viene quantificato è rappresentato dalla fluorescenza emessa da fluorofori, cioè molecole fluorescenti in grado di legarsi alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione. I fluorofori possono intercalarsi al DNA in maniera aspecifica, oppure fungere da marcatori di sonde oligonucleotidiche complementari a specifiche sequenze. Le informazioni che si ottengono con questa tecnica sono quindi maggiori rispetto a quelle di una classica PCR. La qPCR è spesso utilizzata in combinazione con la reazione di retro-trascrizione (RT), per quantificare i livelli di espressione di specifici geni di interesse.

Per valutare in tempo reale la quantità di DNA a doppio filamento presente dopo ogni ciclo di sintesi, nella miscela di reazione può essere utilizzato il SYBR Green, un composto fluorescente intercalante del DNA. Il SYBR® Green I fa parte dei coloranti aspecifici sviluppati per le reazioni di PCR Real-Time. Si tratta di un colorante fluorescente, simile all'etidio bromuro, che intercalandosi nel solco minore del DNA a doppia elica (Zipper et al., 2004), incrementa di circa cento volte la sua fluorescenza, generando un segnale visibile proporzionale al numero di copie presenti. Il SYBR GREEN è una cianina asimmetrica la cui fluorescenza aumenta significativamente quando essa si trova complessata con il DNA a doppia elica: la molecola assorbe luce blu ($\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$) ed emette luce verde ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$). La lettura della fluorescenza avviene al termine di ogni ciclo di amplificazione.

L'uso di molecole fluorescenti intercalanti è un metodo efficace e relativamente economico; tuttavia, questo sistema non è in grado di discriminare tra i prodotti specifici di amplificazione e altri prodotti aspecifici, come dimeri di primer. Infatti, questo modo di legare il DNA rende questo intercalante un reporter generalmente aspecifico, che permette di monitorare l'andamento della reazione, ma non consente di riconoscere a priori il prodotto amplificato che determina la comparsa del segnale di fluorescenza. Basandosi solamente sul grafico di amplificazione non è possibile sapere se la fluorescenza è data dal target atteso o da un prodotto aspecifico. Tuttavia, è possibile riconoscere i vari prodotti in base all'analisi delle curve di melting. Per Temperatura di melting (T_m) si intende la temperatura alla quale un DNA a doppio filamento si trova denaturato al 50% (Hernández et al., 2003). I processi di denaturazione dipendono da diversi fattori, fra cui la lunghezza della molecola di DNA e la sua sequenza (ordine delle basi e percentuale di CG), ed è quindi caratteristica di ciascun frammento. Basandosi su questo principio, è stato dimostrato che è possibile discriminare anche mutazioni a singolo nucleotide (SNP) (Landi et al., 2019).

L'analisi della curva di dissociazione viene fatta dal termociclatore al termine della reazione di amplificazione e consiste in un ciclo costituito da un graduale innalzamento della temperatura, di 0,2 o 0,5 °C, a partire da una temperatura prefissata (ad esempio 65°C) fino ad arrivare a circa 90-95°C. Lo strumento rileva il segnale di fluorescenza per tutta la durata dell'analisi. All'aumentare della temperatura il SYBR® Green si separa lentamente dalle molecole di DNA, ma al momento della denaturazione dei due filamenti

si ha un drastico calo della fluorescenza. Un software apposito trasforma i dati, relativi alla curva di melting, nella derivata prima negativa della funzione descritta dal segnale: ne risulta un grafico che mostrerà un picco nel punto di massima pendenza della curva di melting; tale picco sarà in corrispondenza della temperatura di melting di quello specifico amplicone.

2. SCOPO DELLA TESI

Le malattie crittogamiche e il cambiamento climatico minacciano sempre di più i viticoltori che hanno a che fare con produzioni poco stabili e perdite economiche ingenti. Nei vigneti italiani, tra le principali cause della riduzione della resa dell'uva e del declino qualitativo dei vigneti, un ruolo importante lo svolgono i funghi patogeni e saprofiti che colpiscono la vite in campo, ma sono causa di importanti perdite anche durante la fase di post raccolta. Tra le problematiche e malattie che i funghi possono causare sulla vite, una molto seria è la capacità di alcune specie di produrre micotossine, ovvero metaboliti secondari che possono avere effetti tossici sull'uomo e sugli animali anche a basse concentrazioni. Lo sviluppo di funghi micotossigeni può verificarsi in qualsiasi momento della filiera alimentare dal campo allo stoccaggio, con la possibilità di produrre micotossine che permangono anche in assenza del fungo che le ha prodotte. La biosintesi delle micotossine dipende sia dalla predisposizione genetica del fungo, ma anche da parametri fisico-chimici come temperatura, disponibilità di acqua libera, pH del substrato, disponibilità di ossigeno. Possono entrare nella catena alimentare umana o animale attraverso la contaminazione diretta o indiretta, ed essere molto dannose per la salute.

In questo contesto la scelta dei composti e/o di tecnologie per la conservazione e riduzione della contaminazione da micotossine sono di importanza cruciale. Negli ultimi anni diversi studi sono stati condotti con successo per selezionare sistemi alternativi all'uso dei classici fungicidi con la finalità di ottenere un protocollo adatto al contenimento delle malattie, riducendo allo stesso tempo l'impatto ambientale e i rischi annessi alla salute umana. Uno dei sistemi alternativi individuati è l'utilizzo della luce ultravioletta UV-C il cui utilizzo in campo è stato suggerito possa potenziare la qualità e la resa dei vigneti, rinforzando le difese naturali contro malattie e avversità climatiche. L'esposizione delle viti alla luce UV-C si è dimostrata efficace nel prevenire e inattivare lo sviluppo di funghi patogeni, riducendo l'uso di trattamenti chimici fino al 50%. Questo favorisce una gestione più efficiente e sostenibile del vigneto, contribuendo anche a ridurre l'impatto ambientale ed economico grazie ad un minor impiego di fitofarmaci. Tuttavia, molti studi ne hanno dimostrato una buona efficacia anche nel ridurre la carica fungina quando applicati in post raccolta. Questo lavoro di tesi si è sviluppato in questo ambito. In particolare, è stata identificata la popolazione fungina presente all'interno di un vigneto marchigiano. In seguito, uno degli isolati fungini emersi e identificato come *A. niger*, è

stato allevato *in vitro* e sottoposto all'azione della luce UV-C per valutarne, entro le 48 ore successive, l'effetto sulla crescita e la reazione delle cellule fungine allo stress indotto. In particolare è stata valutata la variazione dell'espressione di geni codificanti per la polichetide sintasi (*pks*), enzima coinvolto nella sintesi delle micotossine, geni che aiutano a ridurre lo stress ossidativo nelle cellule e hanno perciò funzione antiossidante come la glutatione S-transferasi (*gst2*) e la superossido dismutasi (*sodB*) e il gene che codifica per la trealosio 6-fosfato sintasi (*tps1*), enzima che catalizza la sintesi del trealosio, uno zucchero che interviene nella risposta adattativa a stress abiotici.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale fungino

Il materiale fungino testato in questa tesi sperimentale proveniva da un vigneto commerciale denominato “Fossato”, situato a Montecarotto (AN), gestito e messo a disposizione dell’azienda agricola “Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agr.” (**Figura 5**). Il vigneto era costituito interamente dalla cultivar Verdicchio, allevato a doppio capovolto con un sesto d’impianto di 3 m tra le file e 1,5 m sulla fila. L’appezzamento ha una superficie complessiva di 72000 m², ha esposizione Nord-Est con altitudine di 150 metri sul livello del mare.



Figura 5- Vigneto dell’azienda agricola “Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agr.” Da cui sono stati prelevati gli isolati fungini.

Di seguito sono elencati i codici degli isolati analizzati in questa tesi: F3B1, F3B2, F3B3, F3B4, F3B5, F6B1, F6B2, F6B3, F6B4, F10B1, F10B2, F10B3, F10B4, F10B5, F12B1, F12B2, MONT 3, MONT 5.

3.2 Allevamento degli isolati fungini

Gli isolati fungini, conservati in un substrato a base di agar destrosio di patate (PDA) e mantenuti a 4°C, sono stati prelevati e trasferiti in una nuova piastra Petri (60 mm) contenente PDA. Piccole quantità di micelio sono state prelevate con una pinza sterile e trasferite al centro della Petri. Le colture sono state incubate a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ per 5 giorni. Dopo lo sviluppo delle colonie pure in PDA, è stata effettuata una prima identificazione morfologica con l'ausilio del microscopio ottico (DM 2500; LAICA) che ha consentito di analizzare la tipologia di ife fungine e le spore (conidi) sviluppate da ogni isolato.

3.3 Analisi molecolare mediante PCR Real Time per l'identificazione degli isolati fungini

3.3.1 Estrazione DNA

Da ciascun isolato fungino è stato estratto il DNA utilizzando un protocollo a base di bromuro di cetil trimetil ammonio al 3% (CTAB 3%) (Doyle e Doyle, 1990). In dettaglio, da ciascun campione, sono stati prelevati 100 mg di micelio e inseriti in eppendorf/provette da 2 ml a cui sono stati aggiunti 50 mg circa di sodio metabisolfito con lo scopo di ridurre gli stress ossidativi associati alla frantumazione meccanica. Il micelio è stato disgregato attraverso l'agitazione ad alta velocità dall'apposito strumento Tissue Lyser III, compiendo due cicli da due minuti ciascuno, ad una frequenza di 30 Hz. In seguito, è stato aggiunto 700 μl di tampone di estrazione (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 M EDTA, 1.4 M NaCl, 2% (p/v) PVP). Le provette, adeguatamente miscelate, sono state incubate in bagnetto termostato a 65°C per 40 min. Passato il tempo di incubazione, con lo scopo di separare i detriti cellulari dal DNA, sono stati aggiunti 700 μl di cloroformio/alcool isoamilico (24:1) e miscelato per 2 min. Successivamente, la separazione del DNA è stata effettuata centrifugando le provette per 10 min a $7500 \times g$. Il sovrinatante è stato raccolto e posizionato in una nuova provetta ed è stato ripetuto il lavaggio con cloroformio. In seguito, la precipitazione del DNA è stata effettuata aggiungendo isopropanolo allo 0.8% e centrifugando le provette a $16800 \times g$ per 20 min. Il pellet di DNA ottenuto è stato lavato dai sali in eccesso aggiungendo 300 μl di etanolo freddo al 70% e centrifugando le provette per 5 min alla massima velocità. Il DNA è stato lasciato ad asciugare a temperatura ambiente per eliminare l'alcool ed è stato disciolto in 50 μl di acqua ultrapura. L'integrità e la qualità del DNA è stata verificata

sulla base di un rapporto di assorbanza da 1,60 a 1,90 a 260/280 nm, utilizzando BioPhotometer plus (Eppendorf Inc., Westbury, NY, USA) e da 1,8 a 2,0 a 230/260 nm.

3.3.2 Amplificazione quantitativa real-time (q)PCR mediante la tecnologia SYBR Green

Il DNA estratto è stato sottoposto ad analisi qPCR per l'identificazione specifica degli isolati fungini seguendo le indicazioni emerse dall'analisi morfologica al microscopio ottico (colore e morfologia delle strutture conidiche), che ne ha suggerito l'appartenenza al genere *Aspergillus*. In dettaglio sono stati testati dei primers specifici per le specie di *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* (**Tabella 2**), mediante la tecnologia SYBR Green. Le reazioni qPCR sono state eseguite in Piastre PCR trasparenti a 96 pozzetti (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizzando il termociclatore CFX Connect Real Time Detection System (Bio-Rad Laboratories). Per ogni campione l'amplificazione della PCR è stata effettuata in un volume totale di 10 μ L, contenente 4,8 μ L di DNA alla concentrazione variabile tra 1 50 ng 0,1 μ M di ciascun primer e 5 μ L di SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Per determinare la specificità dei primers, è stata eseguita l'analisi della curva di fusione nell'intervallo da 55 a 98°C con un gradiente di 0,05°C/sec.

Per verificare la specificità dei primers sono state incluse nell'analisi DNA estratto da specie di *Aspergillus*, specie controllo ottenute dalla collezione CBS Fungal Biodiversity Centre, di Wageningen, (NL) gentilmente concessi dal Prof. D.C. Spadaro dell'Università di Torino, Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA), relative alle specie: *A. foetidus*, *A. alliaceus*, *A. aculeatus*, *A. ochraceus*, *A. ellipticus*, *A. brasiliensis*, *A. heteromorphus*, *A. niger* e *A. carbonarius*.

Tabella 2 - Elenco dei primers utilizzati per l'identificazione molecolare degli isolati di *Aspergillus* spp.

Codice NCBI	Gene	Primers	Sequenze (5'-3') (F, forward; R, reverse)	Dimensione degli ampliconi (bp)
<i>Aspergillus niger</i>				
LC573660.1	β -tubulina	<i>AN-tub</i>	F-ATGATTCCAGACCCAGCACA R-GGAACCATGTTGACAGCCAG	229
HM011537.1	Polichetide sintasi (<i>pks5</i>)	<i>AnPKS</i>	F-TCGTCAACAGCATCAACAGC R-AGGACATATCAGATGCCGCA	165
<i>Aspergillus carbonarius</i>				
FR775314.1	β -tubulina	<i>AC-tub</i>	F-GATTGTGAGTTGTTCCCCGG R-CTTACACACTGGCCGTTTG	165
MG701890.1	Polichetide sintasi (<i>pks5</i>)	<i>AC PKS2</i>	F-TCACCAATCGACTGTTCCCA R-GAATCTTCACTTCGTCGGGC	188

3.4 Effetto del trattamento alla luce ultravioletta UV-C sulla crescita del micelio

Con lo scopo di verificare l'effetto subletale del trattamento ai raggi ultravioletti UV-C sulla crescita dei funghi micotossigeni, l'isolato fungino F10B2, identificato appartenente alla specie *Aspergillus niger*, è stato sottoposto ad un trattamento di 1h e 2h alla lampada alla luce ultravioletta UV-C a lunghezza d'onda corta (lampada UVC G15T8-253,7 nm), e trasferito di seguito in substrato PDA per 24h e 48h. Si tratta di una lampada fluorescente a bassa pressione. Le lampade germicide UV-C emettono radiazioni ultraviolette a 253,7 nm e vengono impiegate nella sterilizzazione di acqua, aria e superfici. Il loro utilizzo permette di eliminare un gran numero di virus, batteri ed altri microorganismi senza dover ricorrere a sostanze chimiche. Sono utilizzate nell'industria del confezionamento alimentare, in armadi e cappe sterili, nel condizionamento d'aria, per depuratori d'acqua ed in molti altri settori.

3.4.1. Allestimento della prova sperimentale: allevamento dell'isolato fungino

L'isolato F10B2 è stato posto in subcultura in PDA per 7 giorni a Temperatura Ambiente. Di seguito una porzione del fungo (0.5 cm) è stata prelevata e posta al centro di una nuova Piastra Petri (90 mm Ø) contenente PDA. Per il test sono state preparate 3 piastre, due delle quali sono state sottoposte rispettivamente per 1h e 2h alla luce UV-C ad una distanza di 10 cm dalla sorgente luminosa, e una piastra controllo mantenuta a temperatura ambiente alla luce ambientale. Dopo 24 e 48 ore è stata valutata la crescita del fungo mediante la misurazione dei diametri e calcolate le rispettive medie. Ogni replicato sperimentale è stato determinato da 4 replicati (n = 4). I dati di ciascuna misurazione sono mostrati come media ± deviazione standard (SD) e sono stati statisticamente valutati utilizzando il metodo ANOVA, seguito dal test a intervallo multiplo di Duncan, a $p \leq 0,05$.

3.5 Studio di espressione di geni chiave associati allo stress fungino

Con lo scopo di valutare l'effetto del trattamento sulla fisiologia del fungo, è stata analizzata l'espressione genica di alcuni geni chiave coinvolti nello stress ossidativo fungino e nella produzione delle micotossine OTA e FUM (**Tabella 3**). L'analisi dell'espressione genica dell'isolato F10B2 è stata eseguita in RT-qPCR, utilizzando la tecnologia SYBR Green, attenendosi alle linee guida espresse nel MIQE (Linee guida per gli esperimenti PCR quantitativa Real Time) (Bustin et al., 2010). Per la quantificazione genica è stato adottato il metodo comparativo $-\Delta\Delta C_t$ proposto da Livak e Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001), che valuta la quantità di gene espresso per geni target in ogni campione analizzato, rapportandolo all'espressione genica osservata in un campione scelto come controllo (fungo non trattato al tempo 0 e a 48h dal trattamento). L'espressione dei geni target è normalizzata utilizzando controlli endogeni, previa validazione, selezionati per essere utilizzati come referenti secondo l'equazione:

$$\frac{E(\text{target})^{\Delta Cq \text{ trattato} - \Delta Cq \text{ controllo}}}{E(\text{referente})^{\Delta Cq \text{ trattato} - \Delta Cq \text{ controllo}}}$$

Dove ΔCq rappresenta la variazione (Δ) del punto in cui ogni amplificato interseca il ciclo soglia (Cq), (Livak e Schmittgen, 2001).

I geni analizzati in questo studio sono stati selezionati dalla banca genomica National Center for Biotechnology Information (NCBI) in relazione al genoma della specie *Aspergillus niger*.

Tabella 3- Elenco dei geni utilizzati

Codice NCBI	Nome gene	Abbreviazione	Funzione
KX519720.1	polichetide sintasi	<i>pks1</i>	Le polichetidi sintasi fungine (<i>pks</i>) sono responsabili della biosintesi di diverse micotossine e di altri metaboliti secondari. Come dimostrato in diverse specie fungine, la polichetide sintasi (<i>pks</i>) è un enzima chiave della via biosintetica delle OTA, e FUM, potenti micotossine prodotta dai generi <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> (Gallo et al, 2014). <i>Pks1</i> è stata isolata ad <i>A. niger</i> identificato in vite in Cina (Zhang et al., 2016); <i>pks2</i> da <i>A. niger</i> isolato in vite in Spagna (Culebras et al., 2009); <i>fum1</i> è isolata dal cluster che porta alla sintesi della fumonosina (Susca et al., 2016).
EF527408.1	polichetide sintasi	<i>pks2</i>	
KJ934797.1	polichetide sintasi	<i>fum1</i>	
AJ812006.1	superossido dismutasi contenente manganese, esoni 1-3	<i>sodB</i>	Gene del superossido dismutasi, classificato come gene sensibile agli stress. L'enzima superossido dismutasi (<i>sodB</i>), appartiene alla classe delle ossidoreduttasi, catalizza l'anione superossido in H ₂ O ₂ (MacKenzie et al., 2005).
HQ646038.1	glutazione S-transferasi	<i>gst2</i>	Il glutazione (GSH) è il composto sulfidrilico intracellulare redox-attivo più abbondante e agisce come un importante tampone redox cellulare (Ikuo Sato et al., 2009). Il glutazione S-transferasi (<i>gst</i>), è coinvolto nella detossificazione cellulare catalizzando la coniugazione del GSH con xenobiotici e prodotti endogeni dello stress ossidativo.
U07184.1	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 11414 trealosio-6-fosfato sintasi subunità 1.	<i>tps1</i>	Il trealosio è un disaccaride che, in batteri, funghi, invertebrati e piante, funge da protettivo contro il calore e lo stress da essiccazione attraverso la stabilizzazione delle strutture proteiche e delle biomembrane. La trealosio-6-fosfato sintasi (<i>tps1</i>) è una subunità catalitica del complesso trealosio sintasi che catalizza la produzione di trealosio dal glucosio-6-fosfato e dall'UDP-alfa-D-glucosio. Complesso trealosio-6-P sintasi/fosfatasi (<i>tps1</i>), (Miao et al., 2017).
AY704271.1*	Gene dell'actina <i>Aspergillus niger</i> , parziale	<i>actA</i>	L'actina ha ruoli cruciali nell'esocitosi, nell'endocitosi, nel movimento degli organelli e nella citocinesi nei funghi. Per la sua ubiquità viene utilizzato come gene di riferimento negli studi di espressione genica, (Berepik et al., 2011)
MN787916.1*	Gene della tubulina, CDS parziale	<i>benA</i>	Le tubuline sono i componenti principali dei microtubuli coinvolti in molti processi cellulari, come la divisione cellulare, la motilità ciliare o flagellare e il trasporto intracellulare negli organismi eucariotici. Per la sua ubiquità viene utilizzato come gene di riferimento negli studi di espressione genica, (Zhao et al., 2014)

Dai geni scelti sono stati selezionati dei primers adatti allo studio in RT-qPCR utilizzando il software Primer3web version 4.1.0. (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). La lista è riportata nella **Tabella 4**.

Tabella 4 - Sequenze dei primers selezionati

NOME GENE (abbreviazione)	SEQUENZA forward	SEQUENZA reverse	Amplicone (bp)
<i>actA</i>	acagtccaagcgtggtatcc	gcctggatggagacgtagaa	240
<i>benA</i>	tatgttctcgtgccgtcct	gttgttaccagcaccggact	187
<i>pks1</i>	atcaactcgttcggatttgg	gacggactgattggaagcat	212
<i>pks2</i>	tcgagaccagcctattgctt	tcaacgagctcatccacttg	207
<i>sodB</i>	acaaaaagcaccaccagacc	cgtagcgagccaagtcttc	174
<i>gst2</i>	cttcgggtgtcaggagtgtt	gattcgggaactccttctcc	157
<i>fum1</i>	tggtcaggagcacttgatgc	gcggattttgtcgttctt	204
<i>tps1</i>	ctacgcctaattgggatcgaa	aacttctgggggacacctt	189

3.6. Estrazione dell'RNA fungino

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando il kit commerciale RNeasy® Plant Mini Kit QIAGEN, secondo la procedura indicata. L'integrità e la qualità dell'RNA è stata verificata sulla base di un rapporto di assorbanza da 1,80 a 1,90 a 260/280 nm, utilizzando BioPhotometer plus (Eppendorf Inc., Westbury, NY, USA) e da 1,8 a 2,0 a 230/260 nm.

3.7. Generazione del cDNA mediante trascrittasi inversa

Per la trascrizione del cDNA dall'RNA è stato utilizzato il kit iScript™ di sintesi del cDNA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La sintesi del cDNA è stata effettuata secondo le istruzioni contenute nel kit. In un volume di 20 µL sono stati inclusi 40-50 ng di RNA, 1 µL di random primers e 4 µL di mix di reazione 5×. La reazione è stata fatta avvenire nel termociclatore secondo i seguenti parametri: 5 minuti a 25 °C, 20 minuti a 46 °C e 1 minuto a 95°C.

3.8 PCR quantitativa Real Time

Le reazioni RT-qPCR sono state eseguite in Piastre PCR trasparenti a 96 pozzetti (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizzando il termociclatore CFX Connect Real Time Detection System (Bio-Rad Laboratories). Per ogni campione l'amplificazione della PCR è stata effettuata in un volume totale di 10 μ L, contenente 4,8 μ L di cDNA diluito (1:8), 0,1 μ M di ciascun primer precedentemente disegnato utilizzando sequenze geniche specifiche per il fungo, selezionate dalla banca genomica NCBI, e 5 μ L di SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Tutti i saggi sono stati effettuati in duplicato inclusi controlli no-RT e no-templato, per discriminare l'amplificazione non specifica.

Per determinare la specificità dei primers, è stata eseguita l'analisi della curva di fusione nell'intervallo da 55 a 98°C con un gradiente di 0,05°C/sec.

3.9 Validazione dei geni referenti

La stabilità dell'espressione genica (M) e il coefficiente di variazione (CV) dei geni di riferimento è stata analizzata utilizzando il software qBaseC della piattaforma Biogazelle, integrato nel sistema di rilevamento PCR Real-Time CFX Connect (Bio-Rad Laboratories). Il software utilizza il metodo geNorm messo a punto da Vandesompele et al. (Vandesompele et al., 2002). Quest'ultimo è un algoritmo sviluppato per determinare la stabilità dell'espressione di geni target di riferimento (geni referenti) selezionati. Può essere utilizzato negli studi pilota per identificare l'insieme ottimale di geni di riferimento da utilizzare negli studi di espressione genica o in seguito per verificare la stabilità di espressione degli obiettivi di riferimento selezionati. In questo lavoro è stato sviluppato su *A. niger* valutando il CV e il valore di M. I valori di stabilità raccomandati sono per dati omogenei pari a valori di $CV < 0,25$ e $M < 0,5$; mentre per dati eterogenei si considerano valori di $CV < 0,5$ e $M < 1$.

3.10 Analisi dei dati

Lo studio di espressione genica è stato eseguito utilizzando il metodo $-\Delta\Delta Ct$. Secondo questo metodo, l'espressione dei geni target è stata valutata come cambiamento medio nell'espressione genica, normalizzata a un gene di riferimento endogeno, e rispetto ai controlli non trattati. Per ogni singolo campione, sono state analizzate due repliche tecniche. Per ogni replica biologica sono state effettuate due repliche tecniche. Ogni replicato sperimentale è stato determinato da due replicati tecnici ($n = 4$). I dati di espressione di ciascun campione sono mostrati come media \pm SD e sono stati statisticamente valutati utilizzando il metodo ANOVA, seguito dal test a intervallo multiplo di Duncan, a $p \leq 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 Identificazione degli isolati

L'analisi al microscopio ottico ha consentito di individuare che le specie appartenevano al genere *Aspergillus*. La presenza di una testa conidiale, associata ad un ramo conidioforo con un rigonfiamento denominato vescicola, ne fanno un carattere distintivo del genere (**Figura 6**).

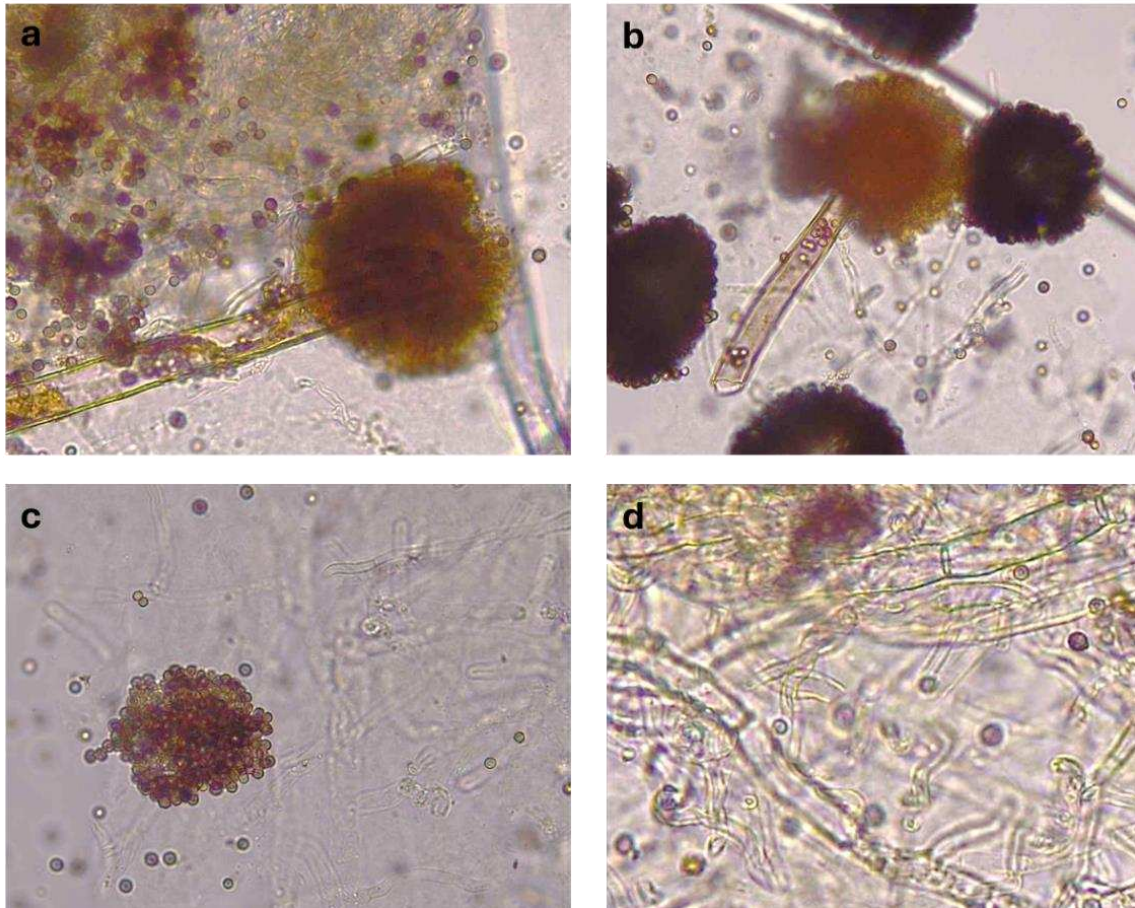


Figura 6- Immagini scattate al microscopio ottico. Nella figura è mostrata la tipica forma di *Aspergillus* con testa conidiale, (a), (b) e (c), il tipico micelio settato (d).

L'identificazione effettuata mediante qPCR ha consentito di identificare gli isolati quali appartenenti alla specie *A. niger* (**Figura 7**).

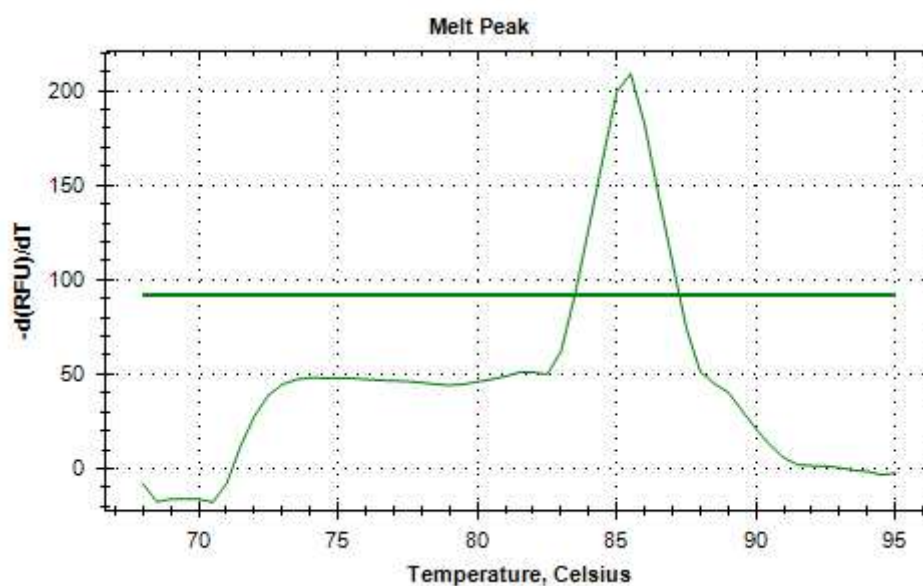


Figura 7- Curva di Melting relativa all'amplificazione qPCR dei primers *AN-tub* usati per l'identificazione molecolare di *Aspergillus niger*.

4.2 Trattamento alla luce ultravioletta UV-C dell'isolato F10B2

4.2.1 Accrescimento della colonia

Lo studio di accrescimento della colonia ha evidenziato che il trattamento alla luce ultravioletta UV-C ha ridotto in modo significativo la crescita del fungo nelle piastre Petri sottoposte a trattamento per 1h e 2h rispetto al controllo (**Figura 8**). Come si può notare dal grafico (**Figura 9**), l'accrescimento medio della colonia nelle piastre controllo non trattate, presenta una dimensione significativamente maggiore rispetto al fungo trattato in T1-h24 e T2-h24. In dettaglio a 24h dal trattamento alla luce UV-C la riduzione rispetto al controllo è del 32% per T1-h24 e del 30% T2-h24; tuttavia, non ci sono differenze significative tra i due trattamenti. Allo stesso modo a 48h dal trattamento i campioni T1-h48 e T2-h48 mantengono una riduzione nell'accrescimento ma ridotta rispetto a 24h. Infatti, la riduzione media osservata per entrambi i trattamenti rispetto al controllo non trattato (C48) si riduce a ~18%.

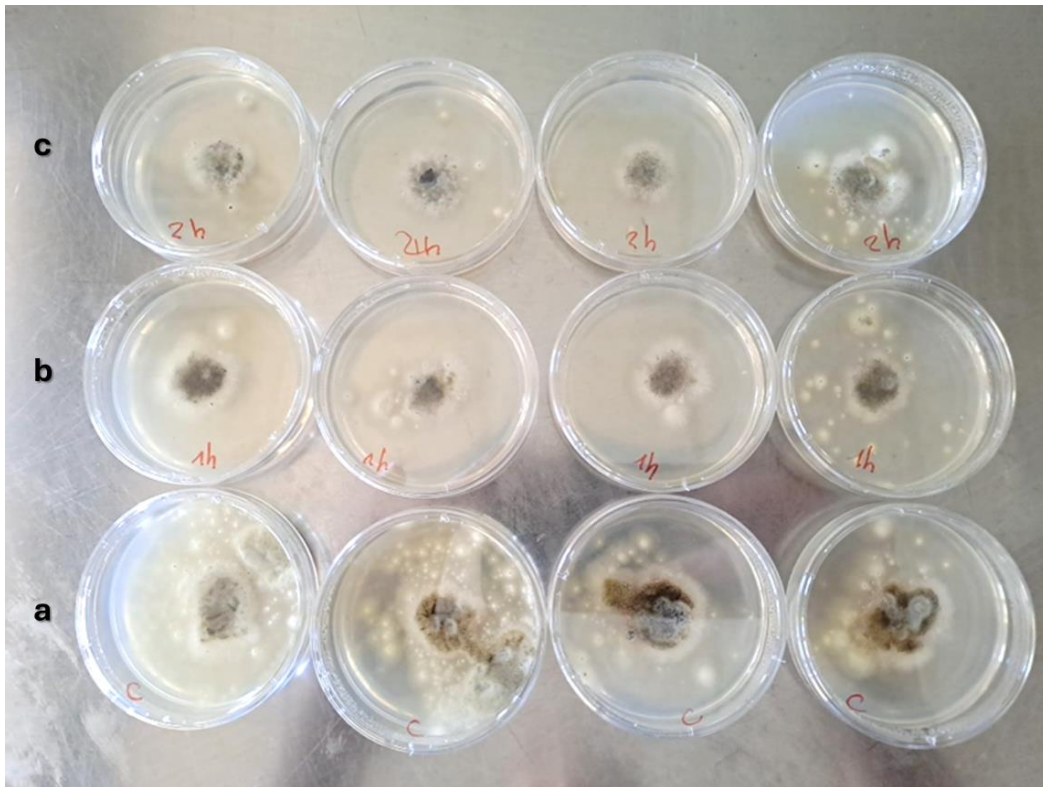


Figura 8- Accrescimento medio delle colonie osservato a 48 ore dal trattamento con luce UV-C per 1h (b) e 2h (c), rispetto ai controlli non trattati (a).

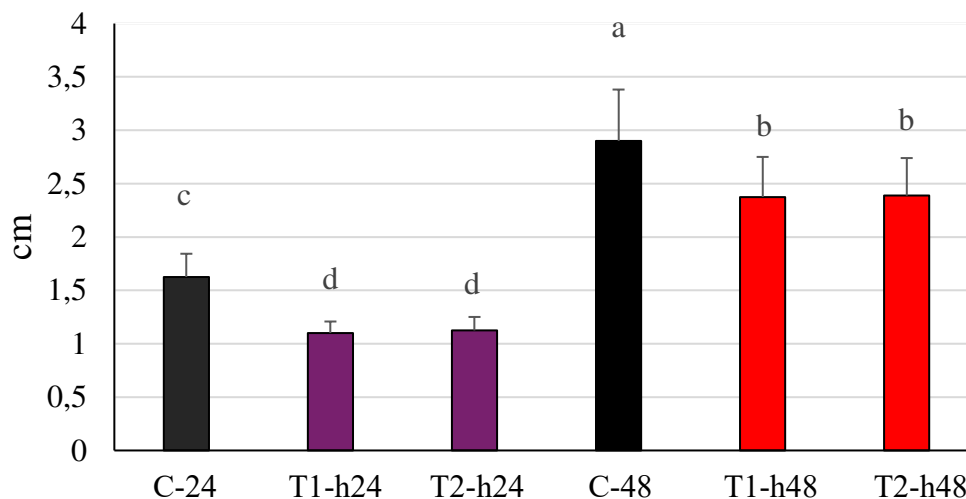


Figura 9- Accrescimento medio delle colonie osservato a 24 e 48 ore dal trattamento con luce UV-C per 1h e 2h, rispetto ai controlli non trattati a 24h (C24) e 48h (C48). Il grafico rappresenta la media + SD di quattro repliche tecniche (n=4). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$).

L'osservazione al microscopio ottico evidenzia che la morfologia del micelio e dei conidi è stata modificata in seguito al trattamento: nel ramo conidioforo precedentemente integro, l'esposizione alla luce UV-C ha portato alla formazione di lacerazioni ben evidenti; in più c'è una differenza nella forma dei conidi, che nel fungo non trattato risultano sferici, mentre in seguito a trattamento risultano danneggiati (**Figura 10**).

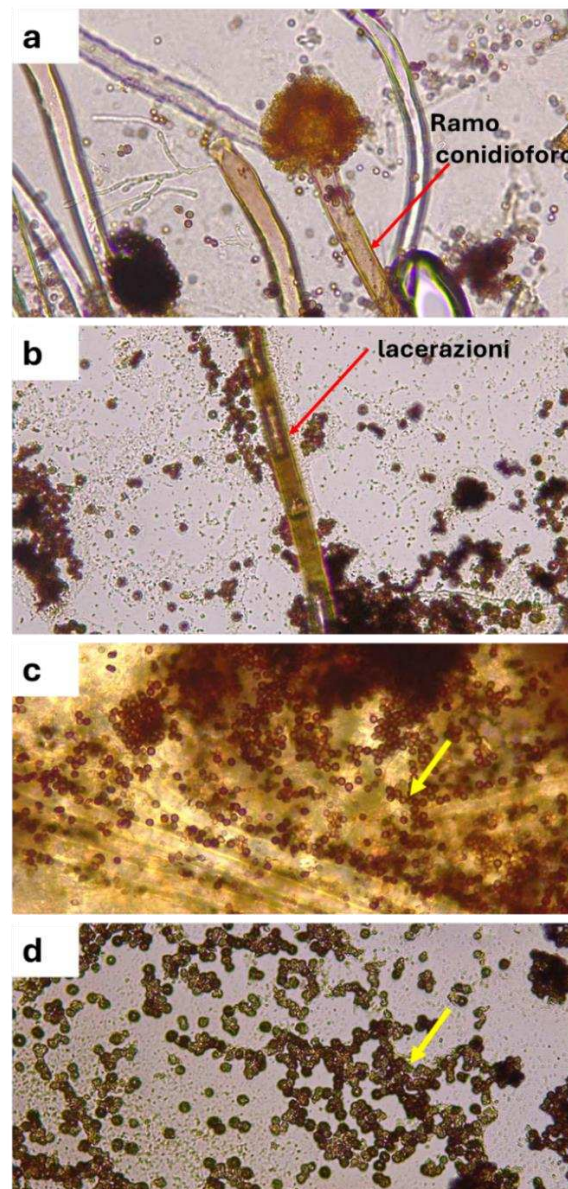


Figura 10- Confronto tra il campione non trattato e trattato per 2h alla luce UV-C. Nell'immagine si può osservare un ramo conidioforo integro prima del trattamento (a; freccia rossa); in seguito al trattamento sono evidenti delle lacerazioni sul ramo conidioforo (b; freccia rossa). Differenze si possono osservare nei conidi del fungo non trattato (c) che si presentano sferici (freccia gialla), mentre in seguito al trattamento i conidi risultano danneggiati (d).

4.3 Studio di espressione mediante PCR quantitativa Real Time (RT-qPCR) in seguito ai trattamenti UV-C

Lo studio di espressione ha riguardato geni chiave per la sintesi di micotossine in *Aspergillus niger*, due geni *pks* per la sintesi dell'enzima polichetide sintasi coinvolto nella sintesi delle OTA, indicati come *pks1* e *pks2*; il gene *fum1* anche esso necessario per la sintesi dell'enzima polichetide sintasi ma coinvolta nella sintesi delle fumonisine. Inoltre, è stata valutata l'espressione di altri geni chiave coinvolti nello stress ossidativo del fungo, come quelli codificanti per la superossido dismutasi (*sodB*) e la glutatione-S transferasi (*gst2*), e il gene trealosio-6-fosfato sintasi (*tps1*) coinvolto nella sintesi del trealosio, uno zucchero che interviene nella risposta adattativa a stress abiotici. Maggiori informazioni sono mostrate nella **Tabella 3**, capitolo 3.5.

4.3.1 Validazione del protocollo RT-qPCR

I primers selezionati per lo studio in RT-qPCR hanno evidenziato curve di fusione a singolo picco riconducibili agli ampliconi selezionati. Ciò ha confermato l'omogeneità e la specificità dei primers selezionati sia per i geni target che per i geni referenti (**Figura 11**). Nessuna amplificazione è stata osservata in uno qualsiasi dei test di controllo. Ciò ha confermato che i campioni erano privi di contaminazione da DNA genomico o RNA (dati non mostrati). I geni referenti selezionati, actina e β -tubulina sono risultati idonei per la normalizzazione del dato di espressione. L'algoritmo geNorm non ha evidenziato differenze all'interno dei trattamenti. L'uso contemporaneo dei 2 geni ha evidenziato valori di coefficiente di variazione (CV) < 0,5 e di stabilità, (M) < 1.

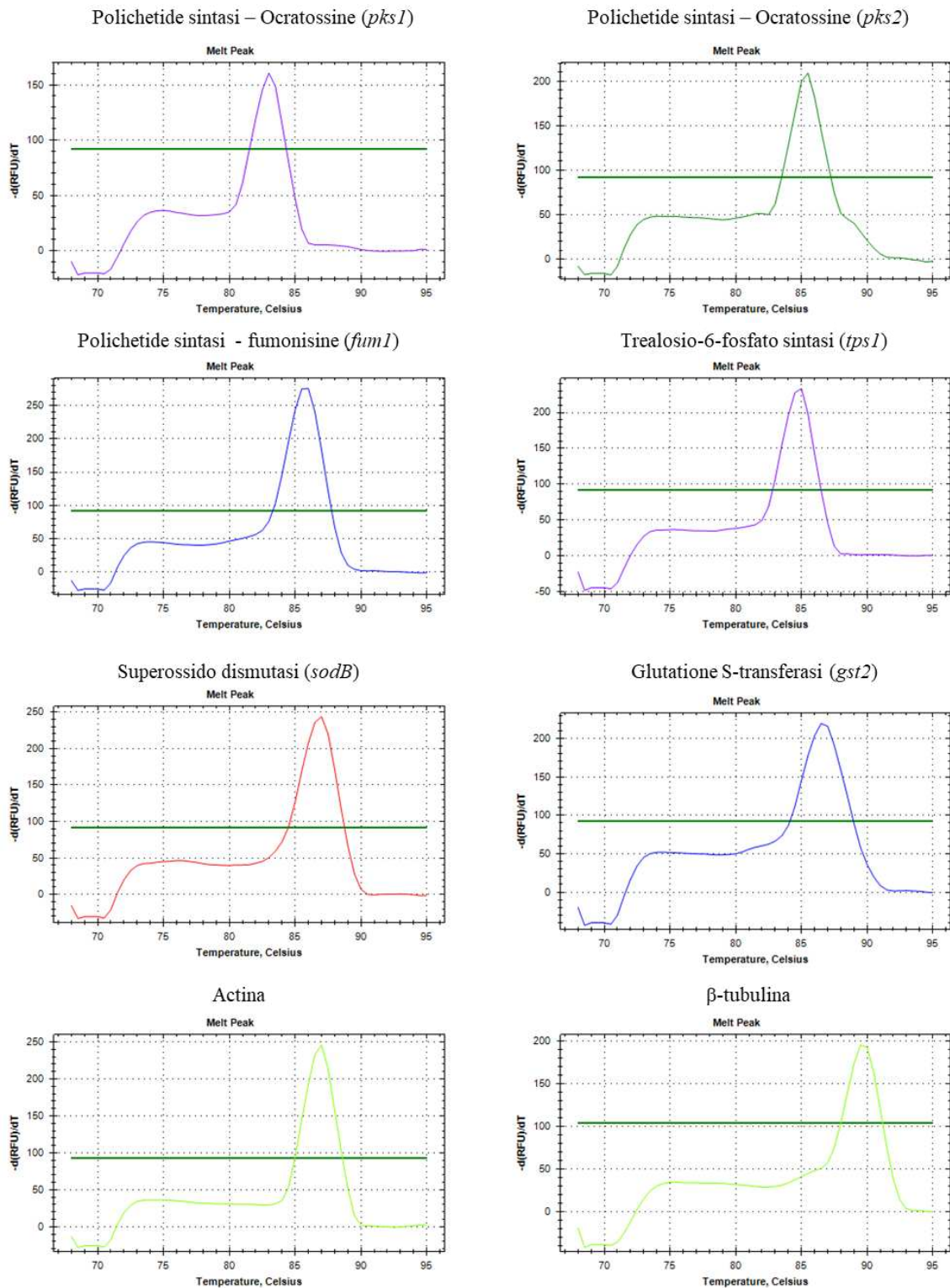


Figura 11- Curve di dissociazione relative all'amplificazione in RT-qPCR dei geni target (*pks1*, *pks2*, *fum1*, *tps1*, *sodB*, *gst2*) e referenti (actina e β -tubulina). La specificità dei primers utilizzati è evidenziata dalla presenza di un unico picco caratteristico per ognuno dei geni analizzati. La foto rappresenta l'amplificazione di un campione.

4.3.2 Variazione nell'espressione dei geni analizzati

4.3.2.1 Polichetide sintasi – Ocratossina A (*pks1*)

I valori di espressione genica del fungo relativi al gene *pks1* hanno evidenziato un cambiamento nel valore di espressione, rispetto al controllo preso come riferimento (C0), che corrisponde al fungo non trattato all'inizio della subcultura su PDA. In dettaglio variazioni di fold-change (FC), che corrisponde a quanto un gene si esprime in più o in meno rispetto al controllo, sono state osservate subito dopo il trattamento alla luce UV-C sia di 1 ora (T1-h0) che di 2 ore (T2-h0), rispettivamente di 3.1-FC e 4.4-FC. I valori di espressione diminuiscono nel tempo e a 48 ore dal trattamento (T1-h48 e T2-h48) si assestano su valori simili al controllo. Nessuna differenza è stata osservata nel campione C48, corrispondente al campione non trattato dopo 48 ore di coltura in substrato PDA alle medesime condizioni di coltura (Figura 12).

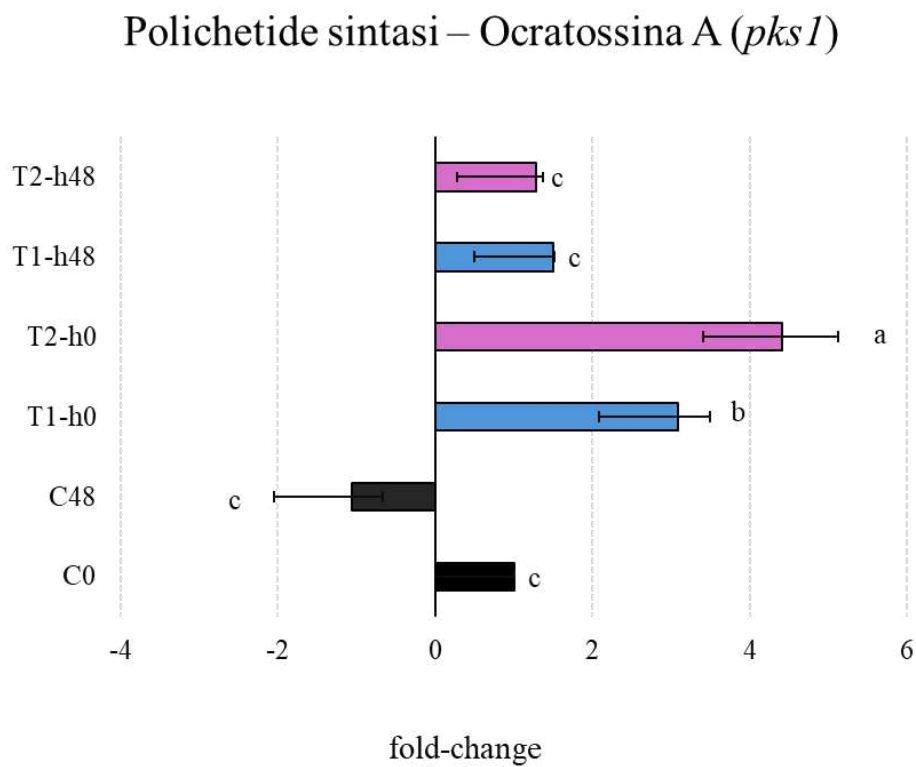


Figura 12- Espressione genica relativa del gene *pks1*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$).

4.3.2.2 Polichetide sintasi – Ocratossina A (*pks2*)

I valori di espressione genica del fungo relativi al gene *pks2* hanno evidenziato un andamento simile a quello osservato per il gene *pks1*. Infatti, cambiamenti nel valore di espressione genica, rispetto al controllo C0 sono state osservate subito dopo il trattamento alla luce UV-C sia di 1 ora (T1-h0) che di 2 ore (T2-h0), ma con valori di FC più elevati rispettivamente di 16,4-FC e 17,4-FC. I valori di espressione diminuiscono nel tempo e a 48 ore dal trattamento si mantengono significativamente più elevati rispetto al controllo C0. A T1-h48 il valore è di 3.2 e a T2-h48 di 3.0. Nessuna differenza è stata osservata nel campione C48 (Figura 13).

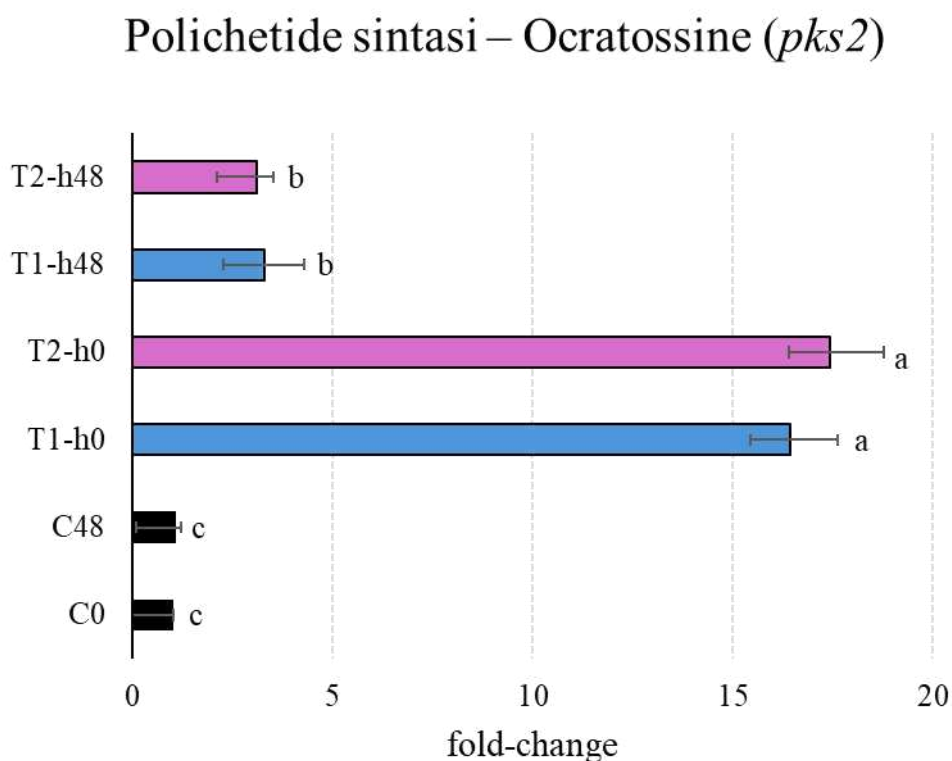


Figura 13- Espressione genica relativa del gene *pks2*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$).

4.3.2.3 Polichetide sintasi - fumonisine (*fum1*)

I valori di espressione genica del fungo relativi al gene *fum1* hanno evidenziato un andamento differente rispetto ai geni *pks1* e *pks2*. Ai tempi T1-h0 e T2-h0 l'espressione genica di *fum1* si riduce rispetto al controllo di 10,4 FC e 1,8 FC rispettivamente. I valori di espressione nel tempo tendono ad incrementare nuovamente fino a diventare simili al controllo C0 (Figura 14).

Polichetide sintasi - fumonisine (*fum1*)

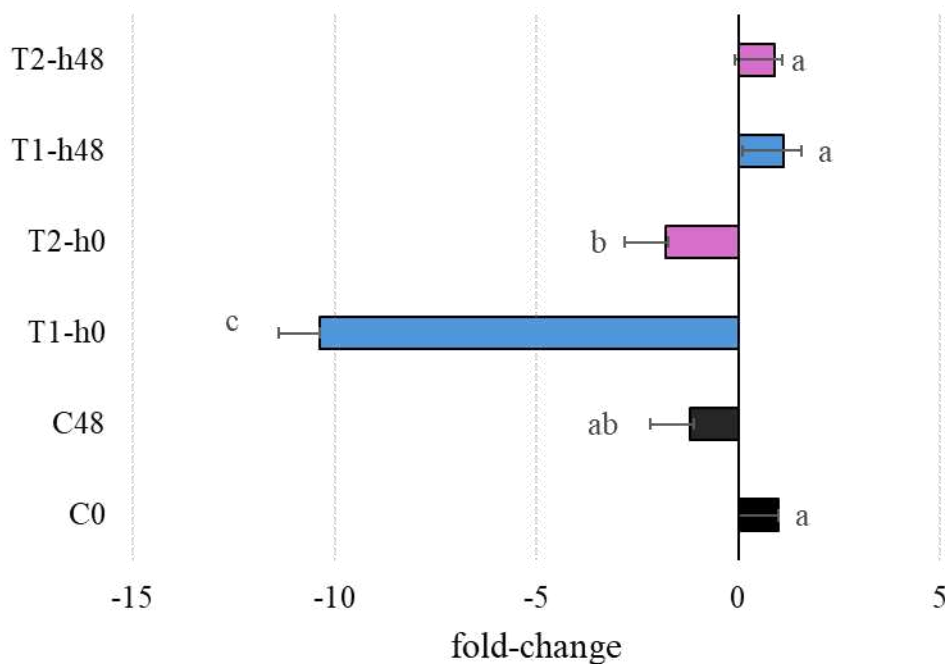


Figura 14- Espressione genica relativa del gene *fum1*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$).

4.3.2.4 Superossido dismutasi (*sodB*)

I valori di espressione genica del fungo relativi al gene *sodB* hanno evidenziato un comportamento differente rispetto ai precedenti. I valori di espressione non cambiano rispetto al controllo C0. Al tempo T1-h0 l'espressione genica di *sodB* si riduce rispetto al controllo di 1,6 FC, ma non in maniera significativa, mentre al tempo T2-h0, T1-h48 e T2-h48 i valori di FC tornano ad avvicinarsi a quelli del controllo, andando da 1,1 a 1,8 FC. Per il campione C48 non è stata osservata nessuna differenza (**Figura 15**).

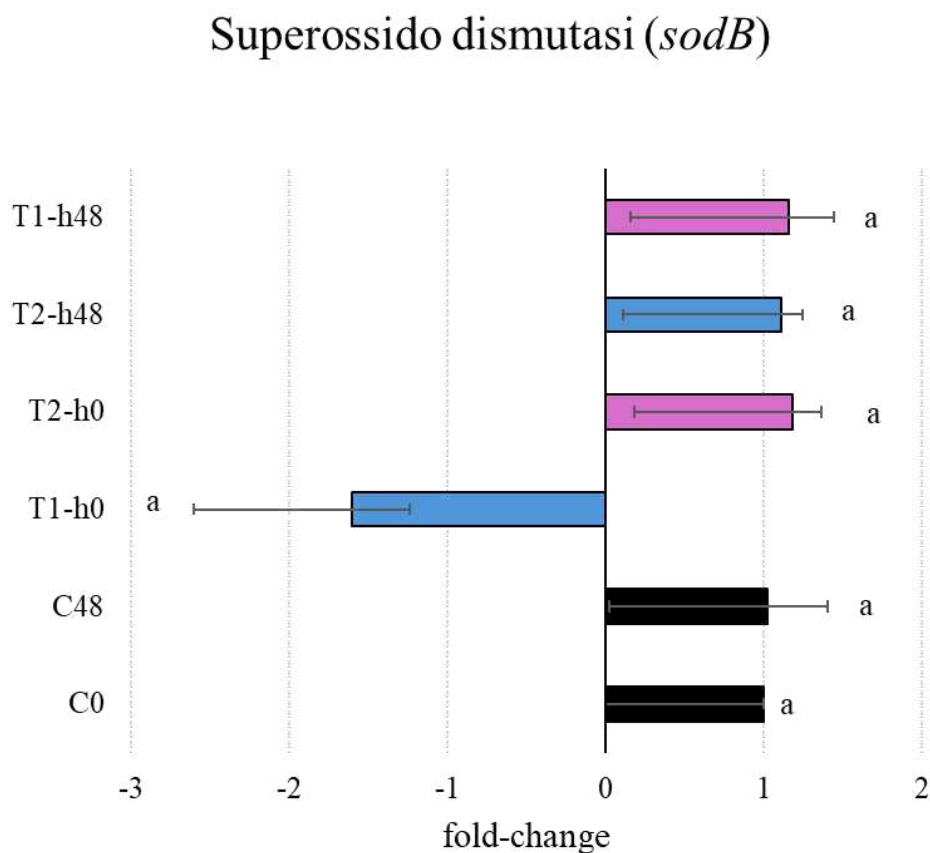


Figura 15- Espressione genica relativa del gene *sodB* osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in cultura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$).

4.3.2.5 Glutazione S-transferasi (*gst2*)

I valori di espressione genica del fungo relativi al gene *gst2* hanno evidenziato differenze rispetto al controllo C0 quando trattati per 2 h alla luce UV-C sia al tempo T2-h0 che al tempo T2-h48 di, rispettivamente 3,5 e 3,1 FC. Differenze significative si sono osservate anche tra C0 e C48 di 1,29 FC (**Figura 16**).

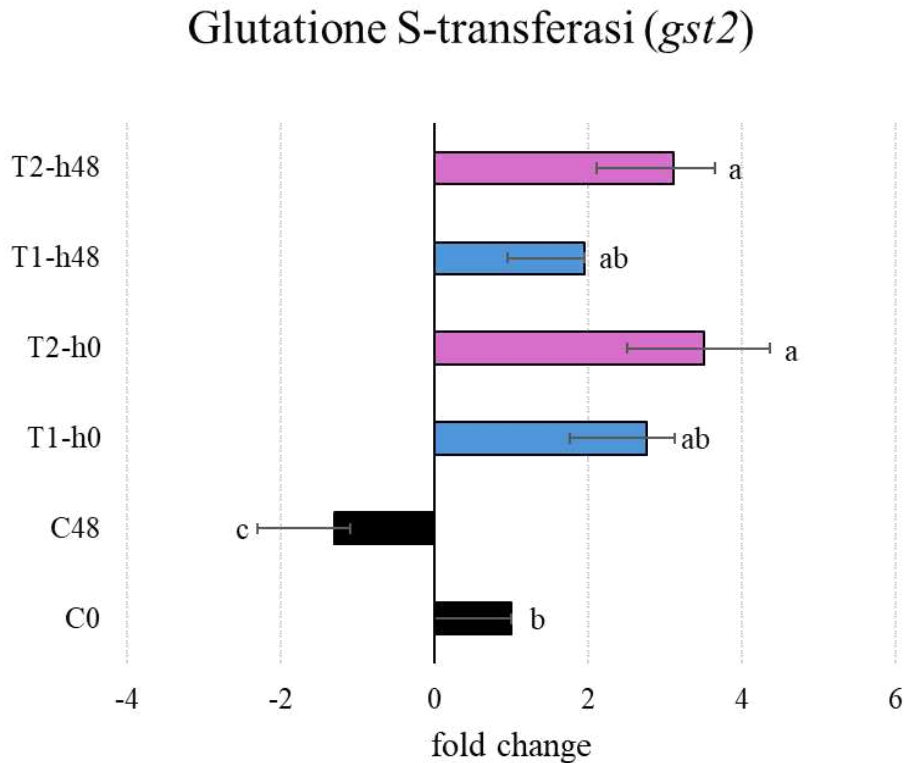


Figura 16- Espressione genica relativa del gene *gst2*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$).

4.3.2.6 Trealosio-6-fosfato sintasi (*tps1*)

Per quanto riguarda i valori di espressione genica del fungo relativi al gene *tps1*, subito dopo il trattamento c'è una notevole diminuzione, soprattutto al tempo T1-h0 che presenta un valore di 13,7 FC mentre T2-h0 presenta una diminuzione minore con un valore di 2,4 FC. I valori di espressione tendono poi ad aumentare nel tempo, fino a raggiungere 3,5 FC in T1-h48 e 4,4 FC in T2-h48, quindi significativamente più elevati rispetto al controllo (**Figura 17**).

Trealosio-6-fosfato sintasi (*tps1*)

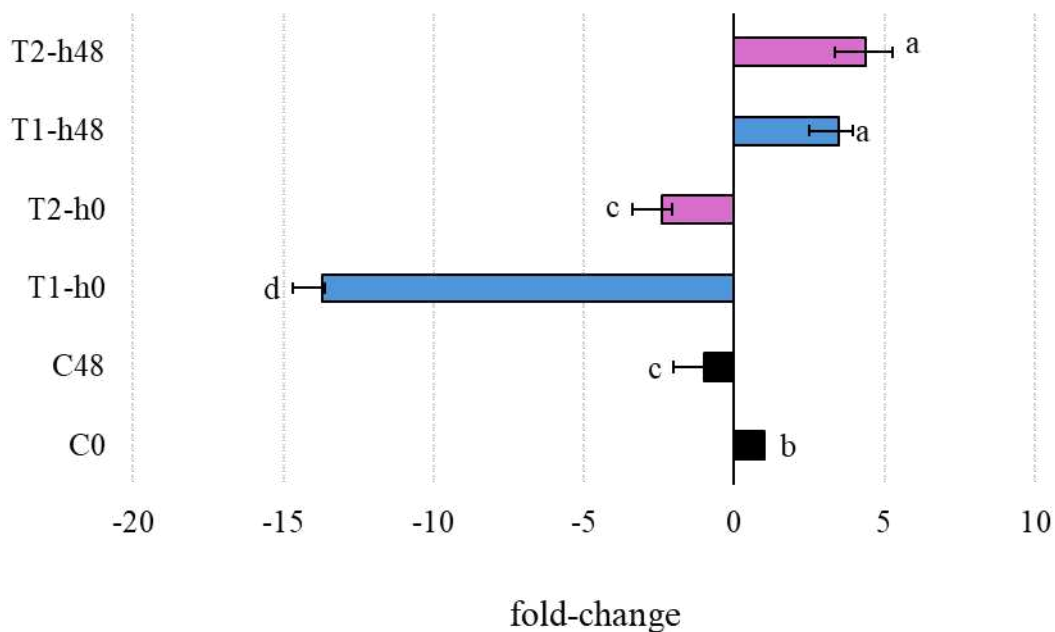


Figura 17- Espressione genica relativa del gene *tps1*, osservata nell'isolato 8 di *A. niger* dopo il trattamento alla luce UV per 1 ora (T1-h0), 2 ore (T2-h0), e dopo 48 ore di incubazione a 20°C (T1-h48 e T2-h48). C0 e C48 corrispondono al fungo non trattato subito dopo essere stato posto in coltura su substrato PDA e dopo 48 ore. Il grafico rappresenta la media + SD di tre repliche tecniche (n=3). Lettere differenti sopra le colonne indicano dati statisticamente differenti (test ad intervallo multiplo, Duncan's $P \leq 0.05$).

5. DISCUSSIONE

Le micotossine prodotte da molti funghi patogeni o saprofiti rappresentano un grave problema per le produzioni agricole e per l'intera filiera alimentare contaminando sia le piante in campo, che i prodotti in post raccolta, fino ad arrivare al consumatore. La loro peculiarità è che, una volta prodotte dai funghi micotossigeni, possono rimanere negli alimenti lavorati indipendentemente dalla presenza del fungo che le ha generate in quanto i processi di sanificazione, comunemente usati nella filiera alimentare, sono scarsamente efficaci contro di esse. Va sottolineato che le micotossine, essendo molto tossiche e in molti casi cancerogene, possono rappresentare un pericolo per la salute umana e degli animali in genere. Nell'ambito del vigneto e della produzione di uva, uno dei funghi comunemente ritrovato sull'uva appartiene al genere *Aspergillus* (Testempasis et al., 2023). Si tratta di un genere fungino saprofito cosmopolita che in molti contesti può essere patogeno (Bhunjun et al., 2024). Il genere *Aspergillus* è relativo a specie di funghi filamentosi che attaccano l'uva creando marciumi e peggiorando le qualità igieniche dell'uva. La contaminazione dell'uva e dei prodotti a base di uve da parte di specie di *Aspergillus* appartenenti alla sezione *Nigri* è nota essere presente in modo molto diffuso. In questo lavoro di tesi è stata esplorata la presenza di specie micotossigene all'interno di un vigneto marchigiano impiantato con Verdicchio, a Montecarotto in provincia di Ancona. Le analisi effettuate sui campioni prelevati, ovvero osservazione al microscopio e analisi qPCR, hanno rilevato che all'interno del vigneto è diffusa la presenza di *A. niger*; infatti, gli isolati fungini analizzati appartenevano tutti a questa specie.

Le specie *A. niger*, *A. tubingensis* e *A. carbonarius* incluse alla sezione *Aspergillus Nigri*, durante il loro sviluppo sono in grado di produrre micotossine, tra cui OTA (Battilani e Pietri, 2002). Precedenti studi hanno dimostrato che nella sezione *Aspergillus Nigri*, tale aggregato è un particolare gruppo di specie biseriate che contengono 15 specie morfologicamente indistinguibili tra cui *A. tubingensis*, *A. niger* e la più recentemente descritta *A. welwitschiae*, insieme ad *A. acidus*, *A. brasiliensis*, *A. coreanus*, *A. costaricensis*, *A. eucalypticola*, *A. foetidus*, *A. kawachii*, *A. lacticoffeatus*, *A. luchuensis*, *A. neoniger*, *A. piperis* e *A. vadensis* (Gil-Serna et al., 2018). Lavori precedenti hanno evidenziato che *A. niger* è la specie prevalente nei vigneti nel centro e nord Italia, mentre *A. carbonarius*, considerato la principale fonte di OTA nell'uva, è stato rinvenuto soprattutto nell'Italia meridionale. In particolare, è stato osservato che la quantità di

micotossina diminuisce negli isolati fungini presenti in centro e Nord Italia (Lucchetta et al., 2010), attribuendo di fatto una differente capacità delle specie fungine di produrre micotossine. I risultati di questo lavoro di tesi confermano quanto precedentemente evidenziato. Tuttavia, studi recenti realizzati sempre in vigneti marchigiani impiantati a Verdicchio hanno segnalato la presenza sia di *A. niger*, che della specie affine *A. tubingensis* (Bufalo et al., 2019). Questo potrebbe suggerire che all'interno dei vigneti possono instaurarsi delle dinamiche capaci di favorire il proliferare di alcune specie fungine a discapito di altre, come ad esempio la tipologia di trattamenti a cui il vigneto è sottoposto. Saranno necessarie delle indagini per confutare questa ipotesi che non sono state realizzate in questa tesi. Interessante però sottolineare che lavori precedenti hanno evidenziato che tra le specie di *Aspergillus* isolate nei vigneti in Spagna, la specie *A. niger* ha una buona capacità di produrre micotossine OTA e fumonisina B2, mentre non sono stati individuati i cluster genici responsabili delle produzioni dei tali micotossine nelle specie di *A. tubingensis*, (Gil-Serna et al., 2019). Va ricordato che i funghi producono micotossine per rispondere a degli stress ambientali e sopravvivere agli adattamenti. Quindi non è strano ipotizzare che esista una pressione selettiva che favorisca delle specie a discapito di altre.

Come appena accennato, *A. niger*, oltre che produrre l'ocratossina A (OTA), è produttore anche di fumonisina B2 (FB2) (recensita da Somma et al., 2012). L'OTA rimane però la micotossina più comune rilevata nell'uva e nei prodotti derivati dall'uva, come succo d'uva, vino e frutti di vite essiccati (Aksoy et al., 2007; Visconti et al., 2008; Zimmerli e Dick, 1996). Negli ultimi anni l'OTA è stata oggetto di numerosi studi in tutto il mondo a causa del suo pericolo per la salute umana e animale (Mantello, 2002). Possiede proprietà nefrotossiche molto forti, nonché cancerogene, teratogene e immunosoppressive, per cui è classificata dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro nel gruppo 2B (IARC, 1993). Essendo quindi la contaminazione da micotossine molto pericolosa per la salute, è fondamentale applicare tecniche e trattamenti mirati alla protezione delle piante e alla loro decontaminazione dai funghi che le producono. Sebbene la difesa chimica abbia in questo ancora un ruolo di rilievo, da anni la sperimentazione è orientata verso la messa a punto di sistemi di difesa alternativi a quelli chimici. Tra i sistemi di difesa alternativi negli ultimi anni è stato individuato l'utilizzo della luce ultravioletta UV-C, che si è dimostrata efficace nel prevenire e inattivare lo

sviluppo di funghi patogeni, riducendo la necessità di trattamenti chimici fino al 50%. Questo favorisce una gestione più efficiente e sostenibile del vigneto, contribuendo anche a ridurre l'impatto ambientale ed economico grazie ad un minor impiego di fitofarmaci. In questo lavoro di tesi è stata allestita una prova sperimentale per verificare l'effetto dei raggi UV-C su uno degli isolati di *A. niger* isolati dal vigneto di Montecarotto (AN) per analizzare l'efficacia nel ridurre la crescita del fungo *in vitro* e analizzare se il trattamento subletale era in grado di modificare, nelle cellule fungine sopravvissute al trattamento, l'espressione di geni chiave coinvolti nella biosintesi delle micotossine OTA e FB2 e nello stress ossidativo. Per prima cosa è stato messo a punto un sistema utile per lo studio dell'espressione genica in *A. niger*, impostando un protocollo analitico basato sull'analisi RT-qPCR utilizzando il metodo di calcolo comparativo $-\Delta\Delta Cq$ (Bustin et al., 2010), definendo i geni di riferimento appropriati per normalizzare il dato di espressione per l'analisi dell'RNA estratto dal fungo, sia trattato alla luce UV-C, sia non trattato. È infatti noto che per lo studio di espressione genica la stabilità dei geni di riferimento varia con l'ambiente, la crescita della pianta, il diverso tessuto vegetale e lo stress biotico e/o abiotico applicato (Sundaram et al., 2019; Bustin et al., 2010; Vandesomepele et al., 2002). Pertanto, la normalizzazione dei dati rilevati in RT-qPCR utilizzando geni riferimento adeguati è un prerequisito fondamentale per ottenere risultati affidabili.

Uno studio preliminare ci ha permesso di identificare l'actina (*actA*) e la β -tubulina (*benA*) come i geni più stabili, risultando quindi idonei per la normalizzazione del dato di espressione. Per quanto riguarda i geni target analizzati, in questo studio ci siamo concentrati sul gene polichetide sintasi (*pks1*, *pks2*, *fum1*), che codifica per un enzima chiave nella sintesi di micotossine, tra cui OTA e FB2 (Gallo et al., 2014), il gene della superossido dismutasi (*sodB*) e della glutatione S-transferasi (*gst2*), che sono enzimi con funzione antiossidante (MacKenzie et al., 2005; Ikuo Sato et al., 2009) e il gene che codifica per il trealosio 6-fosfato sintasi (*tps1*), enzima coinvolto nella sintesi del trealosio, zucchero che interviene nella risposta adattativa a stress abiotici (Miao et al., 2017). Per quanto riguarda la *pks1* e la *pks2*, in entrambi si è osservato un incremento dei valori di FC nei campioni analizzati subito dopo il trattamento alla luce UV-C, sia dopo 1h che 2h, mentre a 48h dal trattamento i valori sono diminuiti anche se ancora superiori al controllo. Per la *fum1* invece l'andamento osservato è differente, cioè subito dopo il

trattamento sia di 1h che di 2h i campioni hanno mostrato una notevole diminuzione di espressione del gene rispetto al controllo, per poi tornare ad avvicinarsi ai valori non differenti dal controllo dopo 48h dal trattamento. Questo risultato suggerisce che i raggi UV-C hanno provocato uno stress immediato alle cellule fungine attivando di preferenza i geni coinvolti nelle OTA piuttosto che nella produzione di FB2. Questo suggerisce in *A. niger* un coinvolgimento principale delle OTA rispetto a FB2 come osservato da lavori precedenti (Aksoy et al., 2007; Visconti et al., 2008; Zimmerli e Dick, 1996). In particolare, suggerisce che le cellule agiscono allo stress subito, evidenziato anche dall'analisi al microscopio che evidenzia lacerazioni nel micelio e nei conidi, attivando il metabolismo delle micotossine che potrebbero accumularsi e rimanere nell'uva. Tuttavia, è bene sottolineare che, mentre l'espressione genica è una "istantanea" e quindi dipende dalla stabilità dell'mRNA e da altri fattori che cambiano continuamente, la formazione delle tossine è un valore accumulato, esse potrebbero non essere ulteriormente metabolizzate; infatti, la nostra indagine ne mostra una riduzione già a 48h dal trattamento, oppure in alcuni casi potrebbero essere degradate dal fungo. Anche se lavori precedenti hanno evidenziato che esiste una correlazione tra il dato di espressione e l'accumulo misurato con sistemi convenzionali come l'HPLC (Priesterjahn et al., 2020). A seconda dello stato fisiologico della cellula fungina, l'espressione genica mostra una correlazione diretta con la formazione di micotossine suggerendone un valore predittivo (Schmidt-Heydt et al., 2009). Studi precedenti hanno dimostrato che l'espressione genica può essere utilizzata come indicazione precoce della biosintesi attiva delle micotossine (Abdel-Hadi et al., 2012).

Lavori precedenti hanno evidenziato che la formazione della tossina aflatoxina si forma in particolare in condizioni che causano stress ossidativo per il fungo (Jayashree et al., 2000). Lo stress ossidativo può essere indotto da sostanze chimiche come il perossido di idrogeno (Sies et al., 2017) ma anche da radiazioni luminose a onde corte del tipo UV-C (Santosa et al., 2005). Gli autori ipotizzano un collegamento tra stress ossidativo e formazione di aflatoxine come una sorta di meccanismo di compensazione, come dimostrato nel caso della micotossina citrinina prodotta dalla specie *Penicillium verrucosum* (Schmidt-Heydt et al., 2015). In questa specie, la citrinina agisce come uno scavenger di radicali, proteggendo il fungo dallo stress ossidativo indotto dalle radiazioni luminose a onde corte.

Nel nostro lavoro la reazione allo stress da parte del fungo è suggerita anche dall'attivazione precoce del gene *gst2*, mentre il gene *sodB* non sembra coinvolto nello stress indotto dalla luce UV-C.

Il glutatione è un importante antiossidante che agisce ad ampio spettro, capace di prevenire il danno cellulare causato da vari fattori di stress ossidativo (Molina-Hernandez et al., 2023). È stato osservato che il ruolo del glutatione fungino si estende oltre all'adattamento dei funghi allo stress, evidenziando che ha un ruolo nel mantenere la vitalità del fungo e nello sviluppo della patogenesi (Wangsanut e Pongpom, 2022). Per quanto riguarda il gene *sodB*, il suo mancato coinvolgimento potrebbe essere associato a ruoli specifici dell'enzima nel contrastare i danni ossidativi causati dai radicali liberi non emersi in questo studio. Lo studio di un numero maggiore di geni associati allo stress ossidativo potrebbe chiarire questo aspetto. Il comportamento del gene *tps1* invece è differente dai geni discussi fino ad ora: subito dopo il trattamento si registrano notevoli diminuzioni dei valori di espressione genica, mentre dopo 48h dal trattamento i valori crescono significativamente rispetto al controllo. Nei funghi l'accumulo di trealosio è necessario per reagire agli stress (Cervantes-Chávez et al., 2016; Molina-Hernandez et al., 2023).

Il trealosio è uno zucchero disaccaride naturalmente stabile e non riducente, isolato da un gran numero di specie procariotiche ed eucariotiche che comprendono batteri, archei, lieviti, funghi, alghe, piante, nonché gli ordini inferiori del regno animale, in particolare quelli che vivono in ambienti estremi (Liu et al., 2017).

In generale, i dati mostrano che la formazione di tossine è influenzata dalla luce a onde corte. È già stato descritto in precedenza che i geni di diversi metaboliti secondari sono spesso regolati reciprocamente in diverse condizioni di luce. In questo contesto, alcuni metaboliti secondari vengono indotti e altri ridotti (Bayram et al., 2016; Fanelli et al., 2012).

6. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi ha individuato che nei vigneti marchigiani la specie fungina prevalente produttrice di micotossine è l'*A. niger*. Si tratta di uno studio confinato ad un unico vigneto ma che fornisce indicazioni importanti e in linea con quanto osservato in precedenti lavori. Lo studio sull'efficacia *in vitro* della luce ultravioletta UV-C mostra che tale trattamento è in grado di contenere la crescita fungina. In particolare, l'analisi di espressione genica associata a geni chiave nel metabolismo delle micotossine OTA e FB2 e a geni coinvolti nello stress cellulare, ha evidenziato un innalzamento nell'espressione nelle primissime fasi dopo il trattamento del gene chiave *pks* associato alla produzione di OTA, mentre il trattamento reprime l'espressione del gene *fum1* coinvolto nella sintesi di FB2. Questo comportamento sottolinea un coinvolgimento differenziale della tossina OTA nelle prime fasi del trattamento. Contestualmente abbiamo osservato un innalzamento dell'espressione del gene *gst2*, coinvolto nella produzione del glutathione con funzioni antiossidanti ad ampio spettro, e del gene *tsp1* associato alla produzione di trealosio. Queste osservazioni mostrano che le cellule fungine in condizioni subletali reagiscono allo stress con possibile accumulo di micotossine. Questo lavoro, pur mettendo in luce alcune dinamiche cellulari dei funghi micotossigeni, rappresenta un'indagine preliminare che necessita di ulteriori analisi, come lo studio di un numero maggiore di geni e trattamenti alla luce UV-C seguendo differenti parametri rispetto a quelli testati, per chiarire i meccanismi fungini coinvolti nella risposta agli stress. Tutte le informazioni ottenute sono comunque importanti per pianificare sistemi di difesa efficaci contro la proliferazione dei funghi micotossigeni e la loro capacità di produrre metaboliti secondari tossici all'interno degli alimenti che sono nocivi per la salute del consumatore.

7. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Azeem, A.M., Salem, F.M., Abdel-Azeem, M.A., et al. (2016). Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats. In: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: *Aspergillus* system properties and applications (Gupta VK, ed.). Elsevier, Amsterdam: 3–28. DOI: 10.1016/B978-0-444-63505-1.00001-4

Abrunhosa, L., Paterson, R.R., Venâncio, A. (2010). Biodegradazione dell'ocratossina A per la decontaminazione di alimenti e mangimi. *Toxine*. 2:1078-1099. DOI: 10.3390/toxins2051078

Akhila, P. P., Sunooj, K. V., Aaliya, B., Navaf, M., Sudheesh, C., Sabu, S., et al. (2021). Application of electromagnetic radiations for decontamination of fungi and mycotoxins in food products: A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology* 114, 399–409. doi: 10.1016/j.tifs.2021.06.013

Aksoy, U., Eltem, R., Meyvaci, K. B., Altindisli, A. and Karabat, S. (2007). Five-year survey of ochratoxin A in processed sultanas from Turkey. *Food Additives and Contaminants* 24: 292-296. DOI: 10.1080/02652030601039021

Alshannaq, A. and Yu, J. H., (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14: 632. DOI: 10.3390/ijerph14060632

Amezqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., Gonzalez-Peñas, E., De Cerain, A. L., Guiraud, J. (2012). Funghi produttori di OTA negli alimenti: una recensione. *Controllo degli alimenti*. 26:259-268. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.042>

Ashu, E., Forsythe, A., Vogan, A. A., et al. (2016). Filamentous fungi in fermented foods. In: *Fermented foods, part I: Biochemistry and biotechnology* (Montet D, Ray RC, eds). Boca Raton: CRC Press: 45–75. DOI: 10.1201/b19872-5

Atanda, S. A., Pessu, P. O., Aina, J. A., Agoda, S., & Adekalu, O. A. (2013). Management in Agriculture. *Greener Journal of Agricultural Sciences*, 176-184

Battilani, P. and Camardo, M. (2015). OTA-grapes: a mechanistic model to predict ochratoxin A risk in grapes, a step beyond the systems approach. *Toxins* 7: 3012-3029. DOI: 10.3390/toxins7083012

Battilani, P., Pietri, A. (2002). Ochratoxin a in Grapes and Wine. *European Journal of Plant Pathology* 108, 639–643. <https://doi.org/10.1023/A:1020693410428>

Bellí, N., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marín, S. (2004). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section Nigri strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 38: 72-77. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2003.01445.x

Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiological Reviews*, 16. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>

Bennett, J.W. (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics* (Machida M, Gomi K, eds). Caister Academic Press, Norfolk, UK: 1–17.

Bennett, J. W., Klich, M. (2003) Micotossine. *Journal of Clinical Microbiology*. 16:497–516. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003

Bhunjun, C. S., Phukhamsakda, C., Hyde, K.D. et al. (2024). Do all fungi have ancestors with endophytic lifestyles? *Fungal Diversity* 125, 73–98. <https://doi.org/10.1007/s13225-023-00516-5>

Blesa, J., Soriano, J. M., Molto, J. C., Manes, J. (2006). Fattori che influenzano la presenza di ocratossina A nei vini. *Recensioni critiche in Scienza dell'alimentazione e nutrizione*. DOI: 10.1080/10408390500215803

Brera, C., Debegnach, F., Minardi, V., Prantera, E., Pannunzi, E., Faleo, S., et al. (2008). Contaminazione da ocratossina A in campioni di vino italiano e valutazione dell'esposizione nella popolazione italiana. *Giornale di chimica agricola e alimentare*. 56:10611-10618 DOI: 10.1021/jf8016282

Brown, A. L., Odell, E. W. and Mantle, P. G. (2007). DNA ploidy distribution in renal tumors induced in male rats by dietary ochratoxin A. *Experimental and Toxicologic Pathology* 59: 85-95. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.05.001>

Bustin, S. A., Beaulieu, J. F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S. B., Olsvik, P. A., Penning, L. C., & Toegel, S. (2010). MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments (pp. 1–5). *BioMed Central*. DOI: 10.1186/1471-2199-11-74

Butinar, L., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N. (2011). Hypersaline waters – a potential source of foodborne toxigenic *Aspergilli* and *Penicillia*. *FEMS Microbiology Ecology* 77: 186–199. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01108.x>

Cervantes-Chávez, J. A., Valdés-Santiago, L., Bakkeren, G., Hurtado-Santiago, E., León-Ramírez, C. G., Esquivel-Naranjo, E. U., Landeros-Jaime, F., Rodríguez-Aza, Y., Ruiz-Herrera, J. (2016). Trehalose is required for stress resistance and virulence of the Basidiomycota plant pathogen *Ustilago maydis*. *Microbiology (Reading)*. 162(6):1009-1022. DOI: 10.1099/mic.0.000287.

Chen, J., Wen, J., Tang, Y., Shi, J., Mu, G., Yan, R., Cai, J., Long, M. (2021). Progressi della ricerca sulla contaminazione e la tossicità della fumonisina B1: una revisione. *Molecole*. 26(17):5238. DOI: 10.3390/molecules26175238

Commissione europea. Regolamento (CE) n. 195/2023 della Commissione, del 25 aprile 2023, concernente i tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti e che abroga il regolamento (CE) n. 1881/2006. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L. 2023; 119:103-157.

Dachery, B., Veras, F. F., Magro, L. D., Manfroi, V., Welke, J. E. (2017). Valutazione del rischio di esposizione all'ocratossina A attraverso il consumo di succo e vino, considerando l'effetto del tempo di estrazione a vapore e delle fasi di vinificazione. *Tossicologia alimentare e chimica*. 09:237-244. DOI: 10.1016/j.fct.2017.09.013

Deepak, S. A., Kottapalli, K. R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K. S., Iwahashi, H., Masuo, Y., & Agrawal, G. K. (2007). Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current Genomics*, 8(4), 234–251. DOI: 10.2174/138920207781386960

Doyle, J. (1991). Protocolli DNA per le piante. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., Young, J.P.W. (a cura di) *Tecniche molecolari in tassonomia*. Serie NATO ASI, vol 57. Springer, Berlino, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18

El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins*, 2(4), 461-493. DOI: 10.3390/toxins2040461

Freire, L., Braga, P. A., Furtado, M. M., Delafiori, J., Dias-Audibert, F. L., Pereira, G. E., et al. (2020). Dall'uva al vino: destino dell'ocratossina A durante il processo di vinificazione in rosso, rosato e bianco e presenza di derivati dell'ocratossina nei prodotti finali. *Controllo degli alimenti*. 113:107167. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107167>

Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., et al. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology* 93: 1–63. DOI: 10.1016/j.simyco.2018.06.001

Gallo, A., Bruno, K. S., Solfrizzo, M., Perrone, G., Mulè, G., Visconti, A. and Baker, S. E. (2012). New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 8208-8218. DOI: 10.1128/AEM.02508-12

Gallo, A., Knox, B. P., Bruno, K. S., Solfrizzo, M., Baker, S. E., Perrone, G. (2014). Identificazione e caratterizzazione della polichetide sintasi coinvolta nella biosintesi dell'ocratossina A in *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology*. 179:10-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.013.

García Cela, E. (2014). Challenges in management of aflatoxins and ochratoxin A in contaminated raw materials. Diss. Universitat de Lleida.

Gil-Serna, J., García-Díaz, M., González-Jaén, M. T., Vázquez, C., Patiño, B. (2018). Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 268, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.028>.

Gil-Serna, J., García-Díaz, M., Vázquez, C., González-Jaén, M. T., & Patiño, B. (2019). Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins. *Food Microbiology*, 82, 240-248. DOI: 10.1016/j.fm.2019.02.013

Gonçalves, A., Palumbo, R., Guimarães, A., Gkrillas, A., Dall'Asta, C., Dorne, J.-L., et al. (2020). La via delle micotossine nella catena alimentare dell'uva. *The international journal of the Mediterranean Phytopathological Union* 71:89-104. DOI:10.36253/phyto-11142

Grazioli, B., Fumi, M. D., Silva, A. (2006). Il ruolo della lavorazione sul contenuto di ocratossina A nel mosto e nel vino italiano: uno studio sull'uva naturalmente contaminata. *International Journal of Food Microbiology* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.045>

Harris, J. P., and Mantle, P. G. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 558, 709 –716. DOI: 10.1016/s0031-9422(01)00316-8

Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., & Pla, M. (2003). Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry*, 323(2), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.07.015>

Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M. et al. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology* 95: 5–169. DOI: 10.1016/j.simyco.2020.05.002

Huff, W. E. and Hamilton, P. B. (1979). Mycotoxins—their biosynthesis in fungi: ochratoxins—metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection* 42: 815-820. DOI: 10.4315/0362-028X-42.10.815

Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101-134. DOI: 10.1016/s0300-483x(01)00471-1

IARC. Alcune sostanze presenti in natura, prodotti alimentari e costituenti, ammine aromatiche eterocicliche e micotossine. In: *Monografie sulla valutazione dei rischi cancerogeni per l'uomo*. Lione, Francia: Organizzazione Mondiale della Sanità; 1993.

Ikuo, S., Motoyuki, S., Takayuki, H., Naoki, T. (2009). The Glutathione System of *Aspergillus nidulans* Involves a Fungus-specific Glutathione S-Transferase*, *Journal of Biological Chemistry*, 284,12. DOI: 10.1074/jbc.M807771200

Jaime-Garcia, R., Cotty, P. J. (2010). Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.06.025>

Jiang, W., Fu, F. L., Zhang, SZ. et al. (2010). Clonaggio e caratterizzazione del gene funzionale della trealosio-6-fosfato sintasi nel mais. *Journal of Plant Biology*. 53, 134–141. <https://doi.org/10.1007/s12374-010-9098-7>

Kamle, M., Mahato, D. K., Devi, S., Lee, K. E., Kang, S. G., Kumar, P. (2019). Fumonisine: Impatto sull'agricoltura, l'alimentazione e la salute umana e le loro strategie di gestione. *Tossine (Basilea)*. 11(6):328. DOI: 10.3390/tossine11060328

Kitagaki, H., Kitamoto, K. (2013). Breeding research on sake yeasts in Japan: History, recent technological advances, and future perspectives. *Annual Review of Food Science and Technology* 4: 215–235. DOI: 10.1146/annurev-food-030212-182545

La Placa, L., Tsitsigiannis, D., Camardo Leggieri, M., Battilani, P. (2023) Dall'uva al vino: Impatto del processo di vinificazione sulla contaminazione da ocratossina A. *Cibo*. DOI: 10.3390/foods12020260

Landi, L., Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2014). Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3047–3056. DOI: 10.1021/jf404423x

Landi, L., Murolo, S., & Romanazzi, G. (2019). Detection of ‘Candidatus Phytoplasma solani’ in roots from Bois noir symptomatic and recovered grapevines. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38135-9>.

Lasram, S., Mani, A., Zaied, C., Chebil, S., Abid, S., Bacha, H., et al. (2008). Evoluzione del contenuto di ocratossina A durante la vinificazione in rosso e rosato. *Giornale di Scienza dell'Alimentazione e dell'Agricoltura*. 88:1696-1703. DOI: 10.1002/JSFA.3266

Liew, W. P. P., & Mohd-Redzwan, S. (2018). Mycotoxin: its impact on gut health and microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 60. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00060

Liu, T., Zhu, L., Zhang, Z. et al. (2017). Protective role of trehalose during radiation and heavy metal stress in *Aureobasidium subglaciale* F134. Scientific Report, 7, 17586. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15489-0>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. Methods, 25(4), 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262

Loi, M., Villani, A., Paciolla, F., Mulè, G., Paciolla, C. (2021). Challenges and Opportunities of Light-Emitting Diode (LED) as Key to Modulate Antioxidant Compounds in Plants. A Review. Antioxidants 10:42. doi: 10.3390/antiox10010042

MacKenzie, D.A., Guillemette, T., Al-Sheikh, H. et al. (2005). Geni indotti dallo stress del ditiotreitolo indipendenti dall'UPR in *Aspergillus niger* Molecular Genetics and Genomics. 274, 410–418. DOI: 10.1007/s00438-005-0034-3

Magzoub, R. A. M., Yassin, A. A. A., Abdel-Rahim, A. M., Gubartallah, E. A., Miskam, M., Saad, B., et al. (2019). Photocatalytic detoxification of aflatoxins in Sudanese peanut oil using immobilized titanium dioxide. Food Control 95, 206–214. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.08.00

Martínez Culebras, P. V., Crespo-Sempere, A., Gil, J. V., Ramón, D. (2009). Domini aciltransferasi dei geni putativi della polichetide sintasi (PKS) nei produttori di *Aspergillus* e *Penicillium* di ocratossina A e valutazione dei primer PCR per amplificare le sequenze PKS nelle specie di *Aspergillus* nero. Scienze e tecnologie alimentari internazionali. 15(1):97-105. <https://doi.org/10.1177/1082013208102743>

Mitchell, D., Aldred, D. and Magan, N. (2003). Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. Aspects of Applied Biology 68: 109–116.

Molina-Hernandez, J. B., Landi, L., De Flaviis, R., Laika, J., Romanazzi, G., Chaves-Lopez, C. (2023). Understanding the mechanisms of action of atmospheric cold plasma towards the mitigation of the stress induced in molds: the case of *Aspergillus chevalieri*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 90, 103492. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103492>

Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., & Bryant, C. M. (2006). Food mycotoxins: an update. *Journal of food science*, 71(5), R51-R65. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750>

Murugesan, P., Brunda, D. K., Moses, J. A., Anandharamakrishnan, C. (2021). Photolytic and photocatalytic detoxification of mycotoxins in foods. *Food Control* 123:107748. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107748

OIV report 2019

OIV report 2022

OIV report 2023

Palma, N., Cinelli, S., Sapora, O., Wilson, S. H. and Dogliotti, E. (2007). Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. *Chemical research in toxicology* 20: 1031-1037. DOI: 10.1021/tx700027j

Perrone, G., Gallo, A. (2017). *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. *Methods in Molecular Biology* 1542: 33–49. DOI: 10.1007/978-1-4939-6707-0_3

Perrone, G., Gallo, A., Susca, A., et al. (2008). *Aspergillus* in grapes: ecology, biodiversity and genomics. In: *Aspergillus* in the genomic era (Varga J, Samson RA, eds). Wageningen Academic Publishers, Wageningen: 179–212. DOI: 10.3920/9789086866359_009

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., et al. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 59: 53–66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>

Quintela, S., Villaran, M. C., López De Armentia, I., Elejalde, E. (2013). Ocratossina A rimozione nel vino: una recensione. *Controllo degli alimenti*. DOI: 10.1080/19440049.2012.682166

Rifna, E. J., Ramanan, K. R., Mahendran, R. (2019). Emerging technology applications for improving seed germination. *Trends in Food Science & Technology* 86, 95–108. doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.029

Rossiello, M. R., Rotunno, C., Coluccia, A., Carratù, M. R., Di Santo, A., Evangelista, V., Semeraro, N. and Colucci, M. (2008). Ochratoxin A inhibits the production of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 by human blood mononuclear cells: Another potential mechanism of immune-suppression. *Toxicology and applied pharmacology* 229: 227-231. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.004>

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbaken, J. et al. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78: 141–173. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004

Saori, A., Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 49: 107–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>

Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R. and Sanchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology* 27: 82-92. DOI: 10.1016/j.neuro.2005.07.004

Shen, M. H., Singh, R. K. (2021). Effect of rotating peanuts on aflatoxin detoxification by ultraviolet C light and irradiation uniformity evaluated by AgCl-based dosimeter. *Food Control* 120:107533. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107533

Somma, S., Perrone, G. and Logrieco, A. F. (2012). Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopathologia Mediterranea*: 131-147. DOI:10.14601/Phytopathol_Mediterr-9888

Song, C., Yang, J., Wang, Y., Ding, G., Guo, L., Qin, J. (2022). Mechanisms and transformed products of aflatoxin B1 degradation under multiple treatments: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1–13. doi: 10.1080/10408398.2022.2121910

Sun S., Zhao R., Xie Y., Liu Y. (2019). Photocatalytic degradation of aflatoxin B1 by activated carbon supported TiO2 catalyst. *Food Control* 100, 183–188. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.01.014

Susca, A., Proctor, R. H., Mulè, G., Stea, G., Ritieni, A., Logrieco, A., et al. (2010). Correlazione tra la produzione di micotossine fumonisine B2 e la presenza del gene biosintetico fum8 nella *Aspergillus niger* dell'uva. *Giornale di chimica agricola e alimentare*. 58(16):9266-9272 <https://doi.org/10.1021/jf101591x>

Susca, A., Proctor, R. H., Morelli, M., Haidukowski, M., Gallo, A., Logrieco, A. F., & Moretti, A. (2016). Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1412. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01412

Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Magan, N. (2018). *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science* 23: 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>

Testempasis, S. I., Papazlatani, C. V., Theocharis, S., Karas, P. A., Koundouras, S., Karpouzas, D. G. and Karaoglanidis, G. S. (2023). Vineyard practices reduce the incidence of *Aspergillus* spp. and alter the composition of carposphere microbiome in grapes (*Vitis vinifera* L.). *Frontiers in Microbiology*. 14:1257644. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1257644

Tozlovanu, M., Faucet-Marquis, V., Pfohl-Leszkwicz, A. and Manderville, R. A. (2006). Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: structure-activity relationships for covalent DNA adduction. *Chemical Research in Toxicology* 19: 1241-1247. DOI: 10.1021/tx060138g

Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J. and Sanchis, V. (2005). Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in Applied Microbiology* 41: 196-201. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01705

Varga, J., Kocsubé, S., Péteri, Z., Vágvölgyi, C., & Tóth, B. (2010). Chemical, physical and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. *Toxins*, 2(7), 1718-1750. DOI: 10.3390/toxins2071718

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., et al. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78: 343-371. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.09.001

Visagie, C. M., Yilmaz, N., Kocsubé, S., et al. (2024). A review of recently introduced *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and other Eurotiales species. *Studies in Mycology* 107: 1–66. DOI: 10.3114/sim.2024.107.01

Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G. and Solfrizzo, M. (2008). Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives and Contaminants* 25: 193-202. DOI: 10.1080/02652030701744546

Wangsanut, T., Pongpom, M. (2022). The Role of the Glutathione System in Stress Adaptation, Morphogenesis and Virulence of Pathogenic Fungi. *International Journal of Molecular Sciences* 13;23(18):10645. DOI: 10.3390/ijms231810645.

Welke, J. E., Hoeltz, M., Noll, I. B. (2009). Aspetti legati alla presenza di funghi tossigeni nell'uva e ocratossina A nei vini. *Ciência Rural*. 39:2567-2575.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535. DOI: 10.1093/nar/18.22.6531

Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144. DOI: 10.1016/j.jscs.2010.06.006

Zhu, L., Zhang, B., Dai, Y., Li, H., & Xu, W. (2017). A review: epigenetic mechanism in ochratoxin a toxicity studies. *Toxins*, 9(4), 113. DOI: 10.3390/toxins9040113

Zimmerli, B., Dick, R. (1996). Ocratossina A nel vino da tavola e nel succo d'uva: insorgenza e valutazione del rischio. *Additivi alimentari e contaminanti*. 13:655-668

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12), e103–e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh101>