

PIF - Gestione Integrata del Rischio Aflatossine

Controllo biologico dell'infezione da isolati di *Aspergillus flavus* tossigeni e della contaminazione da aflatossine in mais trattato con il prodotto AF-X1: secondo anno di prove di campo

Susanna Pecchia

*Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari e Agro-ambientali
Università di Pisa*

CAPANNORI (LU) – 08 Giugno 2018



RIDUZIONE DEL RISCHIO AFLATOSSINE IN CAMPO



P.I.F. - G.I.R.A. Gestione Integrata Rischio Aflatossine

*Partner A19.1
DiSAAAa - Università di Pisa
Gruppo di Patologia Vegetale*

**REGIONE
TOSCANA**



Obiettivo 1.

Sviluppo di protocolli di Gestione del Rischio Fitosanitario basati su metodi a basso impatto ambientale compatibili con i sistemi di agricoltura biologica ed integrata.

Azione 2.

Riduzione del rischio aflatossine in campo, basati sull'impiego di un ceppo non tossigeno di *A. flavus* (AFX1) e sull'impiego di acqua elettrolizzata (EW).

Attività di campo
Attività di laboratorio

LA PROBLEMATICHE DELLE AFLATOSSINE

Aspergillus **FLA***vus* **TOSSINA**

Funghi filamentosi del genere *Aspergillus* sono ubiquitari, si ritrovano su molte colture di interesse agrario dove in determinate condizioni ambientali producono differenti micotossine, tra cui l'AFB1 che esplica un'azione genotossica e epatocancerogena nell'uomo e negli animali superiori

Pertanto per contenere i livelli di contaminazione si adotta un approccio «olistico» cioè azioni di prevenzione e contenimento lungo tutta la filiera produttiva

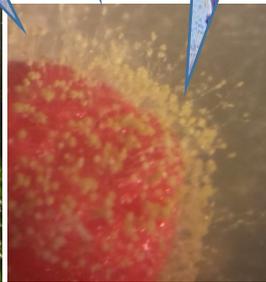
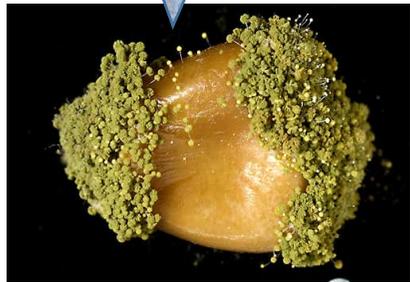
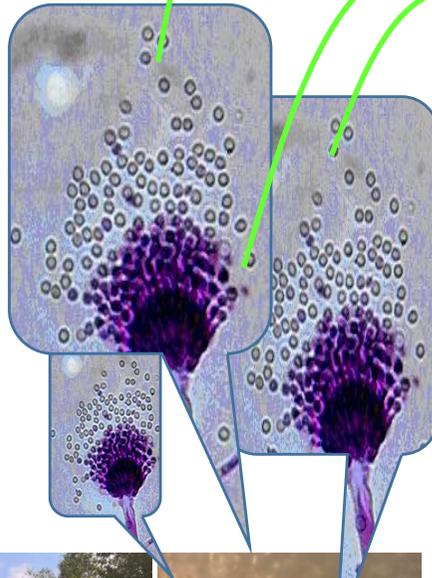
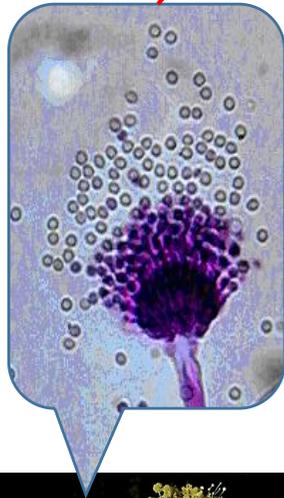
Impiego di ceppi non tossigeni di *A. flavus* come **competitori intraspecifici** per i siti di infezione e per i nutrienti, sembra dare ottimi risultati nei paesi in cui questo tipo di lotta si è diffusa (USA).

Ciclo biologico di
Aspergillus flavus
e meccanismo d'azione del
prodotto biologico **AF-X1**

3. DIFFUSIONE – vento e insetti

Wilt toxigen *A. flavus*

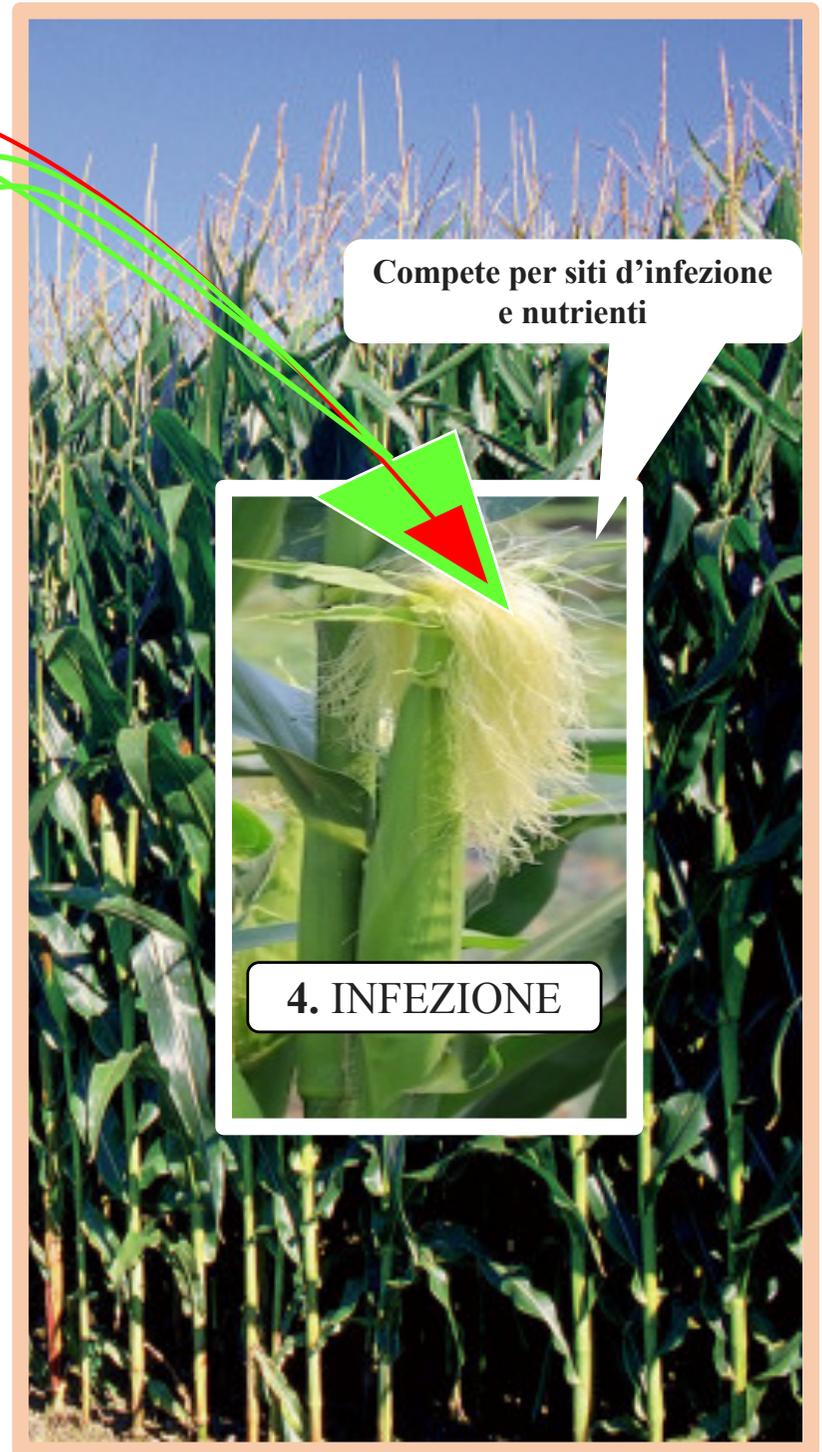
A. flavus AFX1



2. SPORULAZIONE – condizioni climatiche favorevoli



1. SVERNA – Micelio e/o sclerozi



Compete per siti d'infezione e nutrienti

4. INFEZIONE

Obiettivo 1 - *Azione 2*

Attività di campo

Identificazione dei campi controllo e trattato

Individuazione punti di campionamento

Campionamento terreno

- Pre-distribuzione AFX1
- Post-distribuzione AFX1

Campionamento granella

Attività di laboratorio

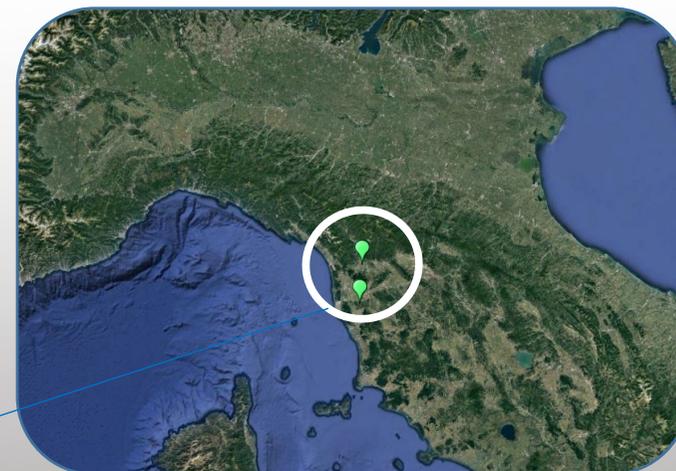
Analisi sulla granella

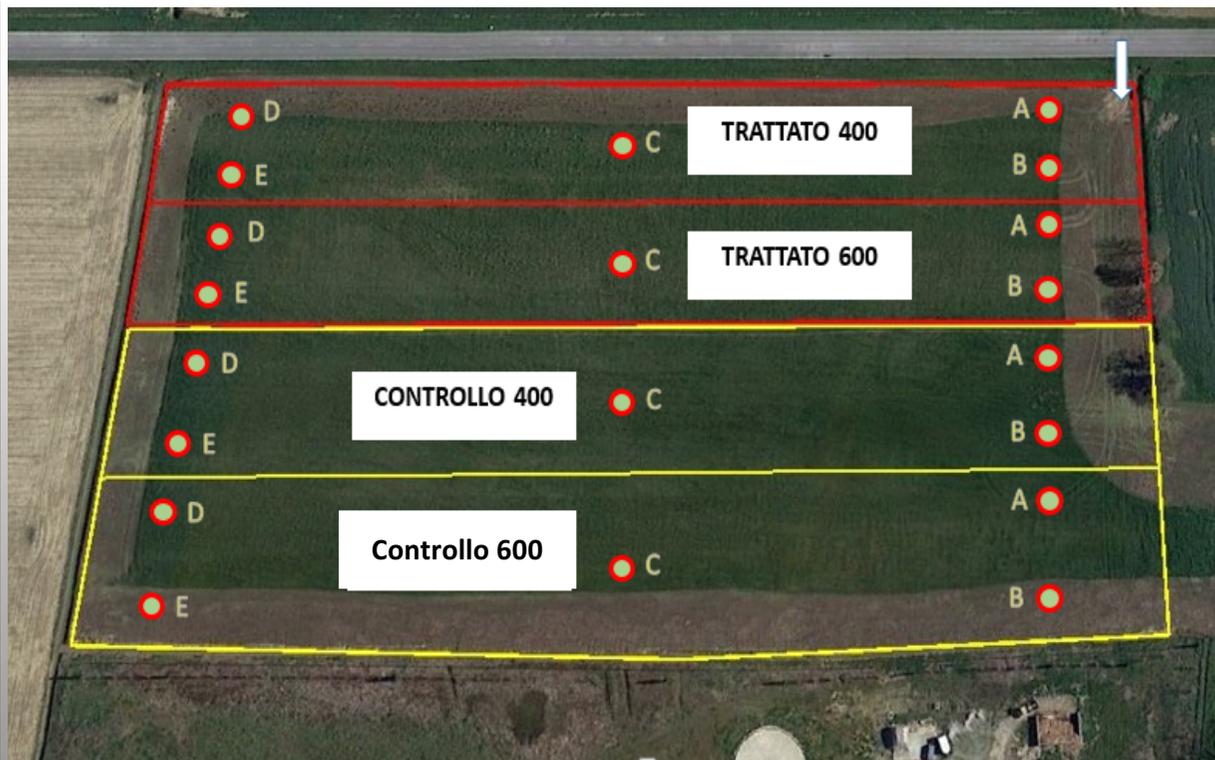
Analisi sul terreno

INQUADRAMENTO GEOGRAFICO

delle aree destinate alla sperimentazione

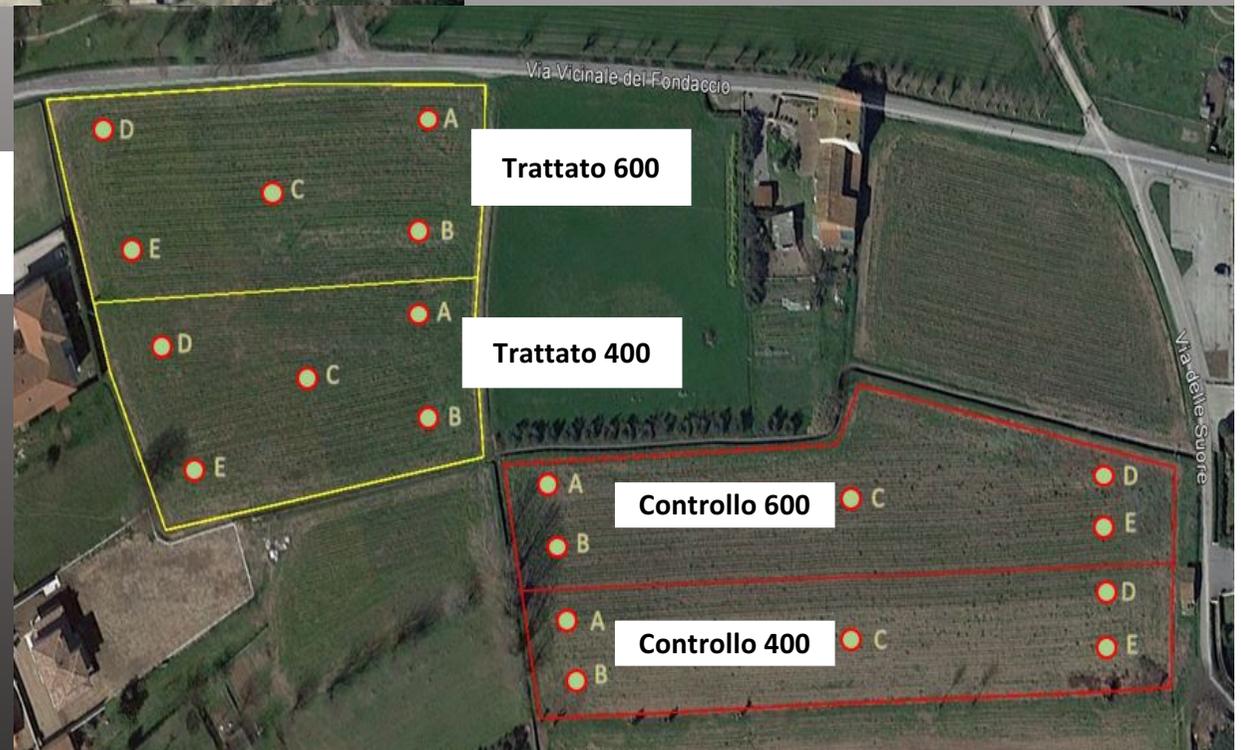
COMUNI:
Fauglia (PI)
Capannori (LU)





FAUGLIA (PI) Azienda Martello
Via dei Puntoni

CAPANNORI (LU) Azienda Cassettari
C.da Lammari, Via Lombarda



LE FASI DI CAMPIONAMENTO DEL TERRENO



1

**Pre-trattamento
(prima della levata)**



AF-X1

**Inizio della
levata**



2

**Post-trattamento
(fioritura piena)**

AF-X1
2017

GRANULARE 12,5 Kg e



Distribuzione di AF-X1 a base di
Aspergillus flavus ceppo MUCL54911
(25kg/ha-inizio fase di levata)

LA FASE DI CAMPIONAMENTO DELLA GRANELLA



È stato prelevato 1kg di granella nel punto di campionamento
Fase fenologica → MATURAZIONE COMMERCIALE
(campione d'analisi ufficiale)

Obiettivo 1 - *Azione 2*

Attività di campo

Identificazione dei campi controllo e trattato

Individuazione punti di campionamento

Campionamento terreno

- Pre-distribuzione AFX1
- Post-distribuzione AFX1

Campionamento granella

Attività di laboratorio

Analisi sulla granella

Analisi sul terreno

ANALISI DI LABORATORIO

Valutare la presenza di ceppi tossigeni e non tossigeni di *A. flavus* dopo il trattamento con AF-X1.

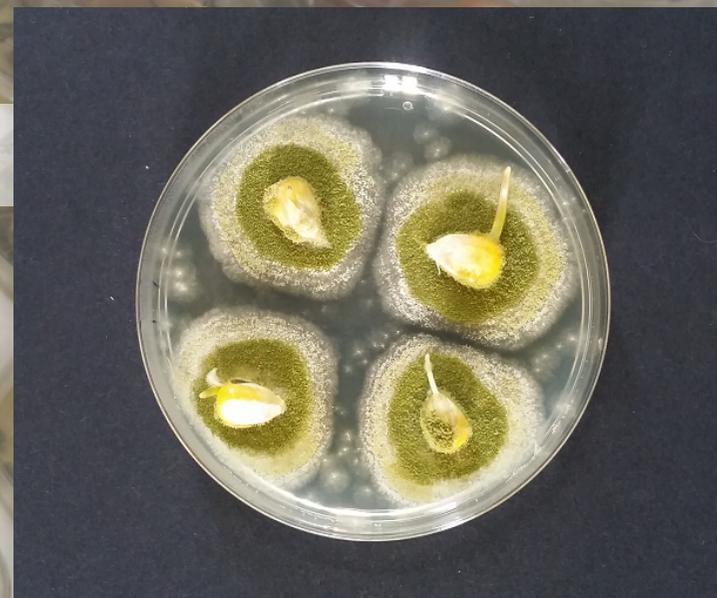
GRANELLA

- 1) Valutazione della micoflora presente all'interno del seme.
- 2) Identificazione di tutte le colonie a livello di genere e quelle di *Aspergillus flavus*

ANALISI SULLA GRANELLA

1. Ricerca micoflora interna al seme

- Il riconoscimento (*Individuazione del gruppo flavi*) si basa sulla colore delle colonie in piena sporulazione.
A. flavus → verde brillante



2. Individuazione del gruppo Flavi

- Gli isolati appartenenti al gruppo Flavi presentano il retro della colonia di colore arancio.

ANALISI SULLA GRANELLA

3. Identificazione di *A. flavus*

- Osservando l'aspetto della colonia su CZ è possibile discriminare tra *A. flavi* e *A. parasiticus*



4. Identificazione di *A. flavus* tossigeni e non tossigeni

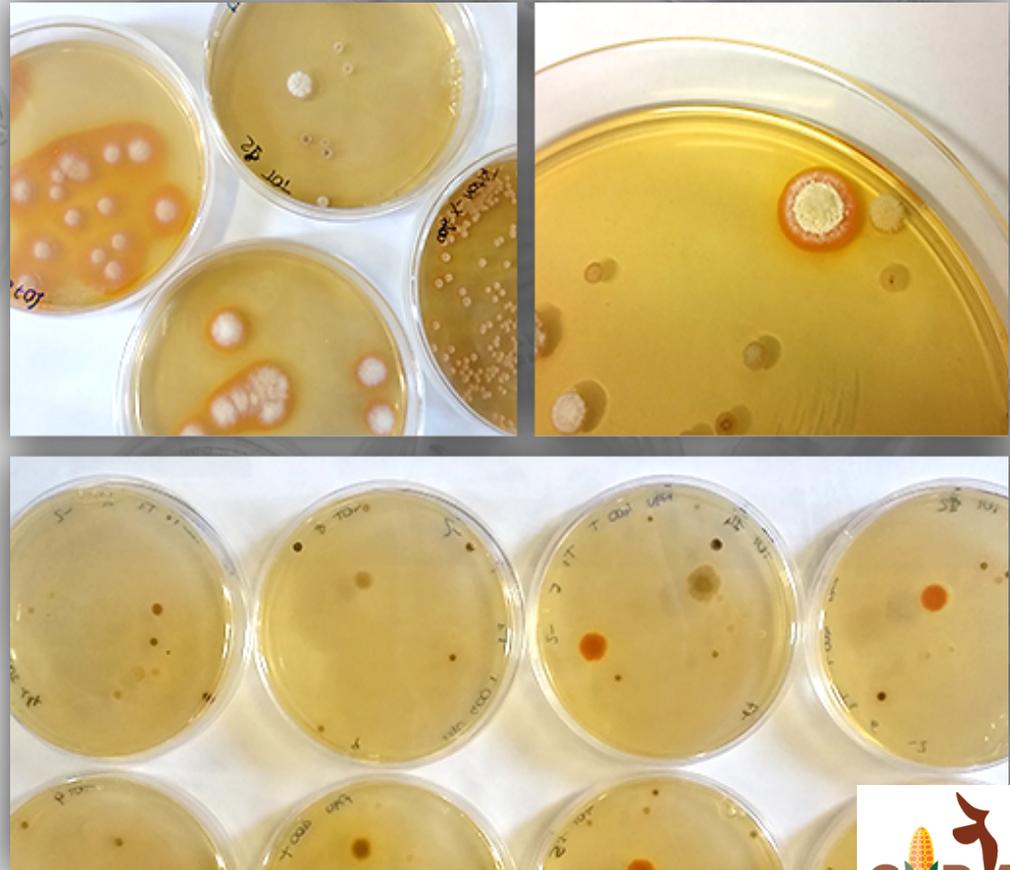
- Gli isolati **tossigeni** vengono identificati mediante il saggio con i vapori di ammoniaca e con un mezzo a base di crema di cocco



ANALISI SUL TERRENO

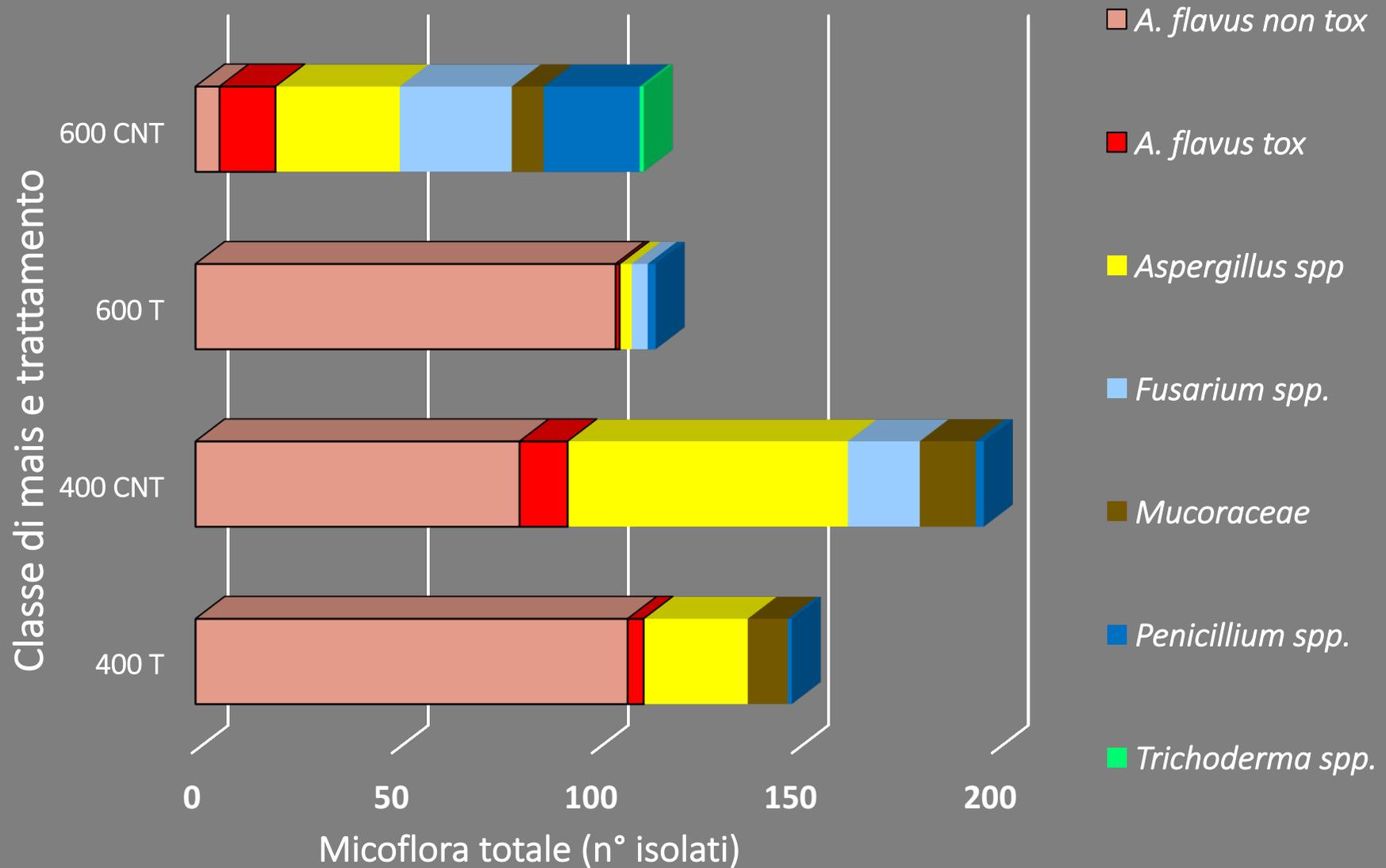
- Ogni sub-campione è stato: **essiccato**, **omogeneizzato** e **sospeso** in acqua per effettuare diluizioni seriali che hanno consentito il rilevamento e l'isolamento dei ceppi di *A. flavus* attraverso un mezzo semiselettivo

AFPA (mezzo semiselettivo)
+
Triton X100 (restrittore di colonia)



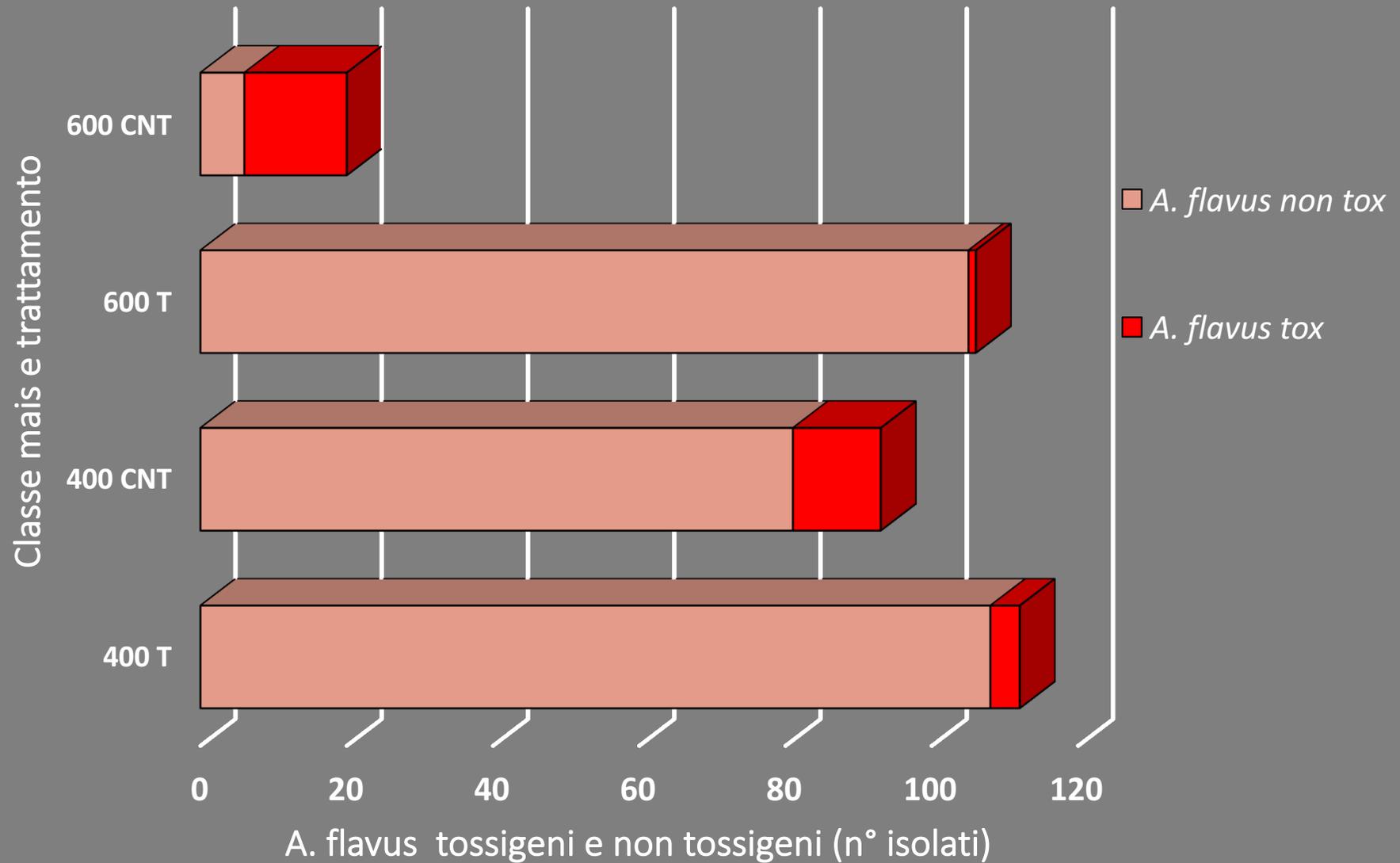
RISULTATI GRANELLA

Località Fauglia (PI) - 2017



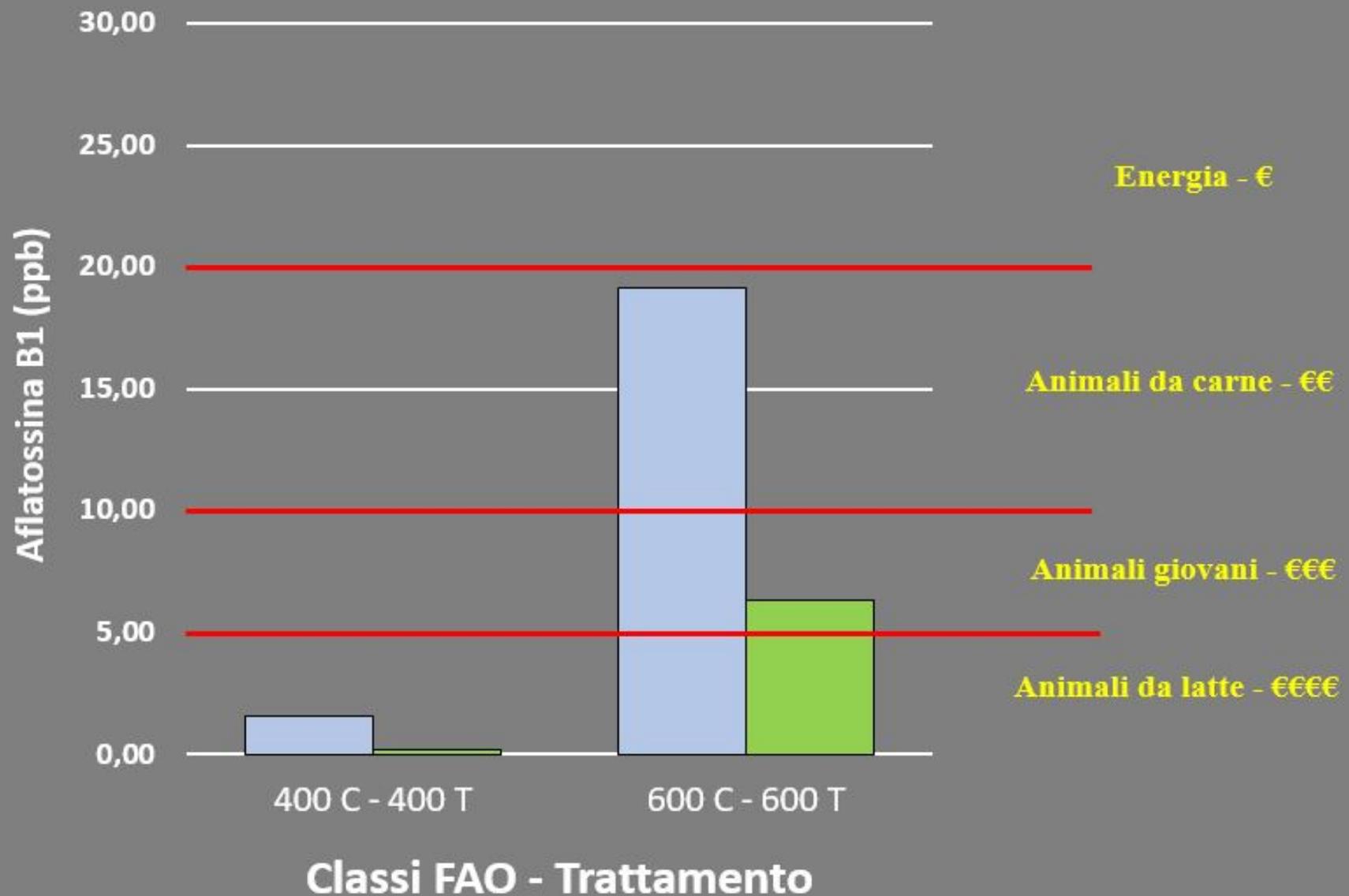
RISULTATI GRANELLA

Località Fauglia (PI) - 2017

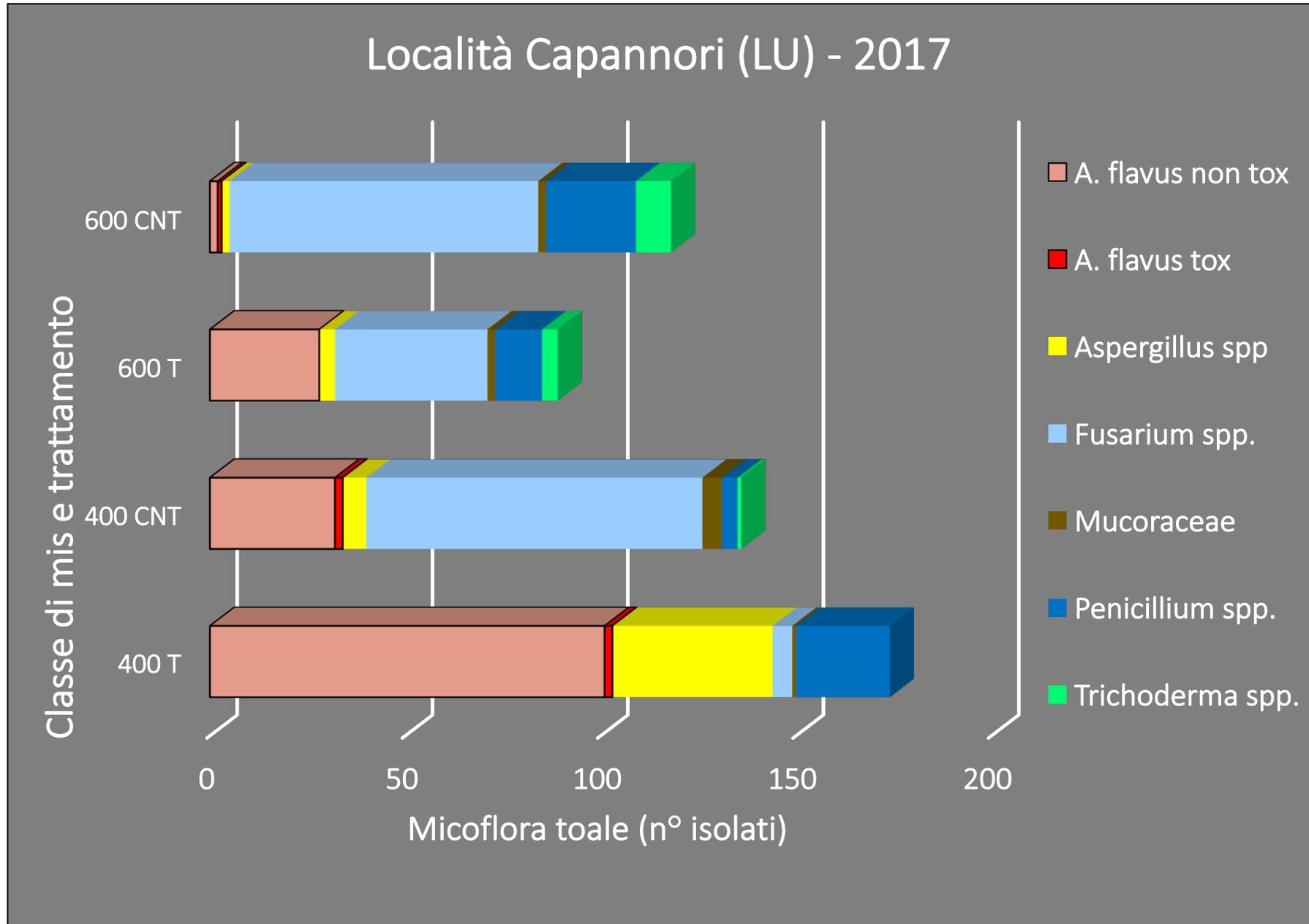


AFLATOSSINE FAUGLIA

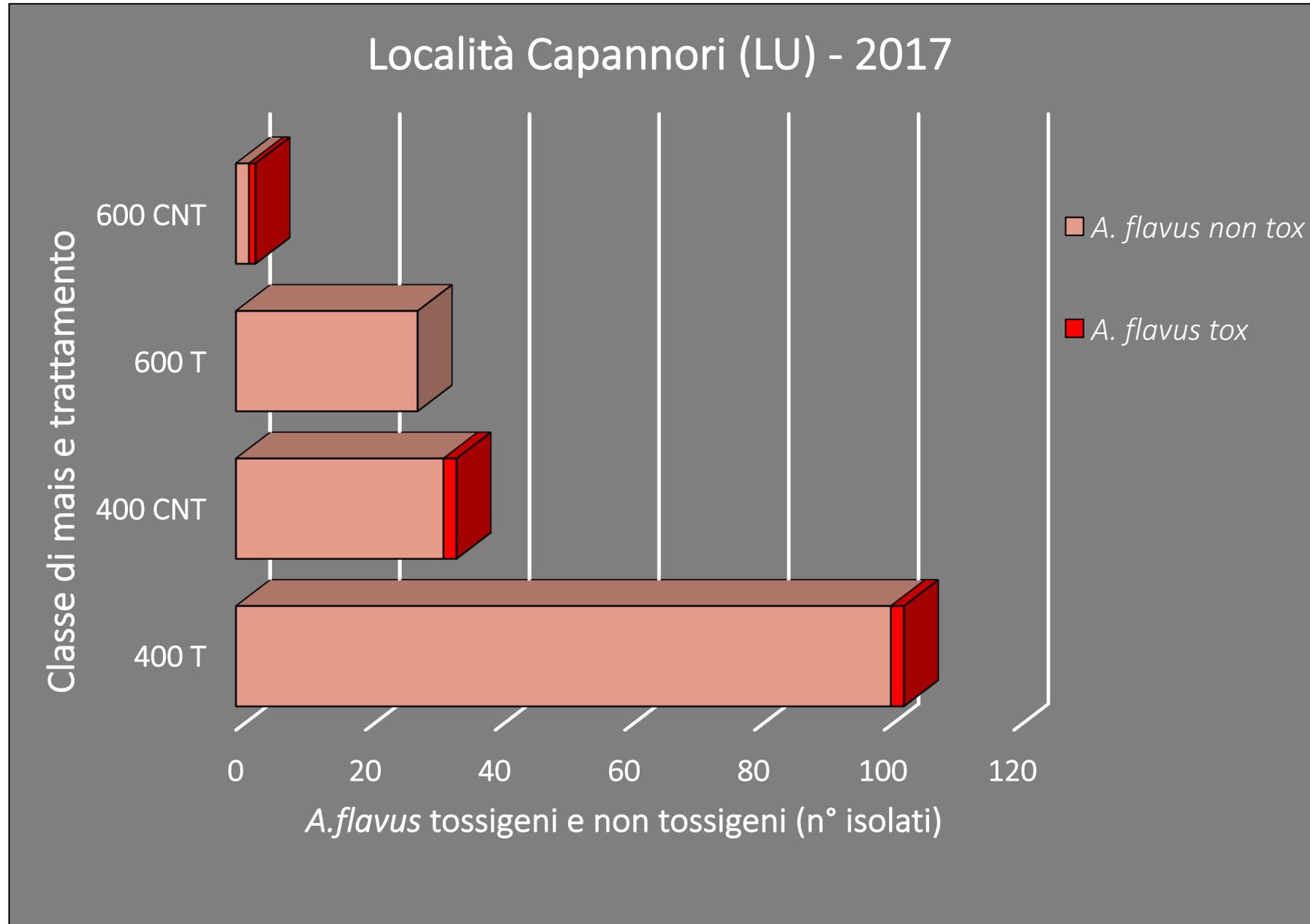
Aflatossina B1 - Fauglia 2017



RISULTATI GRANELLA

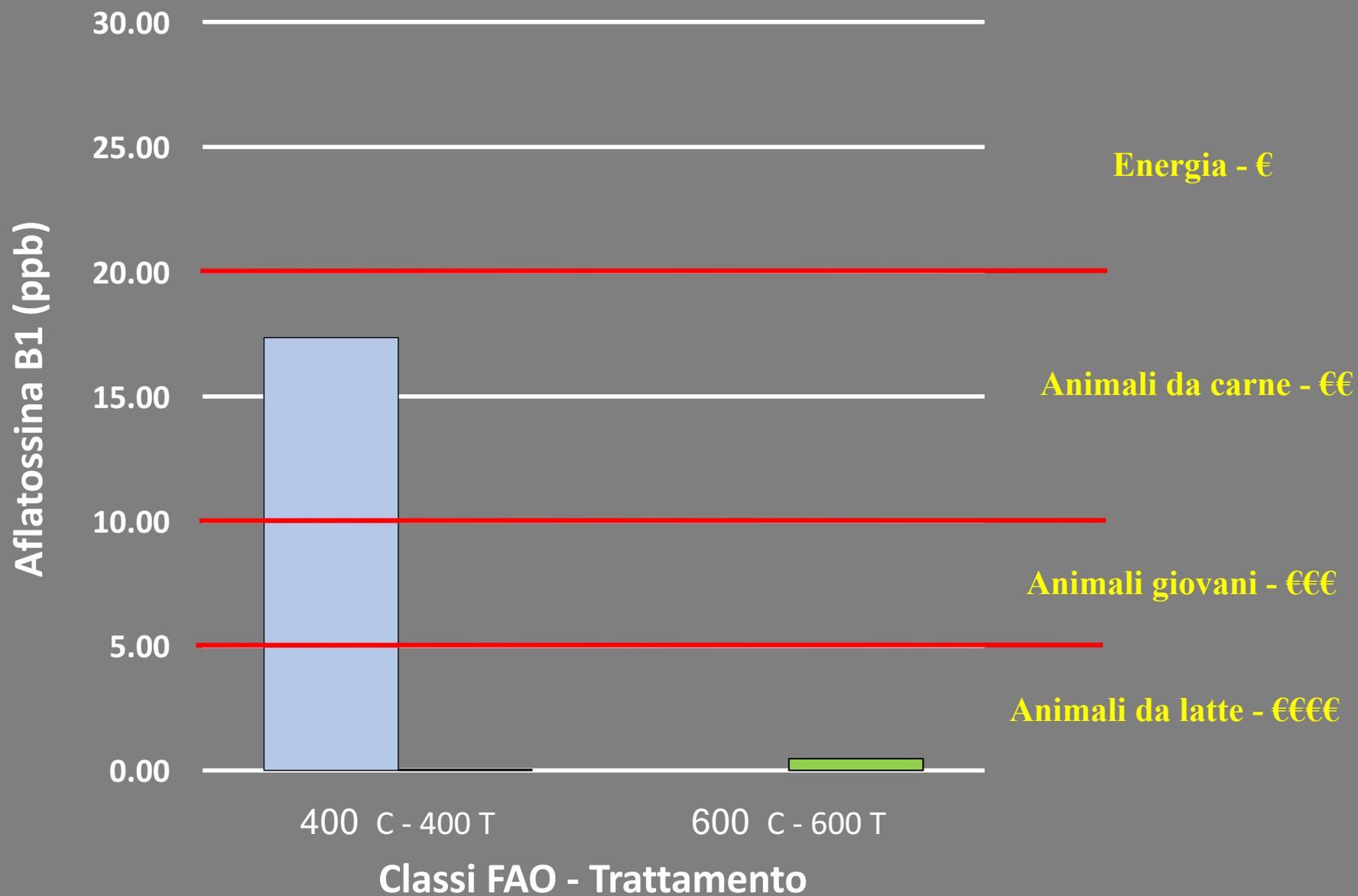


RISULTATI GRANELLA



AFLATOSSINE CAPANNORI

Aflatossina B1 - Capannori 2017



LE AFLATOSSINE

Comune	FAO	Tesi	Media dei 5 punti di campionamento				Totale (ppb)
			G2	G1	B2	B1	

Fauglia	400	Controllo	0,04	0,52	0,15	1,56	2,27
Fauglia	400	Trattato	0,00	0,00	0,00	0,19	0,19
Fauglia	600	Controllo	0,31	2,04	2,24	19,11	23,70
Fauglia	600	Trattato	0,00	0,00	0,62	6,35	6,97

Capannori	400	Controllo	3,27	26,68	1,71	17,35	49,01
Capannori	400	Trattato	0,00	0,00	0,00	0,05	0,05
Capannori	600	Controllo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Capannori	600	Trattato	0,25	1,11	0,14	0,47	1,97

REGOLAMENTO (UE) N. 574/2011 DELLA COMMISSIONE del 16 giugno 2011

Considerazioni conclusive

L'analisi dei dati di Fauglia e Capannori ha evidenziato che la diminuzione di *A. flavus* tossigeni è correlata al trattamento con AF-X1. La percentuali di *A. flavus* non tossigeni è significativamente più elevata nelle tesi trattate **31,5-91,3%** rispetto alle tesi non trattate **1,7-41%**.

Il rapporto isolati tossigeni/isolati non tossigeni è risultato essere **79** nelle tesi trattate e **6** nelle tesi non trattate

L'analisi delle aflatossine sulla produzione 2017 effettuata dal gruppo di zootecnia ha evidenziato che il controllo biologico con il prodotto AF-X1 ha ridotto considerevolmente la quantità di AFB₁ con percentuali che variano da **67,7** a **99,7%**. Il valore medio della concentrazione di AFB₁ nelle tesi trattate è **1,8 ppb** mentre nelle tesi non trattate è risultato di **9,5 ppb**

I dati ottenuti dall'analisi della granella nelle zone maidicole oggetto della sperimentazione hanno fornito importanti informazioni riguardo la dinamica di popolazione di *A. flavus* tossigeni e non tossigeni su mais.

LA PRODUZIONE SCIENTIFICA

TOXIGENIC AND NONTOXIGENIC *ASPERGILLUS FLAVUS* ISOLATES IN MAIZE FIELDS TREATED WITH THE BIOLOGICAL PRODUCT AF-X1: SOIL AND GRAIN COLONIZATION.

S. Pecchia¹, L. De Martino¹, R. Bosco¹, G. Puntoni¹, G. Ragaglini², C. Tozzini², G. Vannacci¹

¹Università di Pisa, DISAAA-a, Via del Borghetto 80 - 56124 Pisa, Italy. ²Institute of Life Sciences, Scuola Superiore S. Anna, Via Santa Cecilia 3 - 56127 Pisa,, Italy.

XXXIII National Meeting Italian Society for Plant Pathology – SIPaV - Piacenza, 4-6 ottobre 2017

REDUCTION OF MYCOTOXIGENIC *ASPERGILLUS FLAVUS* INFECTION AND AFLATOXIN CONTAMINATION IN MAIZE TREATED WITH THE BIOLOGICAL PRODUCT AF-X1: SECOND YEAR OF FIELD TRIALS

S. Pecchia¹, L. De Martino¹, A. Civello¹, G. Puntoni¹, A. Serra¹, E. Bulleri¹, G. Ragaglini², C. Tozzini², G. Vannacci¹

¹Università di Pisa, DISAAA-a, Via del Borghetto 80 - 56124 Pisa, Italy. ²Institute of Life Sciences, Scuola Superiore S. Anna, Via Santa Cecilia 3 - 56127 Pisa, Italy.

XXXIV National Meeting Italian Society for Plant Pathology – SIPaV - Ancona, 5-7 settembre 2018

Tesi di Laurea Magistrale in Biosicurezza e Qualità degli Alimenti - Indagini sulla presenza di isolati tossigeni e non tossigeni di *Aspergillus flavus* in colture di mais trattate con il prodotto biologico AFX1 (2017)

Candidato: Roberta Bosco **Relatore:** Dott.ssa Susanna Pecchia

Tesi di Laurea Magistrale in Biotecnologie Vegetali e Microbiche - Diversity of *Aspergillus flavus* isolates from corn and soil in three different Tuscany areas treated with the biological product AF-X1 (2018)

Candidato: Roberta Colancecco **Relatore:** Dott.ssa Susanna Pecchia



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Aspergillus flavus Group

Giovanni Vannacci

Susanna Pecchia

Sabrina Sarrocco

Grazia Puntoni

Luigi De Martino

Roberta Bosco

Roberta Colancecco

Alessandra Civello

Daniele Da Lio

Benedetta Caggiano

