

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

**Ecologia microbica e resistenza indotta ad agenti
fitopatogeni**

Ciclo XXI

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: AGR12

TITOLO TESI

**Induzione di resistenza agli agenti della fusariosi del
frumento attraverso applicazioni di elicitori chimici**

Presentata da: Dott. Stefano Tonti

Coordinatore Dottorato

Prof. Paolo Bertolini

Relatore

Dott.ssa Annamaria Pisi

Esame finale anno 2008

Abstract:	5
INTRODUZIONE	6
La coltivazione del frumento duro.....	8
La fusariosi della spiga.....	9
Diffusione nel mondo	9
I sintomi.....	10
Gli agenti causali	11
Fonti di inoculo.....	12
Processo infettivo ed epidemiologia.....	14
Fusarium graminearum complex	15
Micotossine.....	16
Tricoteceni.....	18
Zearalenoni	19
Biosintesi dei tricoteceni	19
Tossicologia e produzione di micotossine.....	21
Lotta.....	21
Cultivars resistenti	21
Controllo chimico	22
Biocontrollo.....	24
Resistenza sistemica acquisita (SAR)	25
PAPER I	28
ANALISI DELLA POPOLAZIONE AUTOCTONA DEI PRINCIPALI AGENTI DI FUSARIOSI DELLA SPIGA SU FRUMENTO DURO	
Premessa	30
Materiali e Metodi	31
Isolamento di Fusarium da spighe affette da FDS.....	31
Identificazione delle colonie fungine	32
Determinazione del chemiotipo nella popolazione di <i>F. graminearum</i> e <i>F. culmorum</i> ...	33
Risultati.....	35
Caratteristiche morfologiche	35
Determinazione molecolare della specie	37
Popolazione dei Fusaria presente in spighe affette da FDS	37
Caratterizzazione dei chemiotipi	42
Discussione.....	42
PAPER 2.....	43
VARIABILITÀ GENETICA DI <i>F. GRAMINEARUM</i> IN AREALI COLTIVATI A FRUMENTO DURO IN EMILIA ROMAGNA	
Premessa	45
Materiali e Metodi	46
Origine degli isolati	46
Sequence Characterized Amplified Region (SCAR).....	46
Clonaggio dei prodotti di PCR	47
Analisi filogenetica.....	50
RAPD	50
Risultati.....	51
SCAR.....	51
RAPD	54
Discussione.....	56
PAPER III.....	59

UTILIZZO DI INDUTTORI CHIMICI PER RIDURRE
LA FUSARIOSI DELLA SPIGA IN PIENO CAMPO

Premessa.....	61
Materiali e metodi.....	64
Condizioni sperimentali.....	64
Rilievo fitopatometrico.....	65
Contaminazione delle cariossidi.....	66
Quantificazione assoluta del DNA attraverso Real-Time PCR con SYBR® Green I.....	66
Analisi DON.....	69
Elaborazione dei dati.....	69
Risultati.....	70
Discussione.....	72
PAPER IV.....	76
ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELLA RESISTENZA INDOTTA NEL FRUMENTO DURO CV SIMETO	
Premessa.....	78
Materiali e Metodi.....	79
Allevamento dell'ospite.....	79
Rilievo fitopatometrico.....	83
Contaminazione delle cariossidi.....	83
Risultati.....	83
RT RealTime-PCR.....	83
Rilievo fitopatometrico.....	85
Discussione.....	86
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	88
ALLEGATI.....	103
ALLEGATO PAPER II.....	104
ALLEGATO PAPER III.....	105
FOTO PAPER III.....	109

Abstract:

INTRODUZIONE

La coltivazione del frumento duro

I cereali costituiscono la principale fonte alimentare sia per l'uomo che per gli animali e rappresentano circa i 2/3 del fabbisogno nutrizionale totale. La loro importanza deriva da alcune caratteristiche quali: l'elevato potere calorico, abbondanza in proteine, lipidi, sali minerali e vitamine che li rendono particolarmente adatti all'alimentazione. Forniscono inoltre un prodotto secco, facile da trasportare e conservare, idoneo a costituire delle scorte da utilizzare nello stesso anno della produzione o in anni successivi.

Negli ultimi anni la produzione mondiale di frumento è calata, si è infatti passati da oltre 145 milioni di tonnellate (Mt) nel 2005-2006 a 125 Mt nel 2006-2007 fino ad una ulteriore riduzione a 110 Mt nel 2007-2008. Le cause sono da attribuire alla minore produzione da parte dei paesi grossi esportatori come Australia, Canada e alcuni paesi dell'Est, alle condizioni climatiche sfavorevoli, soprattutto in alcune aree geografiche del mondo, e alla concorrenza delle colture energetiche (mais e grano tenero non destinato all'alimentazione), a cui non segue un aumento delle superfici coltivate.

Il frumento duro (*Triticum durum* Desf.), cereale della famiglia delle *Triticeae*, è un allotetraploide ($2n = 4x = 14$, formula genomica AABB) ad habitat prevalentemente primaverile ed a cariosside vitrea, ben differenziato rispetto al frumento tenero (*Triticum aestivum*, $2n = 6x = 21$, genoma AABBDD) sia per varie caratteristiche morfo-fisiologiche che per areale di adattamento e diffusione.

Le statistiche ufficiali FAO hanno solo la voce "frumento" senza distinzione tra tenero e duro; tuttavia si stima che il duro copra il 9% della superficie totale a frumento. Nel mondo, la coltura del frumento duro è concentrata soprattutto nel Bacino del Mediterraneo (Centro e Sud Europa, Paesi del Nord Africa e dell'Asia occidentale) e nel Nord-America.

In Europa il principale produttore di frumento duro è l'Italia che, nel 2000 ha destinato 1,6 milioni di ettari (Mha) su un totale di 2,3 Mha a frumento, con una produzione di 4,5 Mt (Tab. 1).

I contributi comunitari per ettaro, assai superiori a quelli per il frumento tenero, hanno stimolato l'espansione della coltivazione del frumento duro dalle regioni, dove prima era esclusivamente limitata (Sicilia, Sardegna, Puglia, Basilicata, Lazio e Bassa Toscana), ad altre regioni dell'Italia settentrionale. L'ultima annata agraria ha registrato un aumento delle semine del 35,7% e le superfici coltivate sono aumentate del 20,1%. Le regioni con il maggior incremento produttivo sono state Emilia Romagna (+113%), Sicilia (+56%), Basilicata (+42%), e Toscana (+41%).

La produzione del seme da moltiplicazione è quasi tutta concentrata nelle zone vocate del Sud Italia (Sicilia, Puglia, Marche), mentre le ditte sementiere cerealicole, che conducono programmi di breeding che producono e lavorano la semente certificata del frumento duro, sono localizzate in tutta Italia. Per la semente commerciale di frumento duro vengono richiesti elevati standard dal punto di vista fitosanitario e qualitativo, riassunti nell'indispensabile requisito di elevatissima germinabilità e di omogeneità della semente (fonti ENSE e AIS).

Il futuro della cerealicoltura italiana appare sempre più legato alla capacità di impiegare varietà più produttive, più facilmente coltivabili e con una differenziazione qualitativa delle produzioni, in grado di aumentare la redditività delle colture e di fare migliore uso dei mezzi tecnici e delle risorse disponibili. Il nuovo ideotipo di pianta in grado di massimizzare la produzione quali-quantitative nel prossimo futuro è rappresentato da piante più tolleranti agli stress abiotici, ma soprattutto più resistenti alle malattie.

Tabella 1: Superficie (ha), resa unitaria (t/ha) e produzione totale (t) di frumento duro in Italia dal 2000 al 2008.

Periodo 2000-2008	FRUMENTO			DURO		
	SUPERF. (ha)	RESA (t/ha)	PROD. TOT.(t)	SUPERF. (ha)	RESA (t/ha)	PROD. TOT. (t)
2000	2.321.893	3,28	7.604.783	1.663.116	2,69	4.466.623
2001	2.282.372	2,84	6.509.973	1.664.195	2,23	3.708.291
2002	2.415.316	3,26	7.883.521	1.733.261	2,58	4.472.282
2003	2.266.159	2,80	6.336.758	1.688.834	2,26	3.813.706
2004	2.353.972	3,73	8.777.082	1.772.132	3,20	5.666.222
2005	2.122.896	3,70	7.865.264	1.520.061	3,00	4.567.156
2006	1.925.651	3,79	7.299.510	1.342.897	3,05	4.092.153
2007	2.094.983	3,46	7.245.886	1.436.758	2,79	4.004.151
2008	2.238.832	5,28	9.333.000	1.521.044		5.794955

La fusariosi della spiga

Diffusione nel mondo

La fusariosi della spiga (FDS), chiamata anche Fusarium Head Blight (FHB), è una delle più diffuse e dannose malattie dei cereali. Colpisce numerose graminacee coltivate e spontanee (frumento tenero, frumento duro, orzo, segale, avena, triticale, riso, mais, ecc.), ed è diffusa in tutti gli areali, temperati o semitropicali, di coltivazione di questi cereali (Europa, Asia, Sud Africa, Sud America, Stati Uniti, Canada e Australia).

La comparsa di questa sindrome è stata registrata su orzo in Inghilterra nel 1884, da Smith, che attribuì la malattia al fungo *F. culmorum* (Smith, 1884).

Le segnalazioni di FDS, si sono susseguite a livello globale fino a divenire, nell'ultimo decennio del XX secolo, il maggior fattore limitante la coltura del frumento in molte parti del mondo (Stack, 1999; Dubin *et al.*, 1997). Infatti negli anni '20 seri casi di diffusione di FDS causata prevalentemente da *F. graminearum* (Schwabe), su frumento, furono rilevati in America da Jonson *et al.* (1920), Atanasoff (1920), MacInnes e Fogelmann (1923) e Koehler *et al.* (1924). Epidemie furono segnalate anche in Inghilterra, Russia, Svezia, Francia, Germania, Australia, Brasile, Olanda, Norvegia, Giappone e Canada (Parry *et al.*, 1995).

In Italia la malattia è comparsa nei primi anni del secolo scorso e fu segnalata da Peglion nel 1900, ma solo a partire dal 1995 sono state accertate frequenti infezioni su frumento tenero e duro nelle regioni del centro nord della penisola (Montorsi *et al.*, 1988; Corazza *et al.* 1989; Balmas e Corazza, 1994; Balmas *et al.*, 1995; Pancaldi *et al.*, 1996). L'incidenza e la gravità risultano variabili di anno in anno in funzione dell'andamento climatico, degli areali e delle varietà considerate, con perdite di produzione dal 30 al 70% (Parry *et al.*, 1995).

Sono state associate a FDS oltre 17 specie differenti, appartenenti al genere *Fusarium* e *Microdochium nivale* (Fries) (sin. *F. nivale*), anche se le più importanti per diffusione e patogenicità sono *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. avenaceum* (Corda & Fries) seguite da *F. poae* (Peck); altre meno presenti sono *F. acuminatum* (Ellis & Everh), *F. crookwellense* (Burgess), *F. moniliforme* (Sheldon), *F. tricinctum* (Corda), *F. equiseti* (Corda), *F. semitectum* (Berk & Ravanel), ecc.

I sintomi

I sintomi sono generalmente simili in tutti i cereali da granella. Il fungo penetra nel fiore o seguendo i filamenti degli stami causando il disseccamento parziale della spighetta, oppure colonizza i tessuti conduttori del rachide, ostacolando il trasporto di acqua e di nutrienti, portando così al disseccamento della parte superiore della spiga. Inizialmente l'infezione compare come picchiettature brune idropiche alla base o al centro delle glume. L'avanzamento dell'infezione nella rachilla porta al disseccamento delle spighe, che appaiono sbiancate rispetto la parte sana della spiga, o del rachide, causando il disseccamento parziale o totale della spiga. Se le condizioni climatiche permangono favorevoli allo sviluppo della malattia, compaiono, sulle glume, efflorescenze colorate dal salmone all'arancio, costituite dagli sporodochi di *F. graminearum* e *F. culmorum*, i due principali miceti

coinvolti. Le cariossidi appaiono striminzite, grigiastre o rossastre e di frattura farinosa; infezioni secondarie o tardive, non si traducono in perdite ponderali o in sintomi evidenti.

La sintomatologia aspecifica, che deriva dall'infezione, si associa alla presenza di alcuni prodotti del metabolismo secondario dei miceti coinvolti, che costituiscono contaminanti pericolosi per la salute dell'uomo e dell'animale (Morooka *et al.*, 1972; Vesonder *et al.*, 1973).

I danni che derivano dall'intero quadro patologico sono di carattere qualitativo e quantitativo. La riduzione della resa, la produzione di cariossidi bianconate e contaminate da micotossine, compromettono le caratteristiche merceologiche della granella e riducono la qualità delle sementi, rendendone difficile il commercio, l'esportazione, la trasformazione ed il consumo (McMullen *et al.*, 1997). Prevenire la contaminazione della catena alimentare dalle micotossine è fondamentale per la salute dell'uomo e dell'animale.

Gli agenti causali

L'associazione dei miceti appartenenti al genere *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *F. poae*) o al genere *Microdochium* (*M. nivale* var. *nivale* e var. *majus*) che si ritrovano singolarmente o associati sui tessuti infetti, con caratteristiche ecologiche-fisiologiche-tossicologiche assai differenti, variano in relazione a fattori geografici climatici o colturali (Tab. 2).

Tabella 2: Fattori ambientali che favoriscono lo sviluppo dei funghi associati alla fusariosi (da L. E. Osborne, J. M. Stein, 2007).

	Pathogen species					Source
	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>M. nivale</i>	
	Reported optimum temperature or moisture (tested range)					
Mycelial growth	25 °C (10–30 °C)	20–25 °C (10–30 °C)	20–25 °C (10–30 °C)	20 °C (10–30 °C)	20 °C (10–30 °C)	Brennan <i>et al.</i> (2003)
Sporulation (conidia)	32 °C; –0.14 MPa	32 °C; –1.5 MPa		28 °C; –1.5 MPa	26 °C	(Xu, 2003; Sung and Cook, 1981)
Conidia germination (delay when drier)	100% 0 to –6.0 MPa	100% 0 to –6.0 MPa		100% 0 to –6.0 MPa		Sung and Cook (1981)
Infection frequency with time by conidia	29 °C; >48 h incr. (10–35 °C, 8–72 h)	26.5 °C; 72 h (10–35 °C, 8–72 h)		29 °C; 72 h 25 °C; 24–48 h (10–35 °C, 8–72 h)	18 °C; 72 h (10–35 °C, 8–72 h)	Rossi <i>et al.</i> (2001)
Perithecial maturation	20–24 °C; –0.45 MPa inhib. when wetter					(Dufault <i>et al.</i> , 2006; Sung and Cook, 1981)
Ascospore release	16 °C	–	–	–	–	Sutton (1982)
Ascospore germination	4 h; at –2.0 MPa 24 h at –6.0 MPa (0 to –8.0 MPa)					Sung and Cook (1981)
Infection by ascospores	Increases in rate to 35 °C	–	–	–	–	Lu <i>et al.</i> (2001)
Wheat seedling inhibition	25 °C (10–30 °C)	25 °C (10–30 °C)	20 °C (10–30 °C)	25 °C (10–30 °C)	15 °C (10–30 °C)	Brennan <i>et al.</i> (2003)

Ogni specie fungina agente della FDS ha specifiche esigenze ambientali e biologiche, che possono in parte spiegare la variazione nella diffusione di queste specie in base all'area geografica. Le specie sono state divise in base alle loro esigenze termiche in due gruppi: specie microterme (es. *F. avenaceum* e *F. culmorum*) che vivono prevalentemente nelle regioni più fresche del pianeta e specie macroterme (es. *F. graminearum*) che preferiscono temperature più elevate. La presenza di una specie specifica in una regione è principalmente influenzata dai parametri climatici del luogo, specialmente la temperatura (Parry *et al.*, 1995); *F. graminearum* è predominante in climi miti e in aree umide, come ad esempio gran parte degli U.S.A. (Goswami e Kistler, 2004; Vigier *et al.*, 1997) mentre *F. culmorum* ha mostrato di essere una delle principali specie di *Fusarium* in aree fredde, come ad esempio il Nord, Centro ed Ovest Europa (Parry *et al.*, 1995) e Canada (Demeke *et al.*, 2005).

F. culmorum è stato identificato come la specie predominante nella Germania ovest (Muthomi *et al.*, 2000) e nella valle del Reno, ed è stato inoltre identificato tra le quattro maggiori specie di *Fusarium* isolate in frumento, orzo e avena in Norvegia (Kosiak *et al.*, 2003). Recentemente *F. graminearum* e *F. culmorum* sono stati classificati tra i tre principali agenti di FDS in Canada (Clear e Patrick, 2006). Studi recenti di carattere epidemiologico, riportano la sostituzione di *F. culmorum* nelle aree dove era più diffuso, da parte di *F. graminearum* (Jennings *et al.*, 2004 a, b; Waalwijk *et al.*, 2003). La presenza di *F. graminearum* è risultata comune su grano in Germania (Obts e Fuchs, 2000) dove sono stati scoperti valori elevati di deossinivalenolo (DON) (Placinta *et al.*, 1999) Tale specie è risultata essere la più diffusa in Italia tra il 1999 e il 2002 (Shan *et al.*, 2005), dimostrando anche in questo caso la sostituzione di *F. culmorum* da parte di *F. graminearum* (Pancaldi *et al.*, 2003). Quest'andamento può essere indotto da un cambiamento del clima verso temperature più miti, una variazione nel patrimonio genetico di *F. graminearum*, oppure da cambiamenti nelle pratiche colturali (Bateman, 2005), ma anche da differenze biologiche tra i due funghi, ed una differente aggressività e patogenicità (Xu *et al.*, 2005). Per esempio, in condizioni ambientali appropriate comunque *F. culmorum* è capace di causare gravi perdite di produzione (Lacey *et al.*, 1999). *F. graminearum* ha una crescita ottimale all'interno di un ampio range di temperature, con la temperatura massima di accrescimento di 30 °C, per cui si adatta molto bene alle regioni a clima mite. *F. poae* invece richiede temperature più basse (20 °C) ed è frequente in climi temperati.

Fonti di inoculo

Tra i principali fattori che influenzano la moltiplicazione dell'inoculo assumono un'importanza rilevante le precessioni colturali e la quantità di residui della coltura

precedente nel suolo (Dill-Macky e Jones, 2000; Teich e Hamilton, 1985). Precessioni di mais e soia sono da evitare a causa della suscettibilità di queste colture ai funghi del genere *Fusarium*, ed in particolare a *F. graminearum*. Su di essi si possono così sviluppare facilmente periteci e di conseguenza ascospore, che possono poi rimanere vitali fino a due anni sulla superficie del suolo (Pereyra *et al.*, 2004). Nel complesso quindi, i residui colturali, i culmi e le cariossidi sono generalmente le più prolifiche sorgenti di inoculo (Gilbert e Fernando, 2004; Guenther e Trail, 2005; Khonga e Sutton, 1988). Secondo alcuni ricercatori la principale sorgente di inoculo (conidi, ascospore, frammenti ifali), per lo sviluppo di una epidemia di FDS, è rappresentata dalla presenza di agenti della “fusariosi del piede” sulle piante di frumento durante la fase di accrescimento, dato che le due sindromi sono strettamente collegate tra di loro e hanno in comune gli stessi agenti eziologici.

Secondo altri (Khonga e Sutton, 1988; Gilbert e Fernando, 2004; Guenther e Trail, 2005) la principale sorgente di inoculo è rappresentata dai residui colturali (frumento, sorgo, mais) lasciati sul terreno, quando si utilizzano le tecniche di minimo o zero tillage. Infatti su tali residui il patogeno può sopravvivere come micelio e continua a svilupparsi saprofiticamente durante l’inverno. In zone dove si praticano le normali lavorazioni del terreno si ha una riduzione della riproduzione e sopravvivenza del patogeno (Khonga e Sutton, 1988; Pereyra *et al.*, 2004). Gli agenti causali della fusariosi possono conservarsi nel suolo come clamidospore (spore durevoli), anche se solo alcune specie sono in grado di produrle, oppure passano l’inverno sopra o all’interno di residui colturali infetti, presenti nel suolo. I funghi sopravvivono nei residui come micelio e continuano a svilupparsi saprofiticamente su di essi durante l’inverno e la primavera (Sutton, 1982). *F. graminearum* supera l’inverno come micelio saprofitico sulle fonti di inoculo primario. In primavera il clima mite e un adeguato grado di umidità favoriscono lo sviluppo e la maturazione dei conidi e periteci, che poi produrranno ascospore, in corrispondenza della fioritura (Markell e Francl, 2003). Le ascospore sono considerate come la fonte primaria di propagazione dell’inoculo, che proviene dai residui nel suolo (Andersen, 1948; Bai e Shaner, 1994; Parry *et al.*, 1995; Sutton, 1982).

La diffusione dell’inoculo può avvenire grazie all’azione del vento o agli schizzi di pioggia oppure attraverso l’azione combinata di vento e pioggia che trasportano l’inoculo sulla spiga. Le ascospore espulse dai periteci si propagano a non più di qualche millimetro (Trail *et al.*, 2002) Quando i periteci di *Gibberella zeae* vengono umettati da piogge o forti bagnature espellono le ascospore, che entrano così nelle correnti d’aria e vengono diffuse anche a distanza. Gilbert e Tekauz (2000) hanno individuato una soglia (>80%) di umidità relativa, sotto la quale l’espulsione delle ascospore non avviene.

La dispersione dei conidi invece è causata da quello che viene chiamato rain-splash o splash-borne, ovvero una diffusione strettamente legata alle piogge (Horberg, 2002; Paul *et al.*, 2004): per questo motivo *F. culmorum* e le forme conidiche di *F. graminearum*, raggiungono le spighe solo in occasione di piogge prolungate o che si ripetano a breve distanza (Rossi *et al.*, 2001). Il genere *Fusarium* è molto polimorfico. Queste differenze hanno importanti risvolti epidemiologici. I macroconidi sono prodotti in ammassi gelatinosi di colore rosato-aranciato, detti sporodochi, e necessitano della pioggia per essere liberati e degli schizzi per essere allontanati. I microconidi non presentano questo tipo di aggregazione e possono quindi essere allontanati dalle correnti d'aria.

Processo infettivo ed epidemiologia

Le spighe di frumento sono estremamente suscettibili all'infezione durante l'antesi (Sutton, 1982; Lacey *et al.*, 1999). Atanasoff (1920) si accorse che la malattia si manifestava più intensamente nelle aree esposte al vento principale rispetto alle zone riparate. Inoculò delle spighe durante gli stadi compresi tra l'inizio della spigatura e la maturazione e si accorse che la malattia appariva più grave durante l'antesi. Questi risultati fecero pensare che le antere, essendo il sito della infezione iniziale, contenessero delle sostanze in grado di stimolare lo sviluppo delle ife. Tutto ciò è stato dimostrato da Strange e Smith (1978) che individuarono due composti presenti nel polline (la betaina e la colina) che stimolano la germinazione delle spore e favoriscono lo sviluppo delle ife. Sono proprio queste due sostanze che rendono la pianta più suscettibile alla infezione nel periodo della fioritura.

F. graminearum inizialmente non penetra direttamente l'epidermide, le ife, infatti si sviluppano all'esterno dei fiori e delle glume, permettendo al fungo di accrescersi verso gli stomi o altri punti dell'infiorescenza che facilitino la penetrazione del fungo (Bushnell *et al.*, 2003). Altre vie di ingresso del patogeno includono lo strato al di sotto del parenchima, le antere, le aperture tra lemma e palea sulle spighette durante la deiscenza (Bushnell *et al.*, 2003; Lewandowski e Bushnell, 2001) e la base delle glume, dove l'epidermide e il parenchima sono più sottili. Una volta all'interno del fiore, antere, stimma e lodicole sono facilmente colonizzate. L'infezione delle spighe inizia quindi dalle antere, spesso quando sono ancora chiuse, e da lì il micelio si diffonde in tutte le parti delle spighette comprese l'ovario e il rachide causando la tipica sintomatologia precedentemente descritta.

Nonostante vari tentativi non è stato completamente chiarito come i conidi di *F. culmorum* raggiungano la spiga.

Il successo dell'infezione, l'incidenza e gravità di malattia dipendono da molti fattori, tra cui: la temperatura, l'umidità (Lacey *et al.*, 1999), il grado di resistenza della cultivar (Wagacha e

Muthomi, 2007), la concimazione azotata (Doohan *et al.*, 2003) e altri fattori. Il fattore dominante comunque è rappresentato dalla disponibilità di umidità, infatti lunghi periodi di umidità favoriscono l'infezione e la produzione di micotossine (Mentewab *et al.*, 2000; Campbell e Lipps, 1998). La temperatura ha dimostrato influenzare l'incidenza e la gravità della fusariosi, temperature maggiori di 25 °C producono gravi infezioni (Mentewab *et al.*, 2000).

La specie *F. poae* inoltre può favorire lo sviluppo della fusariosi nelle prime fasi di colonizzazione dell'ospite, facilitando l'aggressione da parte di *F. culmorum* e *F. graminearum* (Sturz e Johnston, 1983).

Fusarium graminearum complex

In generale si può ritenere che la specie, definita da O'Donnell nel 2000, *F. graminearum* lineage 7 (del complesso Fg), anamorfo dell'ascomicete omoallico *Gibberella Zeae*, sia l'agente eziologico primario della FDS in frumento tenero (*Triticum aestivum*), frumento duro (*Triticum durum*) e orzo (*Hordeum vulgare*), in Italia ed in altre parti settentrionali del mondo (Bottalico e Perrone, 2002; Doohan *et al.*, 2003; Gale, 2003; Goswami e Kistler 2004; Logrieco *et al.*, 2002; Miedaner *et al.*, 2001; Munkvold, 2003; O'Donnell *et al.*, 2000, 2004; Parry *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2005).

Fino a non molto tempo fa il complesso *F. graminearum* (Fg) era considerato, sulla base delle caratteristiche morfologiche, un'unica specie cosmopolita, (Booth, 1971; Gerlach and Nirenberg, 1982; Leslie e Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1983). Ultimamente, attraverso una definizione filogenetica sulla base della concordanza di geni ortologi (GCPSR Genealogical concordance phylogenetics species recognition, Taylor *et al.* 2000), è stata proposta la suddivisione in 13 specie filogenetiche distinte, con una marcata struttura biogeografia (O'Donnell *et al.*, 2000, 2004, 2008 ; Starkey *et al.*, 2007), che sottolinea eventi di speciazione allopatrica (Giraud *et al.*, 2008).

Attualmente, a scopo diagnostico un microchip genomico è stato ottimizzato, nell'ambito del richiamo della comunità scientifica sull'importanza del monitoraggio internazionale sui patogeni FHB (MLGT Multilocus genotyping, Ward *et al.*, 2008) permette di identificare le 13 specie e il relativo chemiotipo.

Micotossine

La presenza di micotossine e più specificatamente di fusariotossine nel frumento rappresenta un importante problema associato alla FDS. Le fusariotossine sono prodotti del metabolismo secondario di funghi del genere *Fusarium* in grado di causare effetti tossici acuti o cronici sull'uomo e sugli animali. Sono molecole molto stabili dal punto di vista chimico e fisico infatti non vengono distrutte con il calore e pertanto risultano difficilmente degradabili con i tradizionali sistemi di lavorazione e cottura degli sfarinati. Queste sostanze si accumulano prevalentemente in campo, oppure in un secondo momento, quando il raccolto viene stoccato. Le micotossine che si trovano con più frequenza nel frumento sia tenero che duro sono il deossinivalenolo (DON), il nivalenolo (NIV) e lo zearalenone (ZEA) prodotti da *F. graminearum* e *F. culmorum* mentre le tossine T-2 e H-T2 sono prodotte da *F. poae* e *F. sporotrichioides* (Tab. 3).

La fusariotossina più importante per diffusione e concentrazione nelle cariossidi è certamente DON trovato sia in Italia che in Europa. Esiste una stretta relazione tra il clima, lo sviluppo della FDS e l'accumulo di DON nelle cariossidi. In particolare è stato osservato che l'incidenza e la gravità della malattia come la frequenza e i livelli di contaminazione da DON nelle cariossidi dipendono fortemente dalla quantità di inoculo iniziale presente sui residui colturali del terreno, dalle condizioni climatiche (alta temperatura, elevata umidità, piogge) che si verificano nel periodo tra la spigatura e la maturazione latteo cerosa delle cariossidi e infine dalla sensibilità della varietà coltivata.

Tabella 3: Principali micotossine prodotte da diverse specie di *Fusarium*.

AcDon= AcetilDeossinivalenolo, DON (Deossinivalenolo); NIV (Nivalenolo); BEA (Beauvericina); FB1 & FB2 (Fumonisine); FUS (Fusaproliferina); EN (Eniantina); MAS (Monoacetoxyscirpenolo) MON (Moniliformina); NEO (Neosolaniolo); DAS diacetossiscirpenolo, T2; HT2, ZEA (Zearalenone); ZOH (Zearalenolo).

Specie di <i>Fusarium</i>	Micotossine
<i>F. acuminatum</i>	T2, MON, NEO
<i>F. avenaceum</i>	MON, EN, BEA
<i>F. cerealis</i>	NIV, FUS, ZEA
<i>F. chlamydosporum</i>	MON
<i>F. culmorum</i>	DON, ZEA, NIV
<i>F. equiseti</i>	ZEA, ZOH, MAS
<i>F. graminearum</i>	DON, ZEA, NIV, FUS, AcDON
<i>F. heterosporum</i>	ZEA, ZOH
<i>F. nygamai</i>	FB1, BEA
<i>F. oxysporum</i>	MON
<i>F. poae</i>	DAS, NIV, FUS, T2, HT2, NEO, MAS
<i>F. proliferatum</i>	FB1, BEA, FUS
<i>F. sambucinum</i>	DAS, MAS
<i>F. semitectum</i>	BEA
<i>F. sporotrichioides</i>	T2, NEO, MAS, HT2
<i>F. subglutinans</i>	BEA, MON
<i>F. tricinctum</i>	MON
<i>F. verticillioides</i>	FB1, FB2

Il problema delle micotossine coinvolge l'intera filiera produttiva ma può essere gestito attraverso dei programmi di lotta integrata che comprendono sia metodi agronomici (precessione colturale e lavorazione del terreno) che la difesa fitoiatrica (impiego di semente conciata, applicazione di fungicidi alla fioritura). Importante è anche la conoscenza degli areali potenzialmente più esposti ai rischi d'infezione e contaminazione. Per ridurre i possibili danni alla salute dell'uomo e degli animali la Commissione europea ha fissato, con il regolamento comunitario n. 856/2005, i limiti massimi di DON per il frumento e i suoi derivati (Tab. 4).

Il DON detta anche vomitossina appartiene alla classe dei tricoteceni che costituisce il più vasto gruppo di fusariotossine.

Tabella 4: Limiti massimi di DON ammessi nel frumento duro e tenero.

MICOTOSSINE	LIMITE MASSIMO (mg/Kg =ppm)	PRODOTTI
DEOSSINIVALENOLO	1,250	cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granoturco
	1,750	grano duro e avena non trasformati
	0,750	farina di cereali, inclusa la farina e la semola di grano turco
	0,500	prodotti di panetteria, pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione
	0,750	pasta (secca)
	0,200	alimenti trasformati a base di cereali destinati a lattanti e bambini e alimenti per l'infanzia

Tricoteceni

I tricoteceni sono sesquiterpenoidi, molecole con un'elevata attività sugli organismi viventi: alterano il sistema immunitario (Pestka e Smolinski, 2005), inibiscono la sintesi proteica negli eucarioti (McLaughlin *et al.*, 1977; Ueno *et al.*, 1973), e sono stati collegati a vari fenomeni di micotossicosi umane, quali dermatiti, disordini digestivi, emorragie degli organi interni, problemi di coagulazione del sangue, impoverimento del midollo osseo, e disordini del sistema nervoso (Peraica *et al.*, 1999; Ueno e Ishii, 1985). I tricoteceni sono associati anche ad alcune micotossicosi del bestiame, tra cui sindromi emorragiche ed emetiche. Inoltre queste molecole sono altamente fitotossiche e funzionano come fattori di virulenza in molti cereali (Jansen *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006).

Chimicamente i tricoteceni vengono divisi in due classi, in base alla presenza (Tricoteceni del tipo A) o all'assenza (Tricoteceni del tipo B) di un gruppo chetonico al carbonio 8 della catena.

Il tipo A comprende le micotossine: (a) T2 e HT2, prodotte principalmente da ceppi di *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum* e *F. poae*; (b) Diacetoxyscirpenolo (DAS) e Monoacetoxyscirpenolo (MAS), prodotte da ceppi di *F. poae*, *F. equiseti*, *F. sambucinum*, e *F. sporotrichioides*; (c) Neosolaniolo (NEO), prodotto dai ceppi di *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. acuminatum*.

Al tipo B appartengono: (a) DON ed i suoi derivati mono (3- e 15-ADON), e diacetilati (3,15-ADON), prodotti da ceppi di *F. graminearum* e *F. culmorum*; (b) NIV e Fusarenone (FUS), e le loro forme diacetilate (4,15-AcNIV), prodotti da ceppi di *F. cerealis*, *F. poae*, *F. graminearum* e *F. culmorum*.

Zearalenoni

ZEN è principalmente prodotto da *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* e *F. semitectum*. ZEN è tra le fusariotossine maggiormente diffuse nelle derrate alimentari, e spesso riscontrata anche ad elevate concentrazioni. ZEN è un composto uterotrofico ma anche un estrogeno, responsabile di tossicosi ricorrenti nel bestiame, caratterizzate da iperestrogenismo nei maiali, infertilità e scarse performance in bovini e pollame (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

Biosintesi dei tricoteceni

La biosintesi dei tricoteceni è stata studiata su *F. sporotrichioides*, che produce tossine T2, e su *F. culmorum*, produttore della tossina 3-ADON (McCormick, 2003). Sono stati descritti diversi geni coinvolti nell'espressione di tricoteceni, molti dei quali localizzati in complessi genici. Approssimativamente metà dei geni necessari per la biosintesi dei tricoteceni è localizzata in un complesso genico di circa 25-kb (Kimura *et al.*, 2001). Questo complesso, denominato "Tri", contiene un nucleo centrale di geni coinvolti nella biosintesi della struttura di base delle tossine (*Tri4* e *Tri5*), fiancheggiato da geni che sono invece responsabili della differenziazione strutturale della molecola (*Tri3* e *Tri13*) (Fig. 1). I geni al centro del cluster sono tutti coinvolti nel processo di base della sintesi della molecola. Il gene *Tri5* codifica per la tricodiene sintasi, che catalizza il primo step della biosintesi dei tricoteceni (Hohn e Beremand, 1989). La sequenza nucleotidica del gene *Tri5* è stata caratterizzata in numerose specie di *Fusarium* (Fekete *et al.*, 1997; Hohn e Desjardins, 1992). Anche *Tri4* (Hohn *et al.*, 1995) codifica per la citocromo P-450 monossigenasi, coinvolta nell'ossigenazione del carbonio alle posizioni C-2 e C-11, che insieme vanno a formare la molecola eterociclica dei tricoteceni. I geni che fianleggiano il gene per la tricodiene sintasi (*Tri5*), sono coinvolti nella regolazione dell'intero complesso, come ad esempio i geni *Tri6* e *Tri10*. Il gene *Tri6* è una zinco proteina, coinvolta nell'attivazione della trascrizione per i geni che attuano la biosintesi dei tricoteceni, compreso i geni all'esterno del complesso genico descritto (Hohn *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1999; Proctor *et al.*, 1995, Tag *et al.*, 2001). *Tri10* invece è

fondamentale per la biosintesi e l'espressione dei geni coinvolti attraverso l'attivazione a monte del gene *Tri6* (Tag *et al.*, 2001).

La ricombinazione all'interno dei complessi genici è estremamente limitata ai suoi estremi, mentre non lo è per i geni posti nella zona centrale del complesso genico della sintesi dei tricoteceni, in quanto più conservati (Ward *et al.*, 2002). I geni ai lati del cluster si evolvono con più frequenza e sono questi geni che codificano per gli enzimi che determinano la formazione delle diverse tossine della famiglia. Per questo è possibile distinguere a livello sub specifico diversi gruppi che si differenziano per la loro struttura chimica, a cui ci si riferisce come chemiotipi e che comprendono le due forme acetilate di DON (3 e 15-ADON) e il NIV. Il gene *Tri3* codifica la 15-O-acetiltransferasi (McCormick *et al.*, 1996), che sembra essenziale per la produzione del chemiotipo 15-ADON. *Tri13* invece codifica una ossigenasi responsabile dell'idrossilazione al C-4, e quindi fondamentale per la formazione di NIV (Lee *et al.*, 2002).

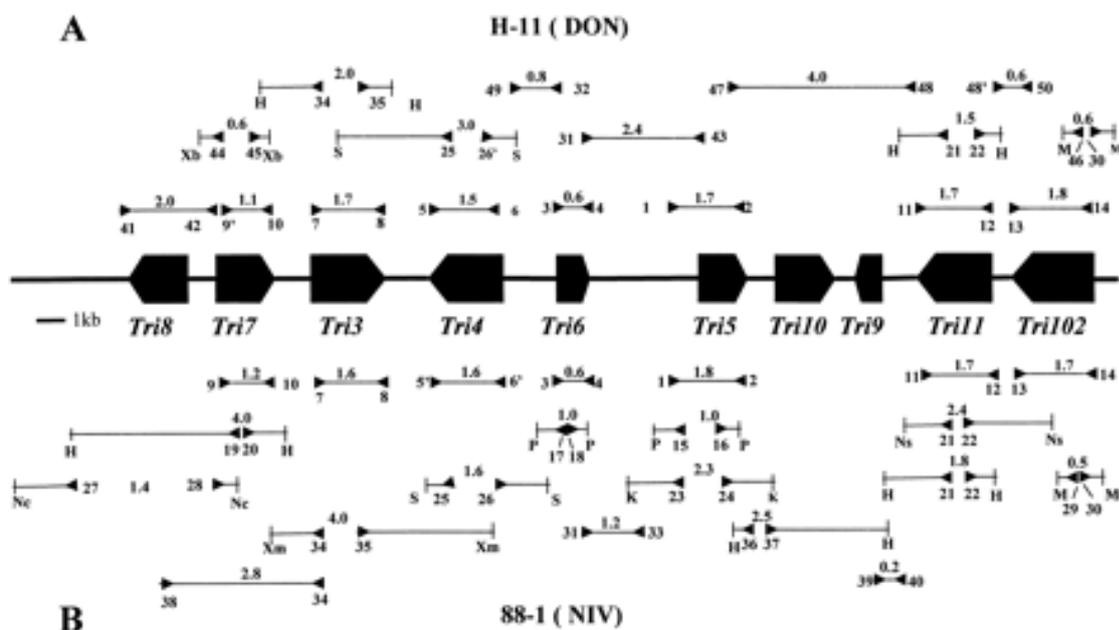


Fig. 1 - Schema del complesso genico “*Tri*” dai ceppi di *G. zeae* strains H-11 (A) and 88-1 (B) (da Lee *et al.*, 2001) .

Le differenti forme chimiche dei tricoteceni (DON, 3ADON, ecc.) mostrano una differente tossicità verso le cellule vegetali ed animali (Anderson *et al.*, 1989; Kimura *et al.*, 1998). È noto che ceppi di *F. graminearum* dimostrano diversa aggressività nei confronti di ospiti diversi, ceppi che producono NIV sono più aggressivi verso il mais, ma meno verso il frumento rispetto ai ceppi produttori di DON (Carter *et al.*, 2002; Cumagun *et al.*, 2004). Inoltre nella sindrome della FDS, il DON risulta essere un effettore del fungo determinante di virulenza.

Tossicologia e produzione di micotossine

Le principali micotossine prodotte da *F. graminearum* e *F. culmorum*, come già accennato precedentemente, fanno parte dei tricoteceni, ed includono DON, la sua forma ossigenata NIV, le forme acetilate di DON all'ossigeno 3 (3-ADON) e 15 (15-ADON) e il fusarenone X. In base allo studio su colture di *F. graminearum* e *F. culmorum* i tricoteceni sono stati divisi in tre distinti chemiotipi: il chemiotipo NIV che include isolati che producono nivalenolo e fusarenone X, il chemiotipo 3 ADON che considera gli isolati che producono DON e la sua forma acetilata all'ossigeno 3, e il chemiotipo 15-ADON di cui fanno invece fanno parte gli isolati produttori di DON e della forma acetilata all'ossigeno 15. E' stato osservato che i chemiotipi sono distribuiti indipendentemente dall'origine geografica delle cultivar di frumento (Bakan *et al.*, 2001), ed inoltre che, all'interno della stessa specie e nelle medesime condizioni colturali, la produzione delle tossine in ceppi di *Fusarium* può variare sensibilmente. Alcuni ceppi producono grandi quantità di tricoteceni, mentre altri ne producono quantitativamente pochi, fino a concentrazioni non rilevabili (Wagacha e Muthomi, 2007). Secondo Llorens *et al.* (2006) esiste una correlazione positiva tra la quantità di tossine prodotte e l'aggressività dei ceppi isolati.

Le altre specie di *Fusarium*, invece, hanno una minore aggressività su orzo e grano, in quanto infettano, ma non proliferano nella pianta, al massimo crescono solo sulla superficie in maniera saprofitica. La loro presenza non è comunque da sottovalutare sotto l'aspetto tossicologico, in quanto, anche se meno aggressive, il loro sviluppo da sole o in associazione con le specie più dannose, può portare all'accumulo di micotossine nelle cariossidi, anche in assenza di sintomatologie tipiche (Salas *et al.*, 1999).

Lotta

Cultivars resistenti

Lo sviluppo di cultivar di frumento resistenti alle varie specie di *Fusarium* dovrebbe essere il metodo più efficiente ed economicamente compatibile per il controllo della malattia.

E' generalmente accertato che la resistenza alla FDS è di tipo orizzontale poligenico. La localizzazione della resistenza nel genoma di frumento è stata effettuata con metodologie molecolari come RFLP e AFLP, con l'uso di RIL's (Recombinant Inbred Lines) che hanno permesso di identificare diversi QTL (Quantitative Trait Loci) su differenti cromosomi (Buertsmayr *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2001; Ruckebauer *et al.*, 2001; Bai e Shaner, 1994; Liu e Anderson, 2003; Mesterhazy *et al.*, 1999; Mesterhazy, 1995; Snijders, 1990).

Nel frumento esaploide sono state identificate molte fonti di resistenza. La cultivar Cinese Sumai 3 ed i suoi derivati (Bai *et al.*, 2003), numerose accessioni Giapponesi (Mesterhazy,

1997; Ban, 2000; Rudd *et al.*, 2001), la cultivar Brasiliana Frontana (Singh *et al.*, 1995; Gilbert *et al.*, 1997; Mesterhazy, 1997) e germoplasmi dell'Europa dell'est come "Prag 8" (Mentewab *et al.*, 2000) sono portatori di tratti distintivi di resistenza alla diffusione nella spiga. Attualmente però non sono disponibili sul mercato cultivar di frumento con un'elevata resistenza alla fusariosi, anche se alcune cultivar possono essere sfruttate grazie ad una parziale resistenza, che consente di limitare le perdite di produzione e l'accumulo di micotossine (Pereyra *et al.*, 2004).

Al contrario le fonti di resistenza nel frumento duro sono limitate ad altre sottospecie di frumenti tetraploidi (AABB) coltivati come: Grano Persiano [*T. turgidum* subsp. *carthlicum* (Nevski) Á. Löve and D. Löve], Frumento dicocco selvatico [*T. turgidum* subsp. *dicoccoides* (Körn. ex Asch. and Graebner) Thell.], Frumento dicocco coltivato [*T. turgidum* subsp. *dicoccum* (Schrank ex Schübler) Thell.], Grano di Polonia [*T. turgidum* subsp. *polonicum* (L.) Thell.], Grano Orientale [*T. turgidum* subsp. *turanicum* (Jakubz.) Á. Löve and D. Löve], Georgian emmer wheat [*T. turgidum* subsp. *Paleocolchicum* (Menabde) Á. Löve and D. Löve], Grano grosso (*T. turgidum* L. subsp. *turgidum*) (van Slageren, 1994). Il Frumento duro inoltre appare più suscettibile alla fusariosi della spiga (Lops *et al.*, 1998) rispetto al frumento tenero, e la sua gestione appare complicata da alcuni fattori di carattere tecnico.

Controllo chimico

Per proteggere le coltivazioni di frumento dagli attacchi degli agenti causali della FDS si può intervenire già sul seme (che come è noto è il principale agente di diffusione della fusariosi) tramite la concia con fungicidi attivi contro il genere *Fusarium* in questo modo si riduce il potenziale di inoculo. In ogni modo il momento più favorevole per contenere le infezioni da *Fusarium* alla spiga tramite l'impiego di fungicidi specifici è quando sulle spighe il 10-20% delle antere sono visibili (GS 60-61) e si è in presenza di condizioni climatiche favorevoli allo sviluppo degli agenti causali (clima caldo umido e/o leggere precipitazioni).

Un altro aspetto molto importante riguarda la riduzione delle fusarium-tossine nella granella. In molti casi si è osservato che il trattamento fungicida oltre a limitare la malattia agisce positivamente nel ridurre le concentrazioni dei principali metaboliti tossici prodotti da *Fusarium* spp.

I principali fungicidi che attraverso indagini di campo si sono dimostrati efficaci contro gli agenti causali della fusariosi della spiga sono: il tebuconazolo, il procloraz, l'epossiconazolo, il bromuconazolo e il protioconazolo infine e il metconazolo, questo ultimo non ancora registrato in Italia. Tali fungicidi sono degli Inibitori della Biosintesi degli Steroli (I.B.S.), in

particolare tebuconazolo, epossiconazolo e bromuconazolo appartengono alla classe dei Triazoli; il procloraz è un Imidazolo e il protioconazolo è una nuova molecola fungicida appartenente alla nuova classe chimica dei triazolintioni (Mauler-Machnik *et al.*, 2004).

Questi composti hanno caratteristiche molto simili come il meccanismo di azione che è pressoché identico. Sono dei fungicidi sistemici ad ampio spettro di azione che interferiscono sul metabolismo dei lipidi in particolare inibiscono la sintesi degli steroli, componenti fondamentali della membrana cellulare, alterandone la sua funzionalità. Di conseguenza viene modificata la permeabilità della membrana con ripercussioni negative sull'assorbimento dei nutrienti che si riduce lentamente fino ad arrestarsi.

Tali sostanze penetrano nei tessuti vegetali e nella maggior parte dei casi vengono traslocate dalla corrente circolatoria principalmente in senso acropeto, sono quindi in grado di esercitare una azione completa ovvero preventiva, curativa ed eradicante.

In bibliografia sono riportate numerose ricerche condotte per valutare l'azione dei precedentemente citati fungicidi nei confronti degli agenti della FDS. Per quanto concerne il tebuconazolo esso è risultato insieme al procloraz uno dei più efficaci in seguito a prove condotte da Hutcheon e Jordan (1992). Altra testimonianza è quella data da studi condotti da Simpson *et al.* (2001) con l'obiettivo di valutare, mediante l'utilizzo delle nuove tecniche di diagnostica molecolare, le risposte delle complesse popolazioni fungine di patogeni e di altri funghi saprofiti (spesso utili perché in competizione con i primi) ai trattamenti con differenti fungicidi. Da questi studi è emerso che in campi trattati rispettivamente con tebuconazolo, prochloraz e fluquinconazolo si è avuta una riduzione dei sintomi della malattia e contemporaneamente delle micotossine (DON), poiché tali sostanze sono in grado di agire sia nei confronti di specie tossigene, sia (seppur in minor misura) anche nei confronti di quelle non tossigene come *M. nivale*.

Da un'indagine condotta da Pancaldi *et al.* (2004) nelle annate agrarie 2002-03 su tre varietà di frumento duro, è emerso che l'impiego ad inizio fioritura di tebuconazolo, bromuconazolo e prochloraz ha ridotto significativamente l'incidenza e la gravità della FDS. Pure la percentuale di cariossidi infette ed il contenuto di DON nelle cariossidi, semola e crusca è stato ridotto dai medesimi principi attivi.

Per quanto concerne il fungicida protioconazolo, di nuova introduzione, alcune indagini realizzate dal 1999 al 2005, hanno messo in evidenza che quando applicato in fioritura (BBCH 65) è in grado di contrastare efficacemente l'insediamento di *F. culmorum* ed *F. graminearum* (Arcangeli *et al.*, 2006). Risultati interessanti sono stati ottenuti anche applicando protioconazolo su sementi infette da *F. graminearum*, *F. avenaceum* e

Microdochium nivale. Anche nella formulazione per la concia alla dose di 10 g s.a./100 Kg di seme si è potuto apprezzare un incremento del numero di piante emerse ed una significativa diminuzione della incidenza della malattia.

Altre indagini condotte in Francia nel biennio 2006-2007 da Le Douarec *et al.* (2008) hanno confermato che sia il tebuconazolo che il bromuconazolo, impiegati all'inizio della fioritura separatamente oppure in associazione, sono in grado non solo di contenere la malattia, ma anche di ridurre in maniera significativa la presenza di DON nella granella. I risultati hanno dimostrato che hanno un ampio spettro di azione e si sono dimostrati efficaci nei confronti di 18 specie di *Fusarium* spp.

Il controllo della FDS attraverso i fungicidi non ha fornito fino ad ora risultati risolutivi, a causa della complessità dell'eziologia, dell'influenza della fertilizzazione azotata e del periodo di applicazione (Heier *et al.*, 2005). L'uso di fungicidi nel controllo della FHB ha mostrato un'efficienza oscillante tra il 77 e l'89% per la riduzione rispettivamente della gravità della malattia e del contenuto di micotossine (Haidukowski *et al.*, 2005). Questi risultati sono stati però ottenuti in condizioni artificiali, mentre l'efficienza del controllo in condizioni naturali di infezione risulta inferiore al 70% su frumento (Stack, 1999). E' da sottolineare inoltre che i timori verso la sicurezza degli alimenti limitano il controllo chimico, a causa dei possibili residui che questi composti possono lasciare sulla granella (Jones, 2000). Gli interventi chimici devono comunque rientrare in una strategia di lotta integrata.

Biocontrollo

A causa della non totale efficienza dei fungicidi verso la FDS, è stata considerata l'ipotesi di utilizzare nella lotta microorganismi antagonisti. Le metodiche di applicazione e la scelta di tali organismi variano in funzione dell'obiettivo da conseguire. La distribuzione di *Sporobolomyces roseus* e *Paenibacillus macerans* sulla spiga durante le prime fasi di fioritura ha ridotto lo sviluppo della fusariosi causata da *F. graminearum*, mentre l'applicazione di *Microsphaeropsis* spp. o *Trichoderma harzianum* su residui colturali infetti di mais o di frumento ha diminuito lo sviluppo di *F. graminearum*, riducendo la produzione di periteci e il conseguente rilascio di ascospore (Luz *et al.*, 2003). Isolati di *Clonostachys rosea* si sono mostrati molto efficaci nel sopprimere la sporulazione di *F. culmorum* e *F. graminearum* su frumento e di *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* su culmi di mais (Luongo *et al.*, 2005). Due ceppi di *Pseudomonas fluorescens* hanno causato l'inibizione della crescita di *F. culmorum* sia *in vivo* che *in vitro* (Kurek *et al.*, 2003). Inoltre è stata dimostrata una significativa attività di controllo verso la FDS in serra e in pieno campo, da

parte del lievito antagonista *Cryptococcus flavescens*, un antagonista microbico isolato dalle antere di frumento (Kan *et al.*, 2004). Il controllo biologico al momento è da considerare semplicemente una strategia addizionale, che può svolgere un ruolo importante solo per l'agricoltura biologica.

Resistenza sistemica acquisita (SAR)

Le piante, essendo organismi viventi incapaci di macromovimenti, devono essere in grado di adattarsi all'ambiente in cui si trovano a crescere e a riprodursi. Per questo motivo sono in grado di percepire stimoli esterni ed elaborarli in segnali capaci di indurre modificazioni fisiologiche atte a garantirne la sopravvivenza.

Per quanto riguarda la risposta della pianta all'invasione da parte di microorganismi, è noto come questa sia in grado di percepire la presenza di organismi estranei e possa mettere in atto caratteristici processi metabolici atti a contenerne l'attacco. Questo stato di resistenza può essere indotta da diversi stimoli. Si può riconoscere una risposta a stimoli biotici, a seguito del riconoscimento di caratteristiche molecolari associate a microorganismi in genere (MAMPs: Microorganism-associated molecular patterns) o patogeni in particolare (PAMPs) (Pathogen-associated molecular patterns). Questo tipo di riconoscimento coinvolge recettori superficiali di membrana e solitamente si tratta di un tipo di resistenza Non-Ospite. Anche stimoli di carattere abiotico possono portare ad effetti analoghi, questo sistema viene definito sistema immunitario basale. Altro tipo di resistenza indotta da stimoli biotici è quello che coinvolge il riconoscimento diretto od indiretto di proteine che il patogeno utilizza, invece, nella fase di invasione e che vengono veicolate direttamente nel citosol dell'ospite ad alterarne presumibilmente i canali di attivazione della resistenza del primo tipo. Questo tipo di riconoscimento si basa sull'interazione diretta o indiretta dei prodotti dei geni del patogeno e dell'ospite vegetale. La resistenza che ne deriva è di tipo specie specifico o cv specifico (Bent e Mackey, 2007).

Gli stimoli vengono trasmessi dai siti di interazione alle cellule vicine e via via all'intero organismo, attraverso molecole segnale che si muovono per via simplastica e apoplastica, a livello sistemico. La risposta di resistenza di natura sistemica, che la pianta, sottoposta ad un singolo stimolo di natura biotica o abiotica, oppone ad un vasto spettro di patogeni, inclusi Virus, Batteri e Funghi è definita Resistenza Sistemica Acquisita (SAR, Systemic Acquired Resistance) (van Loon, 1997).

Nelle Dicotiledoni si possono distinguere diversi tipi di risposte di resistenza indotta. Quella, per esempio, mediata da SA e suoi analoghi funzionali, a seguito di cambiamenti nel livello ossido riduttivo dell'ambiente citoplasmatico cellulare, portano alla monomerizzazione di

nonexpressor- of- PR Genes-1 (NPR1), normalmente presente come oligomero nel citoplasma e alla sua traslocazione nel nucleo, ove interagendo con caratteristici fattori di trascrizione, porta all'espressione di proteine legate alla patogenesi (Johnson *et al.*, 2003; Dong, 2004). Un altro tipo di resistenza indotta coinvolge l'attivazione del metabolismo ottadecanoico dei lipidi e all'accumulo di inibitori di proteinasi a seguito di ferita o attività trofica di insetti (Farmer e Ryan, 1992). Alcuni microorganismi simbiotici ad habitat terricolo possono indurre risposte di resistenza definite ISR (Induced Systemic Resistance) in maniera indipendente dall'accumulo di SA (van Loon, 1997). Questo tipo di interazione vede coinvolte due molecole segnale l'Acido Jasmonico (JA) e l'etilene (ET) (Verhagen *et al.*, 2004) ma risultano ugualmente regolate da NPR1 (Spoel *et al.*, 2003). Oltre a questi tipi di risposta, ove NPR1 sembra giocare un ruolo di primo piano è stata tuttavia riconosciuta una componente della resistenza indotta associata a JA ed ET che non coinvolge l'attività di questo gene (Penninckx *et al.*, 1996).

Nei cereali sono riconoscibili tutti i tratti presenti sulle dicotiledoni, con alcune eccezioni. Le monocotiledoni, contengono elevati livelli di SA endogeno, sembra quindi poco chiaro il coinvolgimento dei cambiamenti dei livelli di tale molecola nelle risposte SAR in questo gruppo di piante. Ciò nonostante la presenza di omologhi di NPR1 sono stati ritrovati in tutte le monocotiledoni studiate. L'attività di NPR1 nei cereali appare comunque costitutiva, come si osserva dalla localizzazione prevalentemente nucleare di questa proteina (Kinkema *et al.*, 2000). Si ritiene che SA non sia dunque un attivatore di resistenza indotta, ma funzioni piuttosto direttamente e/o indirettamente come antiossidante cellulare, limitando i danni derivanti dallo stress ossidativo indotto da fattori biotici e abiotici (Yang *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2004).

La resistenza indotta chimicamente nei cereali è associata all'espressione di caratteristici geni chiamati WCI (Wheat Chemically Induced) (Gorlach *et al.*, 1996) per il frumento, BCI (Barley Chemically Induced) per l'orzo (Beßer *et al.*, 2000) e RCI (Rice Chemically Induced) per il riso (Schaffrath *et al.*, 2000).

Questi geni sono molto eterogenei e solo pochi di essi sono omologhi agli altri geni PR, che generalmente, non sembrano essere indicatori di SAR nei cereali (Molina *et al.*, 1999). Diversamente uno dei geni maggiormente espresso nei cereali risulta essere quello che codifica per la Lipossigenasi. Questo enzima ha un ruolo centrale nella via degli ottadecanoidi ed i suoi prodotti principali sono idroperossidi di acidi ottadecanoici. La trascrizione di tale enzima è attivato nelle piante di orzo e frumento a seguito di applicazioni di SA o JA o loro derivati (Hause *et al.*, 1999). SA ha dimostrato promuovere la parte riduzionale della via

degli acidi octadecanoidi, portando quindi ad un accumulo di idrossidi degli acidi grassi polinsaturi (hydroxyl-PUFA) (Weichert *et al.*, 1999). Quest'attività tuttavia non porta a risposte di difesa nei confronti di patogeni necrotrofi come *F. graminearum* (Yu e Muehlbauer, 2001). JA invece promuove l'attività dell'enzima Allene ossido sintasi, ed altri enzimi coinvolti nella formazione di JA endogeno in antagonismo con SA, portando alla resistenza nei confronti di diversi patogeni necrotrofi nel frumento (Desmond *et al.*, 2005), e questi tratti sembrano attivi anche verso la FDS (Li e Yen, 2008) .

PAPER I

ANALISI DELLA POPOLAZIONE
AUTOCTONA DEI PRINCIPALI AGENTI
DI FUSARIOSI DELLA SPIGA
SU FRUMENTO DURO

Premessa

Gli agenti causali della fusariosi della spiga (FDS) del frumento appartengono a diverse specie del genere *Fusarium*. A livello mondiale le specie più frequenti sono *F. graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* Schwein (Petch)), *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc. e *F. poae* (Peck) Wollenweb., mentre *F. avenaceum* (Fr.:Fr.) Sacc. (teleomorfo *Gibberella avenaceae* Cook.), *F. sporotrichioides* Sherb. ed anche *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & Hallett sono le altre specie principalmente segnalate in Europa (Bottalico e Perrone, 2002; Doohan *et al.*, 2003; Gale, 2003; Goswami e Kistler, 2004; Logrieco *et al.*, 2002; Miedaner *et al.*, 2001; Munkvold, 2003; O'Donnell *et al.*, 2000, 2004; Parry *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2005; Osborne *et al.*, 2007). La loro frequenza varia di anno in anno ed è influenzata da fattori climatici ed ecologici, e nessuna specie può essere considerata di secondaria importanza, visto che il loro sviluppo da solo o in congiunzione con altre specie patogene può portare alla presenza di micotossine sulla granella anche in assenza di sintomi evidenti (Salas *et al.*, 1999).

In generale si può però affermare che *F. culmorum* e *F. graminearum* siano i patogeni più aggressivi su frumento e orzo (Brennan *et al.*, 2003, Stack and McMullen, 1985). Specie come *F. poae* possono, però, favorire la colonizzazione di altri miceti più aggressivi, coinvolti nella FDS (Sturz and Johnston, 1983). *F. culmorum* sembra prediligere i climi più freddi, e quindi è prevalente in Inghilterra, nord Europa e Canada, dove risulta essere la principale specie agente della fusariosi ed associata alla produzione di Deossinivalenolo (DON), Zearalenone (ZEA), e/o Nivalenolo (NIV) (Desjardin, 2006). *F. graminearum*, considerata la specie più diffusa a livello mondiale (U.S.A., Australia, America del sud, Asia ed Europa centrale), è maggiormente frequente nelle regioni temperate (Logrieco *et al.*, 2002) e attualmente sembra stia sostituendo altre specie, come *F. culmorum*, a causa di variazioni climatiche, a breve termine, fattori ecologici intrinseci ed estrinseci e aspetti relativi alle pratiche agronomiche (Waalwijk *et al.*, 2003; Xu *et al.* 2005). In Europa, oltre alle specie prevalenti già citate, è stato ripetutamente isolato anche *F. poae* che sta assumendo un ruolo sempre più importante nel complesso FDS (Yli-Mattila *et al.*, 2004; Vogelgsang *et al.*, 2008). La situazione in Italia sembra riflettere quella europea (Bottalico e Perrone, 2002).

Molte delle specie di *Fusarium* producono una vasta gamma di micotossine, fra cui i tricoteceni, una famiglia di sesquiterpeni epossidi (Joffe, 1986). *F. graminearum* in senso lato (s.l.) può produrre una serie di 8-Keto-tricoteceni, tra cui: DON e le sue due forme acetilate 15-acetyldeossinivalenolo (15-ADON) e 3-acetyldeossinivalenolo (3-ADON) e NIV con la sua forma acetilata 4-acetilnivalenolo (4-AcNIV). *F. graminearum* e *F. culmorum*, sulla base del tipo di tricotecene prevalentemente prodotto, possono essere ulteriormente distinti in chemiotipi (Miller *et al.*, 1991).

L'obiettivo del presente paper è stato diretto all'analisi della popolazione di *Fusaria* agenti causali della FDS nel frumento duro in Emilia-Romagna, al fine di valutare la loro struttura quali-quantitativa, in un areale ristretto, costituito dalle zone collinari e pianeggianti delle regioni agrarie della provincia di Bologna e, alla determinazione, nell'ambito di questa popolazione, del chemiotipo di appartenenza dei ceppi di *F. graminearum* e *F. culmorum*.

Materiali e Metodi

Isolamento di *Fusarium* da spighe affette da FDS

Nel biennio 2006-2007, sono state prelevate, da campi sperimentali e da appezzamenti dislocati in diverse zone italiane, spighe di frumento duro, da varietà note e ignote, che presentavano evidenti sintomi di FDS.

Nel 2006 sono state monitorate diverse aree della pianura del bolognese e campi sperimentali soggetti a pressione naturale del patogeno. Come termine di confronto sono state analizzate spighe provenienti da coltivazioni in provincia di Modena e da località delle regioni Marche e Toscana. In totale sono stati analizzati campioni provenienti da 13 località, 54 appezzamenti e 14 varietà (Tab. 3).

Nel 2007 il monitoraggio è stato più dettagliato ed ha interessato un areale più ristretto di quello dell'anno precedente. Sono state analizzate spighe reperite da appezzamenti coltivati a frumento duro, con a volte cultivar ignote, dislocati nella pianura padana. In totale sono stati monitorati 65 appezzamenti in 32 località, di cui 26 nell'areale bolognese, 3 in provincia di Ferrara e 3 in provincia di Ravenna (Tab. 4).

Nei due anni di prova l'andamento climatico è stato alquanto differente. Nel 2006 il clima è stato più freddo e piovoso (Arpa Bollettino agrometeo 05/06), rispetto agli annali climatografici. Nel 2007, nelle aree della provincia bolognese, si è registrato un inverno mite e con poche precipitazioni, ed una primavera calda e siccitosa, rispetto all'anno precedente e ai dati storici (Arpa Bollettino agrometeo 06/07).

Nel biennio sono state collezionate 10 spighe, allo stadio di maturazione latteo cerosa, per ogni varietà e località. Dopo avere separato cariossidi dalle glume e dal rachide, le diverse parti vegetali, previa disinfezione per 5 minuti in ipoclorito di sodio al 2,5% di cloro attivo, sono state trasferite in piastra su substrato agarizzato (Potato Dextrose Agar – PDA, Difco, USA) addizionato di solfato di streptomicina, neomicina (0,003 % p/v) (Sigma).

Le piastre così preparate sono state incubate per 5 giorni in termostato, al buio e a temperatura di 25 °C. Per ogni campione sono stati piastrati 35 frammenti di tessuto.

Per ciascuno dei due anni è stata calcolata nelle spighe sintomatiche, la percentuale di presenza del genere *Fusarium* e quella delle singole specie identificate.

Identificazione delle colonie fungine

Osservazioni macro-microscopiche

I funghi sviluppati dalle cariossidi sono stati identificati mediante osservazione macroscopica e al microscopio ottico per selezionare i miceti appartenenti al genere *Fusarium*. Questi isolati sono stati rimoltiplicati singolarmente su piastre Petri di 6 cm di diametro per procedere, tramite la metodologia descritta da Balmas *et al.* (2000), alla produzione di colture monosporiche, fondamentali per ottenere colture geneticamente identiche al tipo parentale, evitando lo sviluppo di colonie fungine miste. L'identificazione al microscopio ottico delle singole colture monosporiche è stata condotta seguendo le chiavi analitiche di Nelson *et al.* (1983) e Leslie e Summerell (2006), su immagini catturate dal sistema Lumenera Infinity camera, utilizzando il software Quick Start v 4.0.02 (Canada).

Determinazione molecolare della specie

L'estrazione del DNA genomico degli isolati fungini è avvenuta utilizzando il metodo adattato dal protocollo di Lohdi *et al.* (1994) che si basa sull'uso del detergente CTAB (bromuro di esadeciltrimetilammonio) che in presenza di alte temperature (circa 60°C) ed elevate concentrazioni saline si lega agli acidi nucleici formando un complesso stabile e solubile in acqua. I campioni sono stati rimoltiplicati in piastre Petri, contenenti PDA, incubati per 7 giorni a temperatura ambiente. Il micelio d'ogni isolato fungino è stato poi messo in sacchetti di polietilene 10x15 cm, immerso in azoto liquido e frantumato. All'interno d'ogni sacchetto è stato aggiunto il tampone d'estrazione (1ml pari a 10 volte il volume iniziale), che ha la seguente composizione: 2% CTAB (Hexadecyl trimethylammonium bromide), 100 mM Tris-HCl a pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1,0 % Sodio

solfito e 1,0 % PVP-40. Per la denaturazione delle proteine il contenuto è stato versato in tubi da 1,5 ml ed incubato ad una temperatura di 65° C per 15 minuti. Dopo l'incubazione, i tubi sono stati posti in centrifuga "microfuge 22R" (Beckman) a 14.000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, 700 µl di surnatante con l'aggiunta di un ugual volume di cloroformio-isoammilico (24:1) sono stati versati in tubi sterili da 1,5 ml. Dopo averli emulsionati, sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 15 minuti. La medesima operazione è stata ripetuta prelevando da quest'ultima soluzione 550 µl di surnatante.

In seguito, dopo aver rimosso 450 µl di surnatante, sono stati aggiunti 225 µl di una soluzione 5M di NaCl pH8 e 450 µl d'isopropanolo, il tutto è stato posto a -20°C. Dopo un periodo di almeno un'ora mediante una centrifugazione di 15 minuti a 14.000 rpm, è stata rimossa la porzione liquida e lavato il pellet aggiungendo 500 µl di una soluzione di etanolo 70%. L'etanolo è stato rimosso dopo centrifugazione per 15 minuti a 14.000 rpm ed il campione è stato posto in una campana a vuoto per asciugare il pellet dai residui di etanolo. Il DNA è stato poi risospeso in 50 µl di acqua distillata sterile.

La conferma dell'appartenenza alle specie *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. poae* è stata effettuata tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) con l'utilizzo di primers specifici Fg16F/R (5'-CTCCGATAT-GTTGCGTCAA-3'/5'-GGTAGGTATCCGACATGGC AA-3') (Nicholson *et al.*, 1998), Fc01F/R (5'-ATG GTG AAC TCG TCG TGG C-3'/5'-CCC TTC TTA CGC CAA TCT CG-3') (Nicholson *et al.*, 1998) e Fp82F/R (5'-CAAGCAAAC AGGCTCTTACC-3'/5'-TGTTCCACCTCAGTGACAGGTT-3') (Parry e Nicholson, 1996) seguendo le condizioni suggerite dagli autori.

L'amplificazione è stata ottenuta attraverso il termociclatore, Thermocycler Biometra T3 (Germany), utilizzato in questa tesi in tutte le prove in cui si è applicata la tecnica PCR.

Determinazione del chemiotipo nella popolazione di *F. graminearum* e *F. culmorum*

I chemiotipi sono stati determinati per 74 ceppi di *F. graminearum* (Tab. 5) e per 22 ceppi di *F. culmorum* (Tab. 6), in parte collezionati nei due anni ed altri presenti nella micoteca del laboratorio di Micologia Fitopatologica del DiSTA. Ceppi di riferimento sono stati forniti dalla collezione ITEM (CNR, Bari), insieme ad un isolato identificato come *F. pseudograminearum*. Per la caratterizzazione dei ceppi di *F. graminearum* è stata utilizzata una versione multipla (Starkey *et al.*, 2007) della PCR chemiotipo specifica validata da Ward nel 2002. I due set di primers specifici per ogni chemiotipo disegnati sulle regioni geniche tricotecene 15-O-acetiltrasferasi (*Tri3*) e tricotecene efflux pump (*Tri12*) (Ward *et al.*, 2002). Gene *Tri3*: primer comune per tutti i tre chemiotipi (3CON) con altri tre primer chemiotipo-

specifici per 15ADON (3D15A), 3ADON (3D3A) and NIV (3NA). Gene *Tri12*: primer comune per tutti i tre chemiotipi (12CON) con altri tre primer chemiotipo-specifici per 15ADON (12-15F), 3ADON (12-3F) and NIV (12NF) (Tab. 1).

Per la reazione sono stati utilizzati 10 ng di DNA fungino, in un volume finale di 10 µl, con l'aggiunta di 0,5 unità di GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), tampone 5X Green GoTaq Flexi Buffer, dNTPs 0,2 mM, MgCl 2,5 mM e 2,5 pmol di ogni primers. La PCR è stata caratterizzata da un'iniziale denaturazione di 2' a 94°C, seguita da 25 cicli di 30'' a 94°C, 30'' a 52°C ed 1' a 72°C.

Tabella 1: Primers utilizzati per la caratterizzazione dei chemiotipi di *F. graminearum* (Starkey *et al.*, 2007).

primers	sequenze
3CON	5'-TGGCAAAGACTGGTTCAC-3'
3NA	5'-GTGCACAGAATATACGAGC-3'
3D15A	5'-ACTGACCCAAGCTGCCATC-3'
3D3A	5'-CGCATTGGCTAACACATG-3'
12CON	5'-CATGAGCATGGTGATGTC-3'
2NF	5'-TCTCCTCGTTGTATCTGG-3'
12-15F	5'-TACAGCGGTCGCAACTTC-3'
12-3F	5'CTTTGGCAAGCCCGTGCA-3'

Per caratterizzare i chemiotipi dei ceppi di *F. culmorum* sono stati utilizzati primers specifici diretti ai geni *Tri3* e *Tri7* (Quarta *et al.*, 2005) (Tab. 2). Le coppie di primers *Tri3F971/Tri3R1679* e *Tri3F1325/Tri3R1679* identificano rispettivamente i chemiotipi 15-ADON e 3-ADON, mentre i primers *Tri7F340/Tri7R965* identificano i ceppi del chemiotipo NIV.

Tabella 2 : Primers utilizzati per la caratterizzazione dei chemiotipi di *F. culmorum*.

primers	sequenze
<i>Tri3F971</i>	5'-CAT CAT ACT CGC TCT GCTG- 3'
<i>Tri3F1325</i>	5' -GCA TTG GCT AAC ACA TGA- 3'
<i>Tri3R1679</i>	5' -TT(AG) TAG TTT GCA TCA TT(AG) TAG- 3'
<i>Tri7F340</i>	5' -ATC GTG TAC AAG GTT TACG- 3'
<i>Tri7R965</i>	5' -TTC AAG TAA CGT TCG ACA AT- 3'

Per la reazione sono stati utilizzati 10 ng di DNA fungino, in un volume finale di 25 µl, con l'aggiunta di 0,75 unità di GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), tampone 5X Green GoTaq Flexi Buffer, dNTPs 0,2 mM, MgCl 3 mM e 2,5 pmol di ogni primers. La PCR per testare i campioni con le coppie di primers *Tri3F971/Tri3R1679* e *Tri3F1325/Tri3R1679* è stata caratterizzata da una iniziale denaturazione di 2' a 94°C, seguita da 25 cicli con 30'' a 94°C per la denaturazione, 30'' a 53°C per annealing, 1' a 72°C di estensione ed una estensione finale di 5'. Le condizioni della PCR per la coppia di primers *Tri7F340/Tri7R965* sono state le stesse eccetto che per la fase di annealing, dove la temperatura è stata di 50 °C. Tutti gli ampliconi ottenuti per la caratterizzazione del chemiotipo sono stati separati in gel di agarosio al 1.5%, colorati con bromuro d'etidio, visualizzati in luce UV e stimati per dimensione attraverso comparazione con marker 100 bp DNA ladder (Promega, USA).

Risultati

Caratteristiche morfologiche

Morfologia di *F. graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae* Schwein (Petch))

Le colonie di *F. graminearum*, accresciute su PDA, presentano crescita rapida, con abbondante produzione di micelio aereo, con colorazioni che vanno dal bianco-crema, all'arancione fino al rosso. Gli sporodochi di colore rosso-marrone sono prodotti lentamente (> 30 giorni). Su PDA il retro della colonia assume colorazione rosso carminio. I microconidi non sono prodotti. I macroconidi, a parete spessa, sono allungati e stretti, con lunghezza media 46-75 x 3,5-5µm. Presentano da 5 a 6 setti, in genere abbastanza distinti, una parete ventrale quasi dritta e una dorsale leggermente arcuata. La cellula basale presenta un piede ben formato. La cellula apicale è assottigliata e leggermente a becco. In relazione con le altre specie, i macroconidi soprattutto in colture artificiali di *F. graminearum* non sono molto abbondanti. Le clamidospore sono prodotte raramente e, quando presenti, si formano sui macroconidi.

Morfologia di *F. culmorum*

F. culmorum cresce rapidamente su PDA, presenta un micelio aereo feltroso con colorazione dapprima bianca poi progressivamente tendente al rosso-arancio, mentre il retro della colonia assume una colorazione rossa. In alcuni isolati con condizioni alternate di luce e temperatura si possono evidenziare delle zonature circolari che mostrano la produzione di masse conidiali. Queste sono riunite in sporodochi, inizialmente di colore arancio, ma che col tempo virano a

marrone con tonalità più o meno intense. Anche in questa specie i microconidi sono assenti. I macroconidi, con 3 o 4 setti, presentano una parete dorsale piuttosto curva, mentre quella ventrale è quasi dritta. Appaiono piuttosto tozzi e corti con dimensioni variabili 35-50 x 5-6 µm. La cellula apicale è arrotondata e generalmente smussata. La cellula basale ha un piede appena accennato, più marcato in alcuni isolati. Le clamidospore abbondanti, possono essere singole, a catena, in gruppo in posizione intercalare, occasionalmente terminali, e si formano sulle ife o sui macroconidi.

Morfologia di *F. poae*

F. poae cresce rapidamente su PDA, presenta un micelio aereo con colorazione dapprima bianca e progressivamente tendente al rosso-grigiastro. A volte, quando si formano i microconidi, si nota un aspetto polverulento. Spesso sono prodotti pigmenti rossi o gialli che inducono una colorazione all'agar. Le colture hanno un caratteristico odore dolciastro o di cuoio. I microconidi sono abbondanti, globosi o ovato papillati, generalmente unicellulari solo raramente con 1 setto. Sono portati da conidiofori corti e ramificati in cellule conidiogene rappresentate da monofialidi, in cui a volte è possibile distinguere il collaretto. I macroconidi non molto caratteristici, hanno da 3 a 5 setti (20-40 x 3,5-5 µm), presentano la cellula basale a forma di piede. Le clamidospore sono generalmente assenti.

Morfologia di *F. sporotrichioides*

F. sporotrichioides cresce rapidamente su PDA, presenta un micelio aereo, dapprima bianco poi progressivamente tendente al rosso. Produce una pigmentazione rossa all'agar. I microconidi sono abbondanti, piriformi unicellulari o ovali a volte con 1 setto e sono portati da polifialidi. I macroconidi, la cui produzione è stimolata dalla luce near UV, sono falciformi con la cellula apicale curva ed appuntita e cellula basale scarsamente differenziata. Hanno 3-5 setti e misurano 25-55 x 3,5-5 µm. Le clamidospore globose si trovano lungo l'ifa, singole o in catena.

Morfologia di *F. avenaceum* (teleomorfo: *Gibberella avenaceae* Cook)

La morfologia delle colonie di *F. avenaceum* su PDA è variabile: il micelio in genere è pionnotico ma può anche essere aereo, con una colorazione che varia dal rosso carminio a rosso-grigiastro o marrone chiaro. Le masse conidiali formano sporodochi abbondanti di colore arancio-bruno. I macroconidi sono sottili, allungati, abbastanza dritti da 4 a 7 setti (40-80 x 3,5-4 µm). Presentano la cellula apicale allungata e appuntita. I microconidi sono molto scarsi e prodotti solo da alcuni isolati. Le clamidospore sono assenti.

Morfologia di *F. tricinctum* (Corda) Sacc. (teleomorfo *Gibberella tricincta* El-Gholl, McRitchie, Schoulties & Ridings)

F. tricinctum su PDA ha una crescita più lenta di *F. graminearum*. Presenta un micelio compatto rosa o rosso-carminio con un caratteristico bordo più chiaro. I microconidi sono variabili: napiformi, ovali, piriformi o reniformi raramente con 1 setto e di norma unicellulari. Le cellule conidiogene sono monofialidi che possono portare all'apice i microconidi riuniti in false teste. I macroconidi sono relativamente abbondanti, allungati con cellula apicale curva ed appuntita e cellula basale con piede ben formato, 3-5 setti (25-50 x 3-4 µm). Le clamidospore sono presenti solo in alcuni isolati.

Morfologia di *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg

(teleomorfo *Gibberella intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg & Seifert)

F. proliferatum su PDA presenta un micelio aereo, cotonoso inizialmente bianco poi con colorazione rosso-violetta. I microconidi, abbondanti, in catene, sono unicellulari, ovoidali con base tronca e generalmente portati da polifialidi. I macroconidi, con 3-5 setti, sono allungati (25-60 x 2,5-4 µm), generalmente dritti e con pareti quasi parallele. La cellula apicale è curva, quella basale non differenziata. Le clamidospore sono assenti.

Determinazione molecolare della specie

Per verificare l'appartenenza dei miceti isolati alla specie *F. graminearum* si è estratto il DNA da oltre 100 campioni e per la specie *F. culmorum* da 35. La presenza della banda a 400bp caratterizza la specie *F. graminearum* mentre a 570 bp la specie *F. culmorum*.

Popolazione dei *Fusaria* presente in spighe affette da FDS

I dati percentuali di presenza del genere *Fusarium*, e delle specie *F. graminearum* (Fg), *F. culmorum* (Fc), *F. poae* (Fp), *F. avenaceum* (Fa), *F. tricinctum* (Ft), *F. proliferatum* (Fpr), *F. sporotrichioides* (Fs) e delle specie non identificate (*F. spp*) sono riportati, per località e per varietà, nelle tabelle 3 e 4, rispettivamente per il 2006 e 2007.

Nel 2006 *Fusarium* è stato isolato da 12 località su 13. Infatti gli unici isolamenti che hanno dato risultato negativo per tale genere fungino sono stati quelli provenienti da Cadriano (Tab. 3). Da 4 località è stato isolato solo *Fusarium* e da 8 (66%), almeno su una varietà, solo la specie *F. graminearum*.

F. culmorum è stato reperito in 2 località dell'areale bolognese mentre *F. avenaceum* non è mai stato riscontrato. Al contrario, la presenza di *F. poae* è risultata rilevante soprattutto nel materiale prelevato ad Idice (Tab. 3).

Gli isolati provenienti dagli appezzamenti di Castelfranco dell'Emilia, nell'area modenese, rispecchiano la situazione dell'areale bolognese. Le percentuali d'isolamento del genere *Fusarium* sono state nettamente diverse fra le due località della regione Marche e la specie predominante è comunque risultata *F. graminearum* (Tab. 3). La maggior parte degli isolati di *Fusarium* reperiti da spighe coltivate a Grosseto (regione Toscana) non è stata identificata. I rimanenti isolati da quest'area sono stati ascritti alla specie *F. culmorum*.

Da almeno un campione di ognuna delle 14 varietà delle diverse località esaminate è sempre stato isolato *Fusarium* (Tab. 3). La specie *F. graminearum* è stata riscontrata in 8 delle varietà saggiate e *F. poae* in 7, mentre *F. culmorum* è stato identificato solo in 4 varietà. In generale sono state isolate da 1 a 3 specie di *Fusarium* per varietà, mentre per Simeto sono state identificate tutte le specie in studio tranne *F. sporotrichioides* (Tab. 3).

Nel 2007 *Fusarium* è stato isolato da 20 località su 32 (Tab. 4). Da 3 località, di cui solo Cadriano prettamente nell'areale bolognese, è stato isolato *Fusarium* al 100% almeno da una varietà, mentre da 5 località unicamente la specie *F. graminearum*.

F. culmorum è stato reperito al 100% nei campioni di Granarolo e di Ravenna. *F. avenaceum* è stato isolato esclusivamente a Cadriano. La presenza di *F. poae* è risultata rilevante in diverse località (Tab. 4). Le aree collinari sono risultate meno colpite dalla Fusariosi, infatti in nessuna area di prelievo collinare è stato possibile isolare Fusaria dalle spighe che presentavano anomalie. Solamente in località Ganzole, un'area del primo Appennino tra le valli del Reno e del Savena, tra Pianoro e Sasso Marconi, è stato isolato *F. poae* (Tab. 4). In molti campionamenti essendo la varietà non nota non è stato possibile analizzare tale parametro.

Tabella 3: Valori percentuali medi di *Fusarium* riferiti all'anno 2006.

Legenda: **Fus**= genere *Fusarium*, **Fg**=*F. graminearum*, **Fc**= *F. culmorum*, **Fp**= *F. poae*, **Fa**= *F. avenaceum*, **Ft**=*F. tricinctum*, **Fpr**= *F. proliferatum*, **Fs**= *F. sporotrichioides* e **F.spp** specie non identificata.

	Località	Varietà	Fus	Fg	Fc	Fp	Ft	Fpr	Fs	F.spp		Località	Varietà	Fus	Fg	Fc	Fp	Ft	Fpr	Fs	F.spp	
1	BO Idice	Duilio	14			100					7	BO -S.Pietro Capofiume	S. Carlo	100	100							
1	Idice	Levante	39	10		90					8	BO Minerbio	Levante	35	70							30
1	Idice	Meridiano	25			100					8	Minerbio	Meridiano	0								
1	Idice	Neodur	0								8	Minerbio	Neodur	92								100
1	Idice	Orobel	4							100	8	Minerbio	Orobel	32								100
1	Idice	Simeto	29	25		75					8	Minerbio	Simeto	0								
1	Idice	Neolatino	0								8	Minerbio	Neolatino	50	100							
1	Idice	Saragolla	0								8	Minerbio	Saragolla	50	100							
1	Idice	Normanno	0								8	Minerbio	Normanno	21			83					17
2	BO Ozzano	Neodur	0								8	Minerbio	AncoMarzio	0								
2	Ozzano	Orobel	4					100			8	Minerbio	Claudio	0								
2	Ozzano	Saragolla	100				100				9	Imola	Duilio	14			100					
3	BO Cadriano	Duilio	0								10	AN- Jesi	Serio	39	100							
4	BO	Levante	25					100			10	Jesi	Simeto	43		10		90				
4	BO	Meridiano	25						100		10	Jesi	S. Carlo	85	92		8					
4	BO	Neodur	14		10					90	11	MC-Tolentino	Orobel	0								
4	BO	Orobel	7					100			11	Tolentino	Duilio	0								
4	BO	Simeto	57				35	65			11	Tolentino	Simeto	25	100							
4	BO	Neolatino	4	100							12	GR	Duilio	0								
4	BO	Saragolla	17	100							12	GR	Levante	0								
4	BO	Normanno	0								12	GR	Meridiano	0								
4	BO	AncoMarzio	17						100		12	GR	Neodur	0								
4	BO	Claudio	21			100		100			12	GR	Orobel	100		30						70
4	BO	S. Carlo	0								12	GR	Simeto	35		50						50
5	BO - Baricella	Levante	25	100							13	MO - Castelfranco	Claudio	50			50	50				
5	Baricella	Duilio	61	75	25						13	Castelfranco	S. Carlo	100	80			20				
6	Malalbergo	Saragolla	25	100							13	Castelfranco	Tripudio	50	100							

Tabella 4: Valori percentuali medi di *Fusarium* riferiti all'anno 2007.

Legenda: **Fus**= genere *Fusarium*, **Fg**=*F. graminearum*, **Fc**= *F. culmorum*, **Fp**= *F. poae*, **Fa**= *F. avenaceum*, **Ft**=*F. tricinctum*, **Fpr**= *F. proliferatum*, **Fs**= *F. sporotrichioides* e **F.spp** specie non identificata

	Località	Varietà	Fus	Fg	Fc	Fp	Fa	Ft	Fspp		Località	cv	Fus	Fg	Fc	Fp	Fa	Ft	Fspp
1	BO- Anzola	Nd	0							6	BO- Casadio	Nd	0						
2	BO- Argelato	Nd	57	20					80	7	BO- Casalecchio	Nd	0						
2	Argelato	Nd	21			100				8	BO- Casella	Nd	7			50			50
2	Argelato	Nd	64	100						9	BO- Castelbolognese	Nd	0						
2	Argelato	Nd	82						100	10	BO- Castelguelfo	Nd	60			100			
2	Argelato	Nd	0							11	BO- Castelmaggiore	Nd	10	100					
3	BO- Bubano	Nd	17			100				12	BO- Colunga	Nd	90	80					20
4	BO- Caab	Nd	0							13	BO- Ganzole	Nd	75			100			
5	BO- Cadriano	Claudio	14	100						14	BO- Granarolo	Nd	52		100				
5	Cadriano	Tiziana	100			50			50	14	BO- Granarolo	Nd	33			100			
5	Cadriano	Saragolla	100					100		15	BO- Imola	Nd	7						100
5	Cadriano	Asdrubal	42	20			80			15	BO- Imola	Nd	17			100			
5	Cadriano	Sant'Agata	100		20			80		16	BO- Loiano	Nd	0						
5	Cadriano	Casanova	75				60	40		17	BO- Marano di Castenaso	Nd	0						
5	Cadriano	Virgilio	35				40	60		17	Marano di C.	Nd	33			100			
5	Cadriano	Grazia	100				50	20	30	18	BO- Mercatale	Nd	0						
5	Cadriano	Vendetta	90	100						19	BO- Monghidoro	Nd	0						
5	Cadriano	Giusto	60						100	20	BO- Monterenzio	Nd	0						
5	Cadriano	Simeto	75						100	21	BO- Paderno	Nd	17			100			
5	Cadriano	Capri	50				10			22	BO- Pianoro	Nd	0						
5	Cadriano	Saragolla	70	100						23	BO- Pieve di Cento	Nd	50						100
5	Cadriano	Duilio	100					100		24	BO- S. Antonio di Medicina	Nd	28	80					20
5	Cadriano	Meridiano	50				10			25	BO- Sala Bolognese	Nd	0						
5	Cadriano	Iride	100				10			26	BO- Sasso Marconi	Nd	35			80			20
5	Cadriano	Valerio	60						100	26	Sasso Marconi	Nd	0						
5	Cadriano	Casanova	7					100		27	FE - Argenta	Nd	71						100
5	Cadriano	Normanno	75					100		28	FE- S. Agostino	Nd	100	100					
5	Cadriano	Dylan	75					30	70	29	FE- S. Matteo Decima	Nd	67			100			
5	Cadriano	Provenzal	50					80	20	30	RA- Bagnacavallo	Nd	33	100					
5	Cadriano	Ariosto	50					80	20	31	RA- Bagnara	Nd	0						
5	Cadriano	Neolatino	100					70	30	32	RA- Voltana	Nd	100		100				
5	Cadriano	Catervo	100				10												
5	Cadriano	Orobel	100					100											
5	Cadriano	Canyon	100				80		20										

Le percentuali relative alle specie dei *Fusaria* isolati, indipendentemente dalla zona e varietà di reperimento, sono visualizzate nei grafici 1 e 2, rispettivamente per il 2006 e 2007.

Nel 2006 *F. graminearum* costituiva il 42% degli isolati, *F. poae* il 16%, *F. tricinctum* 14%, *F. proliferatum* 9% e *F. culmorum* solo il 3% (Grafico 1).

Nel 2007, *F. poae* risultava il più rappresentato con il 24% di presenza, *F. tricinctum* è stato ritrovato nel 21% dei frammenti piastrati, *F. graminearum* nel 18%, *F. avenaceum* e *F. culmorum* rispettivamente con frequenze dell' 8% e 5% (Grafico 2).

Grafico 1: Suddivisione percentuale delle specie di *Fusarium* reperite nel campionamento effettuato nel 2006.

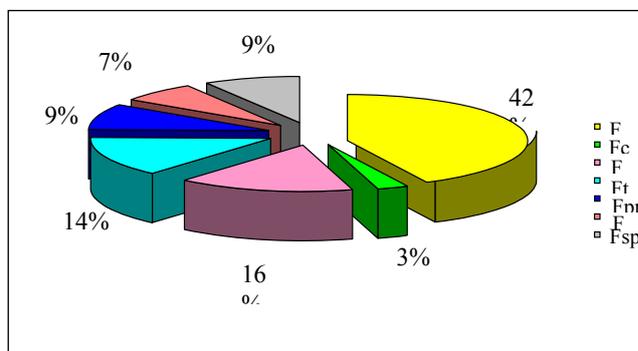
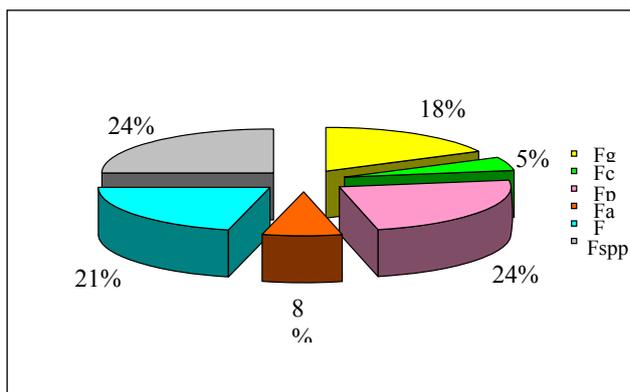


Grafico 2: Suddivisione percentuale delle specie di *Fusarium* reperite nel campionamento effettuato nel 2007.



Legenda: **Fg**=*F. graminearum*, **Fc**= *F. culmorum*, **Fp**= *F. poae*, **Fa**= *F. avenaceum*, **Ft**=*F. tricinctum*, **Fpr**= *F. proliferatum*, **Fs**= *F. sporotrichioides* e **F.spp** specie non identificata

Caratterizzazione dei chemiotipi

Discussione

Il quadro emerso dall'indagine conoscitiva sugli agenti causali della FDS in Emilia Romagna, ricalca la situazione nord Europea descritta per il frumento tenero, duro e orzo (Pancaldi e Torricelli, 1999; Pancaldi e Alberti, 2001; Infantino *et al.*, 2001; Pascale *et al.*, 2000, 2001; Pasquini *et al.*, 2001; Bottalico e Perrone, 2002; Waalwijk *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Osborne e Stein, 2007). L'importanza relativa delle specie di *Fusarium* isolate si riflette sulla struttura della popolazione associata ai sintomi di FDS.

Nell'areale Bolognese *F. graminearum* è risultato essere sempre ben rappresentato nei due anni di indagine, con una riduzione nel 2007, anno in cui la stagione non è stata favorevole all'infezione, a causa delle scarse piogge nel periodo della fioritura e dell'anticipo sulle fasi fenologiche.

F. poae è considerato essere il micete, associato a FDS, meno aggressivo ed è stato ritrovato in elevate percentuali nel 2007. Quest'organismo è risultato essere presente, con una percentuale superiore al 50% rispetto agli altri miceti associati a FDS specialmente nell'anno in cui la stagione sembrava essere meno propizia per lo sviluppo di *F. graminearum*, in accordo con quanto rilevato da Parry *et al.* (1995), assumendo così un ruolo sempre più importante nel complesso FDS (Pisi *et al.*, 2008; Vogelgsang *et al.*, 2008).

Anche *F. culmorum* è favorito nelle aree centrali della penisola e nel nord Europa e sembra più competitivo nelle stagioni più asciutte (Balmas e Corazza, 1994). In questa indagine, nell'annata 2007, caratterizzata da una primavera calda e siccitosa e quindi meno favorevole a *F. graminearum*, sono stati registrati i valori più alti di *F. culmorum* che mediamente non sono mai stati superiori al 5% (grafici 1 e 2).

La presenza di *F. avenaceum* e *F. tricinctum* in frumento duro in Italia, avviene specialmente negli anni in cui la conduttività di *F. graminearum* è ridotta (Balmas e Corazza, 1994; Casulli *et al.*, 1995; Pancaldi e Torricelli, 1999).

PAPER 2

VARIABILITÀ GENETICA DI *F.*
GRAMINEARUM
IN AREALI COLTIVATI A FRUMENTO
DURO
IN EMILIA ROMAGNA

Premessa

Il complesso *F. graminearum* è un insieme monofiletico di almeno 13 specie filogenetiche, suddivise in 8 Lineages, alcune delle quali hanno una specifica origine biogeografica (O'Donnell *et al.*, 2000, 2004, 2008; Ward *et al.*, 2002; Starkey *et al.*, 2007). *F. graminearum* in senso stretto, Lineage 7 (O'Donnell *et al.*, 2000), è la specie più diffusa come agente causale della FDS nell'emisfero Nord, e l'unica del complesso *F. graminearum* segnalata per il momento in Italia. *F. meridionale* Aoki, Kistler, Geiser et O'Donnell (Lineage 2) è diffuso in tutto l'emisfero sud ed è considerato essere poco aggressivo nei confronti del frumento (Toth *et al.*, 2008). *F. acacieae-mearnsii* (Lineage 5), localizzato solo in Sud Africa, è aggressivo verso il frumento, *F. asiaticum* (Lineage 6) (O'Donnell *et al.*, 2000) è responsabile della FDS in molte parti dell'Asia (O'Donnell *et al.*, 2004) e *F. vorosii* è stato segnalato in Giappone ed Ungheria, attraverso uno studio sulla variabilità genetica degli isolati europei con la tecniche RAPD ed IGS-RFLP, da Toth e collaboratori nel 2005.

Questi organismi possono essere identificati con certezza solo attraverso un approccio di genealogia poligenica, GCPSR (genealogical concordance phylogenetic species recognition) (Taylor *et al.*, 2000). L'analisi comparativa degli ampliconi derivati dalla coppia di primers Fg16F/R (Nicholson *et al.*, 1998) può essere utilizzata per visualizzare un' inserzione/delezione che coinvolge un frammento di 86 pb (Waalwijk *et al.*, 2003) presente nei Lineage 2 *F. meridionale* e 6, *F. boothii* O'Donnell, T. Aoki, Kistler, Geiser (nella distribuzione geografica lineage 6 è chiamato *asiaticum*) e assente nel lineage 7 *F. graminearum*. Ripetizioni di 30 bp in numero di 1, 2, 3 o 4 copie nel frammento Fg16F/R presenti in tutti i membri del complesso *F. graminearum* possono dare indicazioni sulla variabilità della popolazione dando origine ad ampliconi che variano da 400 a oltre 500 bp (Carter *et al.*, 2002; Waalwijk *et al.*, 2003).

Lo studio RAPD aveva già contribuito nell'ambito di *F. graminearum* s.l, alla distinzione tra il Gruppo I e il Gruppo II (Purss, 1971; Francis e Burgess, 1977), distinzione che, in seguito, ha portato alla riclassificazione di *F. graminearum* Gruppo I a *Fusarium pseudograminearum* (Aoki e O'Donnell, 1999). Questa tecnica, oltre all'utilizzo nello studio delle relazioni genetiche tra le diverse specie, è stata utilizzata con successo nelle indagini sulla variabilità

genetica a livello interspecifico (Schilling *et al.*, 1997; Toth, 2005; Voigt *et al.*, 1995) e nella vigilanza sull'introduzione di nuove razze o di nuove specie del complesso *F. graminearum* (Miller *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2000).

Lo scopo di questo paper è stato quello di caratterizzare gli isolati di *F. graminearum* s.s. reperiti prevalentemente da coltivazioni di frumento duro delle aree italiane settentrionali, ed in particolare dell'Emilia Romagna. La variabilità genetica nella popolazione di *F. graminearum* s.s. in una area ristretta, ma caratterizzata da elevata variabilità ambientale e climatica, come l'areale bolognese, è stata studiata con il polimorfismo dei prodotti PCR (SCAR) e lo studio dei profili di amplificazione casuale del DNA (RAPD).

Materiali e Metodi

Origine degli isolati

47 isolati di *F. graminearum*, già caratterizzati per chemiotipo, e del ceppo 398, *F. pseudograminearum*, utilizzato come gruppo esterno, sono stati selezionati per le analisi (Tab. 1). La maggior parte degli isolati proviene da aree dell'Emilia-Romagna interessate dalla coltura di frumento duro, nove dalle Marche, due dalla Lombardia ed uno dalla Basilicata. Tre isolati provengono da frumento tenero ed uno da mais.

Per le indagini molecolari sono state utilizzate colonie monoconidiche. Il DNA è stato estratto secondo il metodo CTAB visto nel paper I (pag. 29) e quantificato allo spettrofotometro.

Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)

E' stata usata la coppia di primers Fg16F/R (Nicholson *et al.*, 1998) per l'analisi, che è stata condotta come descritto da Carter *et al.* (2000)(Paper 1 pag. 30). I prodotti sono stati separati in gel di agarosio al 2%, colorati con bromuro di etidio e visualizzati in luce UV. La dimensione degli ampliconi è stata stimata per comparazione con marker 100 bp (Promega, USA).

Tabella 1: Dati relativi ai 47 isolati di *F. graminearum* ed 1 di *F. pseudograminearum*

N.ro ceppo	Località	Ospite	cv / n° collezione	Chemiotipo	N.ro ceppo	Località	Ospite	cv / n° collezione	Chemiotipo
10	Bologna	<i>Zea</i>	/	15-ADON	421	Ancona	<i>T. durum</i>	S.Carlo	15-ADON
134	Ancona	<i>T. durum</i>	/	15-ADON	422	Ancona	<i>T. durum</i>	S.Carlo	15-ADON
296	Bologna	<i>T. durum</i>	Simeto	15-ADON	423	Ancona	<i>T. durum</i>	S.Carlo	15-ADON
349	Imola	<i>T. durum</i>	ISPAVE1502	15-ADON	424	Ancona	<i>T. durum</i>	Saragolla	15-ADON
352	Idice	<i>T. durum</i>	Simeto	15-ADON	428	Ancona	<i>T. durum</i>	Serio	15-ADON
353	Baricella	<i>T. durum</i>	Meridiano	15-ADON	430	Ancona	<i>T. durum</i>	Serio	15-ADON
354	Baricella	<i>T. durum</i>	Meridiano	15-ADON	433	Ancona	<i>T. durum</i>	Ancomarzio	15-ADON
359	Baricella	<i>T. durum</i>	Neodur	15-ADON	465	Baricella	<i>T. durum</i>	Neolatino	NIV
364	Baricella	<i>T. durum</i>	Orobcl	15-ADON	467	Baricella	<i>T. durum</i>	Neolatino	15-ADON
370	Baricella	<i>T. durum</i>	Simeto	15-ADON	469	Baricella	<i>T. durum</i>	Neolatino	15-ADON
375	Baricella	<i>T. durum</i>	Neodur	15-ADON	470	Baricella	<i>T. durum</i>	Neolatino	15-ADON
380	Lombardia	<i>T. durum</i>	ITEM 126	3-ADON	476	Baricella	<i>T. durum</i>	Normanno	15-ADON
384	Basilicata	<i>Panicus</i>	ITEM 641	NIV	477	Baricella	<i>T. durum</i>	Normanno	15-ADON
387	Baricella	<i>T. durum</i>	Simeto	15-ADON	478	Baricella	<i>T. durum</i>	Normanno	15-ADON
388	Baricella	<i>T. durum</i>	Simeto	15-ADON	502	Baricella	<i>T. durum</i>	Saragolla	15-ADON
390	Baricella	<i>T. durum</i>	Orobcl	15-ADON	506	Baricella	<i>T. durum</i>	Simeto	15-ADON
391	Baricella	<i>T.aestivum</i>	Bologna	15-ADON	531	Castelfranco	<i>T. durum</i>	S.Carlo	15-ADON
392	Bologna	<i>T.aestivum</i>	Bologna	15-ADON	532	Castelfranco	<i>T. durum</i>	S.Carlo	15-ADON
393	Parma	<i>T. durum</i>	Simeto	3-ADON	548	Malalbergo	<i>T. durum</i>	Saragolla	NIV
394	Ferrara	<i>T. durum</i>	Simeto	15-ADON	553	Minerbio	<i>T. durum</i>	Levante	15-ADON
396	Parma	<i>T. durum</i>	Simeto	3-ADON	554	Minerbio	<i>T. durum</i>	Neolatino	15-ADON
397	S.A Lodigiano	<i>T.aestivum</i>	Eridiano	3-ADON	559	Minerbio	<i>T. durum</i>	Saragolla	15-ADON
398 G1	/	/	ISPAVE 218	NIV	560	Minerbio	<i>T. durum</i>	Saragolla	15-ADON
420	Ancona	<i>T. durum</i>	S.Carlo	15-ADON	567	S. Pietro Capofiume	<i>T. durum</i>	S.Carlo	15-ADON

Clonaggio dei prodotti di PCR

Due degli ampliconi ottenuti appartenenti ai ceppi 396 e 364 sono stati clonati in *Escherichia coli* ceppo 1022.

Preparazione delle cellule di *Escherichia coli* per elettroporazione

Una sospensione di cellule di *Escherichia coli* (10µl) ceppo 1022, conservate a -80 °C in glicerolo al 50%, è stata allevata per tutta la notte (over night O/N) a 37°C in agitazione in una beuta con 10 ml di mezzo di coltura liquido sterile (LB). Successivamente è stato prelevato 1 ml ed è stato aggiunto a 250 ml di LB. La colonia è stata accresciuta a 37°C in agitazione fino al raggiungimento di un'assorbanza, a 600 nm, pari a 0,6 OD.

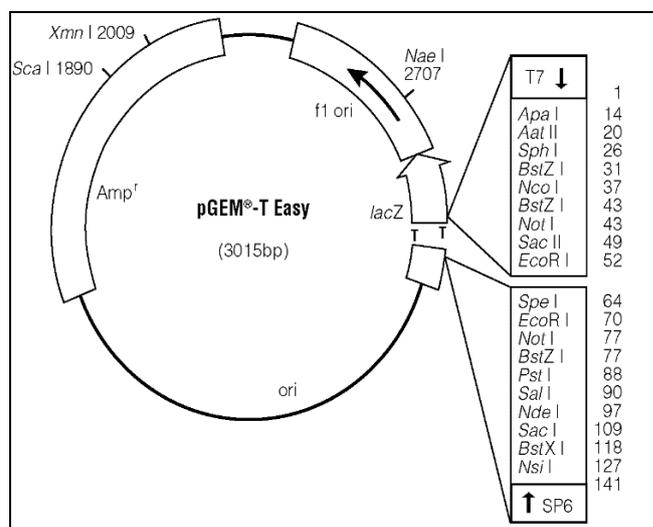
Il prodotto è stato trasferito in tubi falcon da 50 ml e centrifugato a 2600 r.p.m. per 15 minuti a 4 °C. Il pellet è stato risospeso con 50 ml di acqua ultrapura sterile (MilliQ) per ogni tubo falcon e centrifugato a 2600 r.p.m. per 15 minuti. L'operazione è stata ripetuta altre 2 volte aumentando la velocità della centrifugazione a 5000 r.p.m. e 7500 r.p.m. rispettivamente. Il pellet è stato risospeso in un volume finale di 2 ml di glicerolo al 10% e suddiviso in aliquote da 100 µl ognuna per poi conservarli a -80 °C.

Estrazione della banda elettroforetica, reazione di ligasi e trasformazione mediante il kit pGEM-T Easy Vector System (Promega)

Dopo aver eseguito una corsa elettroforetica su gel di agarosio i prodotti specifici di PCR sono stati estratti tagliando le porzioni di gel e purificate mediante il kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega), seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice.

La reazione di ligasi e la trasformazione sono state effettuate impiegando il plasmide pGEM-T Easy (Fig.1), incluso nel kit pGEM-T Easy Vector System (Promega).

Figura1: Rappresentazione grafica del plasmide pGEM-T Easy (Promega).



Di tale fase acquosa, contenente il prodotto di PCR, per la reazione di ligasi, sono stati impiegati 1,5 µl, unitamente a 5 µl di T4 DNA ligasi 2X buffer, 0,75 µl di Vettore PGEM-T Easy (Promega), 0,75 µl di T4 DNA ligasi e 1 µl di acqua distillata sterile. Il volume totale di 10 µl, così ottenuto, è stato incubato O/N a 4 °C.

Il prodotto della reazione di Ligasi è stato portato ad un volume finale di 400 µl con acqua distillata sterile e successivamente sono stati aggiunti 400 µl di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (in rapporto 25:24:1 con pH 4,5. Fluka), il tutto è stato centrifugato per 15 minuti a 14.000 g a temperatura ambiente; la fase acquosa (circa 370 µl) è stata prelevata con aggiunta di 16 µl di NaCl 5M, 1 µl di glicogeno (10 mg/ml) e 2 volumi di EtOH 100% freddo, il tutto è stato posto per 10 minuti a -20°C ed in seguito centrifugato per 20 minuti a 14.000 r.p.m. a 4 °C. Il pellet ottenuto è stato lavato con 500 µl di EtOH al 70% e centrifugato per 4 minuti a 14.000 g a 4 °C. La fase acquosa è stata eliminata ed il pellet è stato asciugato sottovuoto e risospeso con 3 µl di H₂O distillata sterile. 1,5 µl del prodotto di Ligasi così pulito, miscelati con 30 µl di cellule di *E. coli*. sono stati usati per la trasformazione. Le cellule sono state trasformate con elettroporatore (Electroporator 2510, Eppendorf) ad una potenza di 2500V e successivamente sono stati aggiunti 500 µl di LB liquido. Il tutto è stato incubato a 37°C per 30 minuti. La coltura liquida è stata inoculata su una piastra Petri contenente un mezzo LB addizionato di 35 g di agar per litro + ampicillina (100 µg/ml), IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; 0,5 mM) e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside; 80 µg/ml). Le piastre sono state incubate a 37 °C O/N.

Al fine di verificare se il prodotto di PCR clonato nel vettore plasmidico, fosse quello desiderato, oltre alla risposta cromatica delle colonie (Blu-Bianco), è stata eseguita una reazione di screening mediante PCR. Le colonie sono state prelevate e trasferite in un tubo termostrip da 0.2 ml contenente una miscela composta da 4 µl Buffer Mix (con MgCl₂, 5X; Promega), 1 µl per ciascun primer forward e reverse, 0,4 µl di dNTPs, 0,1 µl di Go-Taq Polimerasi (5 U/µl; Promega) e 14,0 µl di acqua distillata sterile.

Il programma prevede 25 cicli (94 °C per 10'', 53 °C per 10'', 72 °C per 45''). I prodotti di PCR sono stati analizzati su gel di agarosio. In base alle dimensioni del frammento ottenuto

sono state selezionate le colonie batteriche da sottoporre ad allevamento O/N e alla successiva estrazione plasmidica.

Estrazione del plasmide ricombinante

Le colonie risultate positive, precedentemente conservate in piastra, a 37 °C per alcune ore, sono state trasferite in 10 ml di LB + ampicillina (100µl/100 ml) in agitatore a 100-150 rpm a 37°C O/N. Per l'estrazione del plasmide e la purificazione dell'inserto è stato utilizzato il kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega) seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Al fine di avere un'ulteriore conferma dell'avvenuto clonaggio del frammento d'interesse, il DNA plasmidico, dopo essere stato estratto, è stato sottoposto all'azione di appropriati enzimi di restrizione.

Analisi filogenetica

I prodotti di PCR inseriti nei plasmidi estratti sono stati sequenziati. A tal fine una sospensione contenente 1 µg di DNA plasmidico è stata essiccata in un tubo Eppendorf da 1,5 ml sottovuoto per 10 minuti. I tubi Eppendorf sono stati inviati alla ditta Eurofins MGW-Operon (Ebersberg, Germania), dove è avvenuto il sequenziamento sfruttando primers disegnati o a livello dei promotori T7. Le sequenze ottenute sono state allineate a sequenze analoghe reperite nella banca dati ed analizzate mediante il programma di allineamento del pacchetto software Bioedit Sequence Allignement Editor v. 4.7.8 (Dep. of Microbiology, North Carolina University).

RAPD

10 e 20 ng di DNA fungino dei 47 isolati di *F. graminearum* s.s. e del ceppo 398, *F. pseudograminearum*, utilizzato come gruppo esterno, sono stati usati in una reazione RAPD PCR in 25 uL di volume finale, con: 5uL di Buffer 5X Promega[®], 40ng di primers decameri, 0,2 mM di ogni dNTP, 3 mM di MgCl₂, 1 U di GoTaq[®]. Gli ampliconi sono stati separati in gel di Agarosio al 1,5% in 1X TBE Buffer, colorati con bromuro di etidio e visualizzati in luce UV. Sono stati provati 17 primers ottenuti con il software RAPD-primer generator (compilato in Java da Gebhard Wostemeyer al sito dell'università di Jena, Germania).

Per l'analisi di 22 isolati sono stati scelti 7 primers (Tab. 2), che davano origine ad un profilo ben discriminabile e ripetibile, mentre per gli altri 25 è stato utilizzato il solo primer 21,

risultato essere il più informativo. Il ciclo termico utilizzato consiste in 5' a 95°C per la denaturazione, 40 cicli composti da 60'' alla temperatura di appaiamento dei primers, indicata per ciascuno in Tabella 2, 60'' a 72°C per l'estensione degli ampliconi, 20'' di denaturazione a 95°C e l'estensione finale di 5' a 72°C.

Tabella 2: Sequenza dei primers utilizzati nell'analisi RAPD, relative temperature di anealing e numero di bande presenti.

PRIMERS	(5' to 3')	T anealing (°C)	N° bande
1	GCTTAGGTGG	32°	5
2	GGAGCCCAC	34°	9
A1	CAGGCCCTTC	34°	9
A3	AGTCAGCCAC	32°	10
A4	AATCGGGCTG	32°	6
A5	AGGGGTCTTG	32°	7
21	GTGAGCGTC	30°	15

L'esperimento è stato ripetuto almeno 2 volte.

I dati RAPD per ogni amplificazione sono stati registrati, osservando ogni profilo e compilando una matrice binomiale dove 1 indica la presenza e 0 l'assenza della banda in entrambe le diluizioni di DNA considerate. La matrice è stata compilata con il pacchetto RAPDistance-1.04, dove i dati sono stati considerati marcatori aploidi dominanti e l'analisi è stata fatta con il software PAUP v-1.10. L'identità genetica della popolazione è stata calcolata con il modello di distanza di Nei e Li (1979).

Sono stati ottenuti alberi UPGMA (Unweighte Pair-Group Method, Media aritmetica non soppesata) ed è stata fatta l'analisi bootstrap.

Risultati

SCAR

Tutti gli isolati hanno dato origine ad un frammento di circa 420 bp riferibile al tipo principale presente nelle popolazioni europee di *F. graminearum* s.s. (Carter *et al.*, 2002). Dallo studio della sequenza amplificata è osservabile la presenza di due ripetizioni di un segmento da 30 bp presenti nella regione compresa tra i nucleotidi in posizione 275 e 305 (Fig. 2).

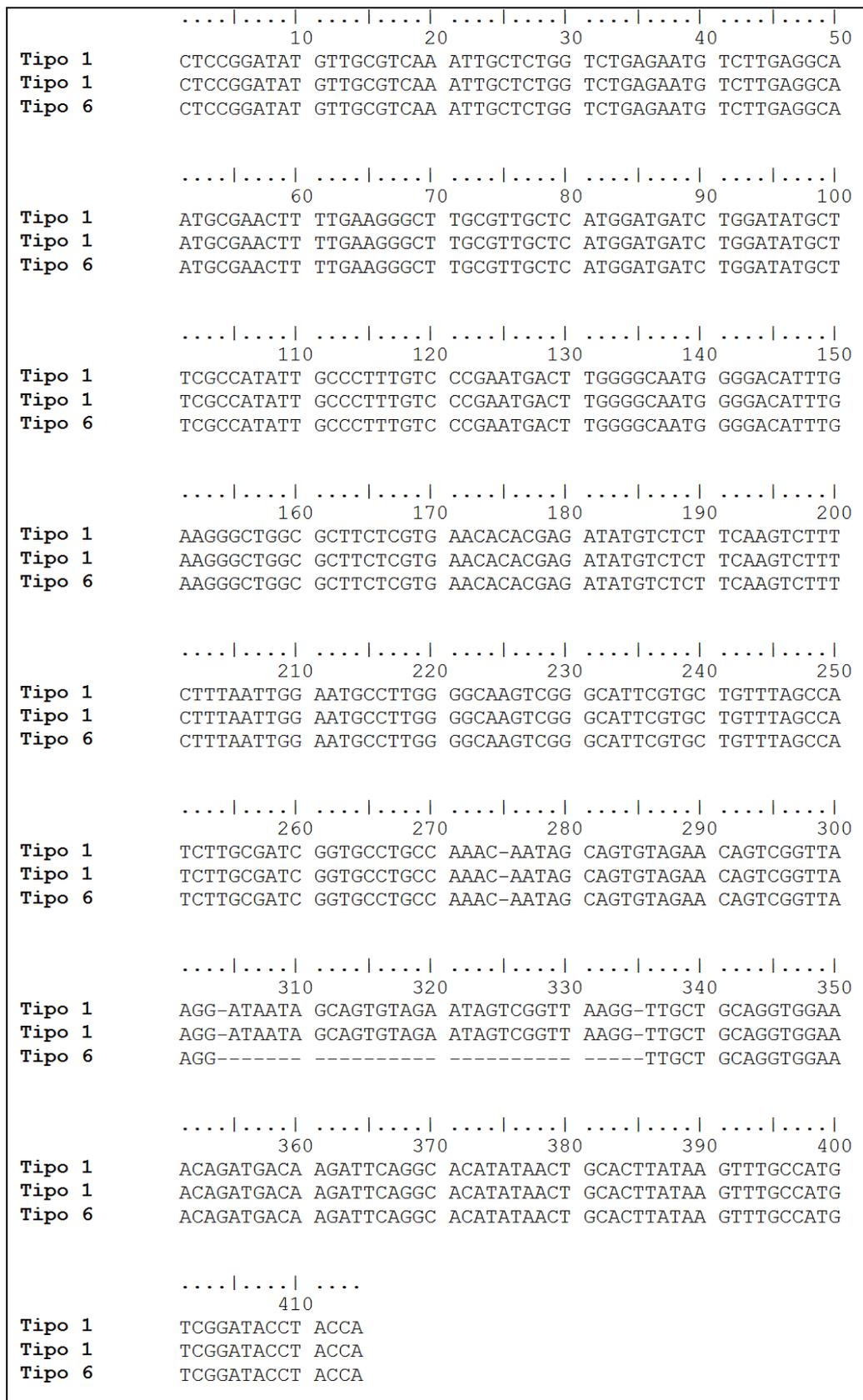


Figura 2: Allineamento degli ampliconi ottenuti con i primers FG16F/R.
Il tipo di sequenza è tratto da Carter *et al.*, 2002

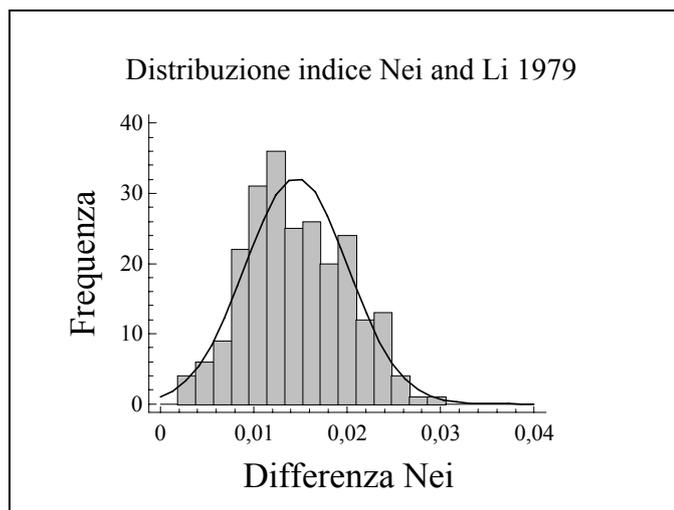


Figura 3: Istogramma delle frequenze degli indici di Nei & Li della popolazione.

RAPD

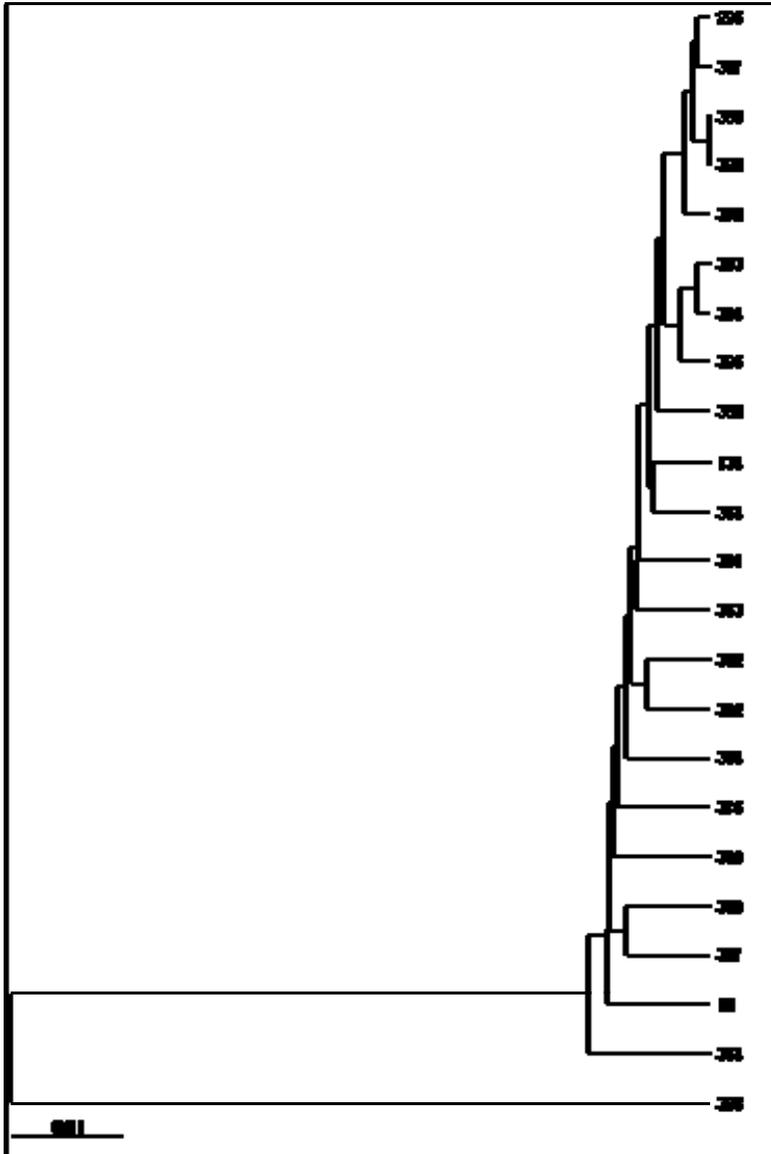


Figura 5: Albero UPMGA dei 22 isolati analizzati con 7 primers decametri.
Il gruppo esterno è costituito da *F. pseudograminearum* (F 398)

Figura 6: Albero UPMGA degli isolati analizzati con il solo primer 21.
Il gruppo esterno è costituito da *F. pseudograminearum* (398)

Discussione

Negli ecosistemi naturali, la variabilità genetica, spaziale e temporale è elevata, al contrario negli agro-ecosistemi le comunità vegetali, sono relativamente uniformi, geneticamente, topograficamente e temporalmente distribuite dall'uomo. Un patogeno vegetale può quindi trovare in queste condizioni un habitat migliore al suo sviluppo epidemico rispetto a quello che troverebbe in un habitat naturale. In un tale ecosistema le popolazioni patogene possono regolarmente essere soggette a locali riduzioni di variabilità genetica e genotipica.

Il complesso *F. graminearum* comprende almeno 13 specie filogenetiche, molte delle quali sembrano essersi evolute allopatricamente (O'Donnell *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2007). Dati di carattere biogeografico suggeriscono che la maggior parte delle specie del complesso *F. graminearum* abbia avuto origine evolutiva nell'emisfero meridionale. In Nord-America (Gale *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008; Zeller *et al.*, 2004), Europa (Gagkaeva e Yli-Mattila, 2004; Láday *et al.*, 2004; Toth *et al.*, 2005; Waalwijk *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2008), Giappone, Cina (Suga *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008a,b) sono segnalate poche delle specie in questione ed in Italia è stato segnalato solo *F. graminearum* s.s.

Numerose indagini sui patogeni della FDS suggeriscono che una relativamente recente globalizzazione dei mercati in ambito agricolo abbia portato ad introdurre involontariamente patogeni esotici, contribuendo alla emergenza di questa patologia a livello globale. In Nord America e Canada ove, oltre a *F. graminearum*, è presente anche *F. gerlachi*, è stato osservato un cambiamento nella composizione della popolazione di *F. graminearum* s.s. che risulta ad oggi divisa in due sottopopolazioni: quella caratterizzata dal chemiotipo prevalente 15-ADON sembra stia cedendo il passo all'altra popolazione di nuova comparsa altamente tossigena 3-ADON, che risulta molto più simile alla popolazione Italiana 15-ADON che a quella originale americana dello stesso chemiotipo (Ward *et al.*, 2008; Gale *et al.*, 2007). Anche nelle indagini condotte in diverse aree europee, sono stati evidenziati cambiamenti nelle popolazioni locali delle specie del complesso *F. graminearum* e tra specie diverse del complesso dei miceti agenti di FDS (Waalwijk *et al.*, 2003; Toth *et al.*, 2005). In Italia la popolazione di *F. graminearum* s.s appare unica ed eterogenea, non esiste una relazione con il luogo, l'anno di isolamento, l'ospite o il chemiotipo di appartenenza. Per questo motivo la variabilità presente nella popolazione di un'area assai ristretta come quella bolognese, è da attribuirsi alla ricombinazione in fase meiotica dell'ascomicete omotallico *Gibberella zeae*. La mancanza della presenza di un campione numeroso proveniente dagli areali meridionali, non ha permesso di valutare statisticamente il problema. Tuttavia è stata osservata una minore

variabilità nelle aree settentrionali che può attribuirsi alla maggiore importanza della fase ascofora nelle aree a clima più mediterraneo.

L'ipotesi di una debole correlazione lineare inversa osservata tra identità e distanza spaziale è comprensibile alla luce di una valutazione analoga fatta da Zeller e collaboratori (2004). Questi analizzando oltre 600 isolati da 8 popolazioni di *F. graminearum* s.s. tra le regioni cerealicole centrali e orientali degli Stati Uniti, avevano ritrovato una forte correlazione tra identità degli isolati e distanza fisica in km, indicando come la varianza allelica fosse per il 97% all'interno della popolazione e per il 3% derivante da scambi di materiale genetico tra popolazioni diverse. La percezione di questo flusso genico, che rilevato istantaneamente, si palesa in un gradiente allelico riscontrabile in popolazioni topograficamente contigue. Questa valutazione sembra valida anche per l'Italia, con le attenuanti dovute alle minori distanze tra le popolazioni (Max 800 km tra il 36° e il 47 ° parallelo anziché oltre 2000 km tra il 30° e il 50° parallelo) e alla maggiore variabilità, relativa alle estensioni, degli scenari Italiani. La presenza di maggiori barriere naturali in poco spazio, evidenziabili nel territorio, su di un organismo così plastico come *F. graminearum*, potrebbe costituire un fattore di pressione evolutiva diverso rispetto agli scenari Americani e Nord-Europei. Inoltre il ruolo centrale dell'Italia negli scambi commerciali, che coinvolgono il frumento duro, rende interessante l'attività di monitoraggio sulle popolazioni. Proseguendo con tale approccio ma su un numero maggiore di campioni, sarà possibile delineare meglio i meccanismi attivi sulla popolazione autoctona di *F. graminearum*.

PAPER III

UTILIZZO DI INDUTTORI CHIMICI PER RIDURRE LA FUSARIOSI DELLA SPIGA IN PIENO CAMPO

Premessa

Attualmente il controllo della FDS, nel frumento sia tenero che duro, si attua attraverso la combinazione di misure agronomiche, volte all'introduzione nella rotazione di specie non ospite, misure fitoiatriche, con l'applicazione di fungicidi al momento dell'antesi e/o misure genetiche che prevedono la selezione e l'utilizzo di cultivar parzialmente resistenti.

Nella resistenza dell'ospite è possibile riconoscere 5 componenti diverse. Il Tipo I consiste nella resistenza all'infezione iniziale (Schroeder e Christensen, 1963), il Tipo II, è relativa alla diffusione nella spiga (Schroeder e Christensen, 1963), nel Tipo III la resistenza si oppone all'infezione delle cariossidi, nel Tipo IV (di campo) si oppone alla diffusione in campo dell'epidemia e nel Tipo V la resistenza si oppone all'accumulo di micotossine nella granella (Miller *et al.*, 1985; Mesterhazy, 2002).

Per il frumento esaploide sono conosciute diverse cultivar che portano tratti genetici legati alla resistenza, al contrario, per il frumento tetraploide, non sono conosciute cultivar con tale caratteristica.

I principali tipi di resistenza osservabili nelle cultivar oggi conosciute sono di tipo I, II e V (Toth *et al.*, 2008). La resistenza di tipo I è determinata più propriamente da fattori precostituiti, principalmente morfologici, che possono creare un ambiente sfavorevole all'ancoraggio e/o alla penetrazione della superficie dell'ospite, la resistenza di Tipo II e di Tipo V, invece, coinvolgono meccanismi, post infezionali, di interazione ospite-patogeno.

F. graminearum, che ha con l'ospite vegetale un rapporto di tipo emibiotrofico, nella fase di colonizzazione, intreccia con questo un intenso scambio d'informazioni biochimiche.

Dall'analisi trascrizionale, su microarray derivato da libreria sottratta SSH (Suppression Subtraction Hybridization), dell'interazione *F. graminearum*/*T. aestivum* sono state identificate 203 sequenze espresse in maniera differenziale (185 sovraespresse, 18 sottoespresse). Questi tratti sembrano collegati all'espressione di diverse famiglie geniche coinvolte nel metabolismo di base, in quello energetico, nel meccanismo trascrizionale di sintesi proteica e di catabolismo proteico, nel trasporto cellulare, nella comunicazione cellulare e nel risanamento e difesa delle cellule (Golkari *et al.*, 2007).

La resistenza sistemica acquisita (SAR) è un importante componente del repertorio dei meccanismi di difesa delle piante dai microorganismi, e anche per il frumento è stato dimostrato come possa costituire un elemento di risposta verso diverse patologie specifiche. La gravità di alcune fitopatie, quali: Oidio (agente causale *Blumeria graminis*), Ruggine fogliare (*Puccinia triticina*), septoriosi (*Septoria* spp.), viene ridotta dall'applicazione di molecole come l'estere S-metilico dell'acido benzo (1,2,3)thiadiazolo-7-carbothiotico (BTH) e acido isonicotinico (INA) (Gorlach *et al.*, 1996), riconosciute essere analoghe dell'acido salicilico (SA) nell'indurre nella pianta risposte fisiologiche di resistenza (Delaney *et al.*, 1995)

Per il frumento esaploide è noto come l'applicazione di BTH, induca cambiamenti nello stato trascrizionale della pianta, ma che questi non portino ad uno stato di incremento della difesa nei confronti di *F. graminearum* (Gorlach *et al.*, 1996; Li e Yen, 2008) L'inefficacia del BTH nell'indurre nel frumento tenero risposte di resistenza di tipo I e II verso la FDS è stata provata nel 2001 da Yu e Muehlbauer. Per lo stesso patosistema, tuttavia, è stato possibile ottenere riduzioni del 40% della gravità della malattia con applicazione di INA in esperimenti in serra (Zhang *et al.*, 2007). L'impossibilità di osservare differenze trascrizionali tra il testimone non trattato e le tesi trattate con elicitori chimici in prove in pieno campo (Pasquer *et al.*, 2005) e il disaccordo tra diversi autori sui dati relativi all'espressione di proteine PR1 (pathogenesis-related-proteins) nelle piante sottoposte ad analoghi del SA, (Yu e Muehlbauer, 2001; Pasquer *et al.*, 2005; Gorlach *et al.*, 1996), mostrano come la resistenza sistemica acquisita sia condizionata da diversi fattori quali: la fase di sviluppo, le condizioni di crescita o la varietà di frumento (Pasquer *et al.*, 2005).

La valutazione dell'effettiva possibilità di ridurre l'incidenza della FDS è quindi subordinata a diversi fattori non sempre controllabili in un esperimento in condizioni naturali.

In questo paper è stata valutata, in due anni di prove in pieno campo su una varietà riconosciuta sensibile (Simeto), la possibilità di utilizzare, previa induzione chimica, le risposte di difesa sistemica del frumento duro verso il contenimento della FDS.

Nell'ultimo anno di prove, la valutazione visiva dei sintomi è stata affiancata dalla stima tramite Real-Time PCR, con chimica SYBR[®] Green I, del grado di contaminazione delle cariossidi e dalla determinazione analitica con metodo HPLC del contenuto in DON delle stesse, con l'intenzione di considerare le diverse componenti di resistenza che la pianta contrappone all'infezione da parte di *F. graminearum*.

Materiali e metodi

Condizioni sperimentali

Le prove si sono svolte nelle annate agrarie 2006-2007 e 2007-2008 in due diversi appezzamenti dell'azienda agraria dell'Università di Bologna caratterizzati da suoli dell'unità cartografica 2A (pari al 7% dei suoli regionali) nelle prove 2006-2007, e da suoli dell'unità cartografica 3B (pari al 2% dei suoli regionali), in quelle 2007-2008 (Carta dei suoli dell'Emilia Romagna 1:250.000 www.ermesagricoltura.it). Le parcelle sono state seminate a fine ottobre in entrambi gli anni di prova con la varietà Simeto, concimate con 320 kg/Ha di urea distribuita in due tempi, in accestimento e in levata. Il diserbo è stato fatto in post emergenza con una miscela di Biotril 1 l/Ha e Toopik tween 300 ml/Ha. Tra le parcelle è stata mantenuta una distanza di 0,5 m.

Semina 2006: Le parcelle di 12 m² (2x6m) sono state seminate con 180 kg/Ha in uno schema sperimentale a blocco randomizzato, 10 tesi 4 ripetizioni. Il tipo di trattamento e le date, sia del trattamento che dell'inoculazione, delle diverse tesi sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1: Tesi considerate nella prova 2006.

TESI	Prodotto	Dose /Ha	Epoca (Zadok)	Data	Inoculo (30/04/07)
1	Bion [®]	0,06 g	32	12/4/07	Si
2	Bion [®]	0,06 g	49	19/4/07	Si
3	Bion [®]	0,06 g	57-59	27/4/07	Si
4	Bion [®]	0,06 g	32	12/4/07	No
5	Bion [®]	0,06 g	49	19/4/07	No
6	Bion [®]	0,06 g	57-59	27/4/07	No
7	H ₂ O	-	57-59	27/4/07	No
8	H ₂ O	-	57-59	27/4/07	Si
9	Horizon [®]	1 l	61-62	29/4/07	No
10	Horizon [®]	1 l	61-62	29/4/07	Si

Semina 2007: Le parcelle di 15 m² (3x5m) seminate con 150 kg/Ha in uno schema sperimentale a parcelle suddivise con 4 ripetizioni 8 tesi, sono state coltivate seguendo le tecniche agronomiche della zona. I trattamenti considerati sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2: Tesi considerate nella prova 2007.

TESI	Prodotto	Dose /Ha	Epoca (Zadok)	Data	Inoculo (13/05/08)
1	H ₂ O	-	58-59	9/05/08	Si
2	Horizon [®]	1 l	61-62	12/05/08	Si
3	Bion [®]	0,06 g	49	30/4/08	Si
4	Bion [®]	0,06 g	58-59	9/05/08	Si
5	H ₂ O	-	58-59	9/05/08	No
6	Horizon [®]	1 l	61-62	12/05/08	No
7	Bion [®]	0,06 g	49	30/4/08	No
8	Bion [®]	0,06 g	58-59	9/05/08	No

I trattamenti, in entrambi gli anni, sono stati veicolati in un volume d'acqua di 600 l/Ha attraverso una barra irroratrice della lunghezza di 3 m fornita di ugelli a ventaglio, portata da due operatori ad un'altezza di 20 cm dalle spighe ed alimentata da un semovente da trattamenti in pieno campo ad una pressione di 2,5 atm. (Allegato Paper III, Foto A, B).

L'inoculo è stato eseguito 24 ore dopo il trattamento con il prodotto chimico con una pompa a spalla motorizzata, applicando per parcella 400 ml di una sospensione a 1*10⁵ conidi/ml ottenuta da una miscela di ceppi di *F. graminearum* 15-ADON precedentemente caratterizzati (Allegato Paper III, Foto C).

Rilievo fitopatometrico

Il rilievo fitopatometrico, effettuato nelle prime ore dell'alba, nella fase fenologica di tarda maturazione latteo-cerosa (GS 80-83), come raccomandato dall'EPPO (guideline 1998) a 15-20 gg dall'inoculo, è stato eseguito su un campione di 100 spighe per ogni parcella. I parametri considerati sono stati incidenza (numero di spighe infette) e gravità (percentuale della spiga colpita da fusariosi). Nel 2008 sono stati fatti due rilievi a 10 giorni l'uno dall'altro. (Allegato Paper III, Foto D, E)

Per la stima della gravità è stata utilizzata una scala assimilabile a quella proposta da Parry *et al.* (1984), con 8 classi di valutazione (0, 2, 5, 10, 25, 50, 75, 90 %). La percentuale delle

spighe infette (IM) e la gravità della malattia (GM) sono state calcolate come medie delle 100 osservazioni :

$$IM = \frac{\sum \text{numero di spighe infette}}{\text{totale di spighe campionate}} \times 100$$
$$GM = \frac{\sum \text{numero di spighe X classe di malattia}}{\text{totale di spighe infette}}$$

A maturazione, la raccolta è stata eseguita con una mietitrebbiatrice Laverda con una larghezza di presa di 2 m equipaggiata con aspo abbattitore con denti a molla. La suddivisione del raccolto è stata eseguita aspettando 1 min tra la raccolta di una parcella e l'altra per permettere lo svuotamento del circuito elevatore della granella (Allegato Paper III, Foto A, B)

I dati climatici sono stati ottenuti da dispositivi di rilevamento meteorologico presenti nelle capannine dei campi sperimentali.

Contaminazione delle cariossidi

La percentuale di *Fusarium* nelle cariossidi è stata valutata direttamente su 400 semi (100 per replica), disinfettati in una soluzione al 2% di ipoclorito di sodio per 5' e incubati in piastra, per 10 gg, su substrato agarizzato (PDA), addizionato di neomicina e solfato di streptomina (0,003 % p/v). Per l'appartenenza alla specie *F. graminearum* ci si è basati sull'aspetto della colonia su PDA e sulla morfologia dei conidi (Leslie e Summerell, 2006).

Quantificazione assoluta del DNA attraverso Real-Time PCR con SYBR[®] Green I

La valutazione indiretta è stata fatta attraverso una quantificazione del DNA fungino con la Real-Time PCR Abi Prism 7000 (Applied Biosystems), utilizzando la chimica SYBR[®] Green I. Il frammento specie specifico è stato amplificato tramite la coppia di primers Fg16N/F e Fg16N/R (5'-TCTTTGACATCTGTTCAACCCA-3'/5'-ACAGATGACAAGATTCAGGCACA-3') (Nicholson *et al.*, 1998)

Il DNA è stato estratto da 100 mg di farina ottenuta da 100 g di cariossidi macinate con un minitritatutto Moulinex adattando il metodo messo a punto da Brandfass e Karlovsky (2008).

La farina è stata sospesa in tubo da 2 ml, con l'aiuto di una sferetta di vetro, in 1 ml di Tampone-CTAB (10 mL, 10 mM Tris, 20 mM EDTA, 0,02 M CTAB, 0.8M NaCl, 0,03 M N-

laurylsarcosina, 0,13 M sorbitolo, 1% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone (Merck, Darmstadt, Germany), portato a pH 8.0 con NaOH, dove mercaptoetanolo (20 µL) e proteinasi K (0,2 mg/mL) vengono aggiunti poco prima dell'utilizzo.

L'estrazione del DNA fungino di riferimento è stata fatta da colonie di *F. graminearum* cresciute in piastre Petri da 8,5 cm per una settimana. Il micelio raschiato dalla superficie della colonia è stato posto in tubi da 2 ml, e trattato secondo il protocollo utilizzato per la farina. Le sospensioni ottenute dalla farina e dal micelio, sono state mantenute per 10' a 42 °C poi a 65 °C per altri 10' avendo cura di agitarle vigorosamente con il Vortex per almeno 10'' ogni 3'. Al termine sono stati aggiunti 800 µl di cloroformio e alcool isoamilico (24:1, v:v). Il campione è stato poi emulsionato vigorosamente, e centrifugato a 8000 rpm per almeno 15'. 750 µl della fase acquosa sono stati trasferiti in un tubo da 1,5 ml, riempito precedentemente con isopropanolo, miscelati accuratamente e incubati per 20' a temperatura ambiente. Il DNA si evidenzia sottoforma di pellet a seguito di centrifugazione a 14.000 rpm per 20'. Dopo aver eliminato l'isopropanolo, è stato fatto un lavaggio superficiale del pellet con 500 µl di etanolo al 70%. A seguito della rimozione dei residui di etanolo sotto vuoto, il DNA è stato risospeso accuratamente in 30 µl di acqua libera da nucleasi.

Per l'amplificazione e la quantificazione del DNA di *F. graminearum* presente nelle farine, è stato utilizzato il sistema AbiPrism 7000.

La miscela di amplificazione è stata preparata con Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, in un volume finale di 25 µl con una concentrazione dei primers di 0,3 nM ed un una quantità di 5µl di DNA diluito 1:50 per ciascun campione. I campioni sono sempre stati analizzati in doppio. Il limite di sensibilità di questa tecnica è 0,5 pg di DNA fungino su g di sostanza secca, equivalente a circa 10 interi genomi così come definito da Brandfass e Karlovsky (2008) per la stessa chimica. I dati sono stati esportati su foglio EXCEL per i successivi calcoli.

La quantificazione assoluta è fatta sulla base del valore Ct restituito dalla Real Time PCR, tradotto in µg di DNA sostituendo la variabile nell'equazione della retta di calibrazione che si ottiene dalla correlazione lineare tra i valori soglia e i valori del logaritmo naturale delle concentrazioni degli standard di DNA (Tab. 3).

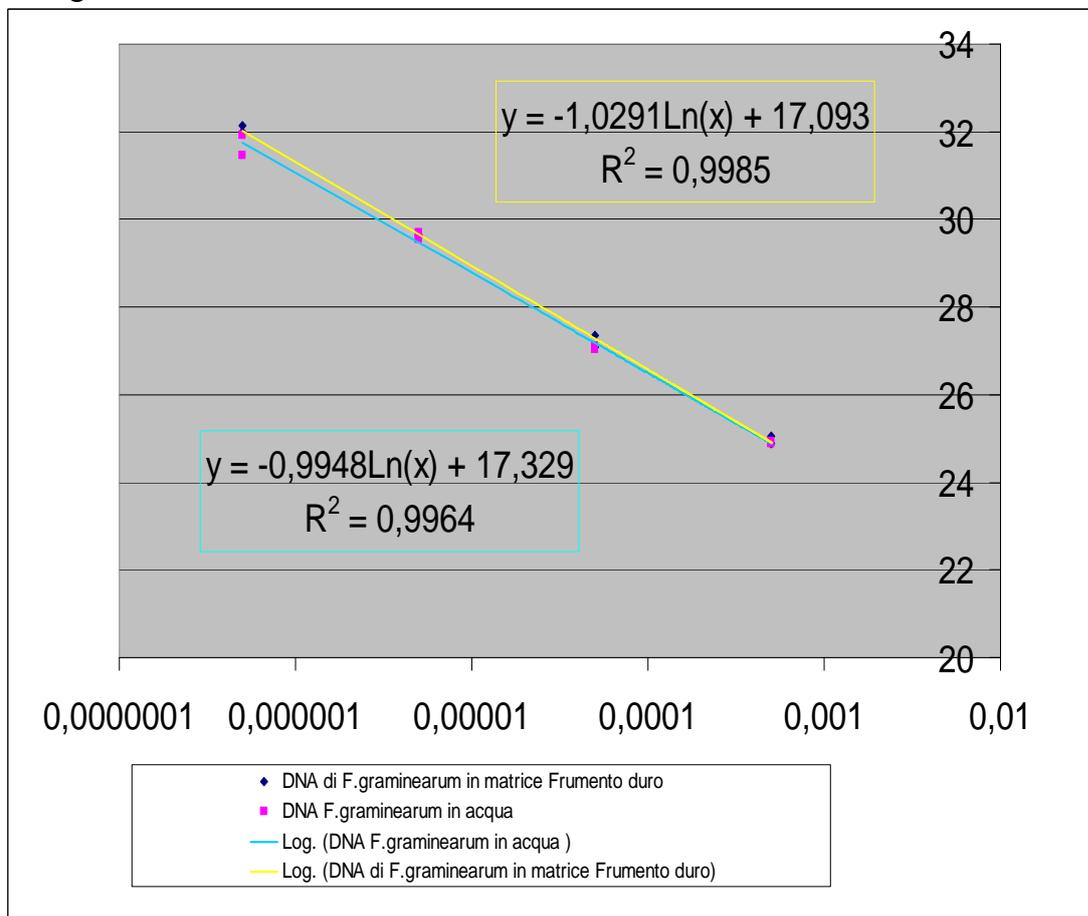
Per preparare la concentrazione standard, il DNA di *F. graminearum* è stato quantificato allo spettrofotometro Nano drop (Thermo Scientific) diluito in maniera seriale nella matrice ottenuta dall'estratto di semole di grano duro non contaminato. Questo è fatto per ridurre la differenza derivante dalla matrice vegetale, che potrebbe portare a variazioni nella pendenza della retta di calibrazione (Fig. 1). Il valore ottenuto viene moltiplicato poi per il fattore 3000

per riportare il valore da µg/µl a µg di DNA per g di farina. Il profilo termico è stato ottimizzato come segue: 10' a 95°C, seguiti da 40 cicli a 94 °C per 30'', 64 °C per 45''. Il programma si conclude con una tappa di 1' a 55 °C. Il rilevamento della fluorescenza è stato fatto nella fase di anealing.

Tabella 3: Schema sperimentale per l'ottenimento della retta di calibrazione.

Controllo negativo	1	Estratto di Semola di grano duro non contaminata 1:50
	2	
Controllo positivo	3	Estratto da micelio fungino 1:50
	4	
Standard	5	0,5 pg DNA di <i>F.graminearum</i>+ estratto farina diluito 1:50
	6	
	7	5 pg DNA di <i>F.graminearum</i>+ estratto farina diluito 1:50
	8	
	9	50 pg DNA di <i>F.graminearum</i>+ estratto farina diluito 1:50
	10	
	11	0,5 ng DNA di <i>F.graminearum</i>+ estratto farina diluito 1:50
	12	

Figura 1: Effetto delle diverse matrici sulla retta di calibrazione.



Il controllo della specificità dell'amplificazione è avvenuto attraverso analisi della dissociazione termica degli ampliconi, eseguita al termine di ogni reazione, portando il prodotto a 94°C per 1', 60 °C per 20'' e portato a 90°C con letture ogni 0,3 °C. I prodotti dell'amplificazione sono poi stati controllati su gel di agarosio al 1%, e visualizzati in luce UV dopo colorazione con bromuro d'etidid.

Analisi DON

La determinazione analitica del contenuto di DON nelle cariossidi viene effettuata in cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) in colonna Phenomenex Synergi 4micron max-RP80 A (150x4,6 mm) in una fase mobile di aceto nitrile-acqua (1:9 v:v), dopo estrazione in H₂O e 5% (p:v) di polietilenglicole 8000 (PEG) e purificazione degli estratti in colonnine ad immunoaffinità DON Test VICAM.

La quantificazione analitica si effettua su una curva di calibrazione a 5 concentrazioni di DON standard, nell'intervallo 0,5-20 ppm; il limite di determinazione di questa tecnica è 0,2 ppm. Le analisi sono state effettuate in un laboratorio del DiSTA situato a Cadriano sotto la supervisione della Dott.ssa Silvia Grandi.

Elaborazione dei dati

Tutti i dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica con il software Statgraphics plus – Statistical Graphics Corporation.

I dati, derivanti dai rapporti percentuali (IM e GM), prima della analisi sono stati convertiti in valori angolari. Ogni parametro valutato è stato sottoposto ad analisi della varianza e le medie sono state confrontate con il test di Duncan.

Per valutare il grado di efficienza del trattamento, i dati sono stati normalizzati con la formula di Abbot

$$E = \frac{\% \text{ incidenza del testimone} - \% \text{ incidenza del trattato}}{\% \text{ incidenza del testimone}} \times 100$$

Risultati

I due anni di prova sono stati caratterizzati da un decorso climatico assai differente.

Prove 2006-2007

Nel 2007, un forte anticipo su tutte le colture autunnali, dovuto alle alte temperature del bimestre Marzo-Aprile e alla scarsa piovosità di Aprile–Maggio (Fig. 2), ha reso la situazione non ideale al verificarsi di epidemie di FDS. I fattori ambientali poco conduttivi per *F. graminearum* hanno ridotto incidenza e gravità di malattia a valori bassi rendendo difficile la stima dei parametri fitopatometrici. Il valore massimo di IM registrato è stato 25,05%, quello di GM 7,29%, riscontrati nella tesi testimone inoculata con la miscela di *F. graminearum*.

Il sottogruppo inoculato si differenzia da quello non inoculato artificialmente, per intensità ($p=0,0244$) e gravità di malattia ($p=0,0000$) (Tab. 4), non si differenzia invece per resa ($p=0,2390$), che risulta in tutte le tesi di molto inferiore alle medie regionali (6 t/Ha). In questo scenario, il trattamento con l'induttore di resistenza ha ridotto significativamente la gravità di malattia, in maniera equivalente al fungicida a base di Tebuconazolo, nelle tesi inoculate artificialmente (Tab. 4).

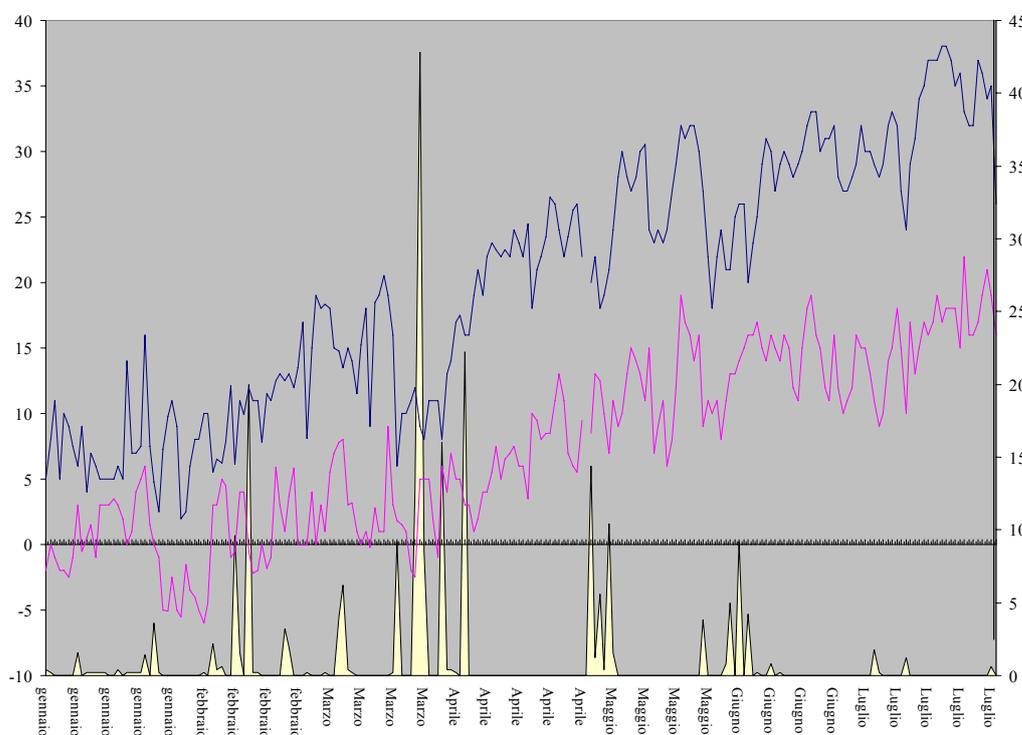


Figura 2: Decorso climatico da gennaio a luglio 2007

Tesi	Trattamento	GM Gravità	IM Incidenza	Resa t/ha	Fusarium %	DON ppm					
INOCCULATO	1	Bion [®] 32	5,15 CD	20,18 ns	2,23 n/s	37,50 ns	/ n/s				
	2	Bion [®] 49	4,87 CD	18,09 ns	2,25 n/s	53,25 ns	1,02 n/s				
	3	Bion [®] 59	4,19 BCD	20,48 ns	2,28 n/s	40,50 ns	/ n/s				
	8	Testimone	7,29 D	25,05 ns	2,53 n/s	57,50 ns	1,06 n/s				
	10	Horizon [®]	3,87 BC	18,95 ns	2,55 n/s	14,00 ns	0,78 n/s				
Valore p ANOVA		0,4920 0,0000	I/NI	0,5708 0,0244	I/NI	0,3814 0,2390	I/NI	0,1864 /	I/NI	0,5050 /	I/NI
NON INOCCULATO	4	Bion [®] 32	1,49 A	14,59 ns	2,40 n/s	/ /	/ /				
	5	Bion [®] 49	1,67 AB	10,50 ns	2,40 n/s	/ /	/ /				
	6	Bion [®] 59	2,59 ABC	16,09 ns	2,60 n/s	/ /	/ /				
	7	Testimone	1,96 AB	20,64 ns	2,40 n/s	/ /	/ /				
	9	Horizon [®]	2,49 ABC	19,00 ns	2,53 n/s	/ /	/ /				
Valore p ANOVA		0,4102 0,0041	Tot	0,2133 0,1206	Tot	0,6087 0,4452	Tot	/	Tot	/	Tot

Tabella 4: I dati sono proposti nelle tabelle come valore medio di 4 repliche.

Medie differenziate con il test di Duncan. Valori p per analisi della varianza tra Tesi (in bianco sul fondo della tabella) tra sotto gruppi (in bianco al centro della tabella) e tra tesi nei sottogruppi (in grigio alla fine di ogni sottogruppo). I dati seguiti da lettere uguali sono in differenziabili statisticamente al test di Duncan e differenziati da lettere minuscole, se all'analisi della varianza $p < 0.05$, e con lettere maiuscole se $p < 0,01$

Dati normalizzati con formula di Abbot							
Tesi	Trattamento	Gravità	Incidenza	Fus %			
INOCCULATO	1	Bion [®] 32	29,2953 ns	19,4248 ns	34,7826 ns		
	2	Bion [®] 49	33,2178 ns	27,7726 ns	7,3913 ns		
	3	Bion [®] 59	42,4879 ns	18,2284 ns	29,5652 ns		
	10	Horizon [®]	46,9746 ns	24,3246 ns	75,6522 ns		
Valore p ANOVA		0,9898 0,0125	I/NI	0,9303 0,603	I/NI	0,8621 /	I/NI
NON INOCCULATO	4	Bion [®] 32	23,8232 ns	29,2921 ns	/ /		
	5	Bion [®] 49	14,8803 ns	49,1167 ns	/ /		
	6	Bion [®] 59	-32,236 ns	22,0186 ns	/ /		
	9	Horizon [®]	-26,915 ns	7,92554 ns	/ /		
Valore p ANOVA		0,3744 0,1666	Tot	0,2304 0,5226	Tot	/	Tot

Tabella 5: Efficienza dei trattamenti

La non significatività della maggior parte dei dati registrati ha suggerito di interrompere le analisi sul contenuto di DON, rivelatesi alquanto costose. Il contenuto di DON delle cariossidi è stato misurato, infatti, solo per tre delle tesi sottoposte ad inoculo artificiale. Il trattamento con il prodotto chimico di riferimento sembra aver ridotto sensibilmente il contenuto di micotossine nella granella, così come la percentuale di contaminazione delle cariossidi. I trattamenti con l'induttore di resistenza in diversi tempi hanno mediamente ridotto la percentuale di *F. graminearum* isolabili dalla granella dopo la raccolta, ma non il contenuto di micotossine che ha raggiunto i livelli del testimone, superandolo ma non in modo significativo (Tab. 4). Il grado di efficienza dei diversi trattamenti non è risultato significativo né per il parametro gravità che per incidenza (Tab. 5). Anche la presenza di *F. graminearum* nelle cariossidi non differisce fra le tesi (Tab. 5)

Discussione

La resistenza del frumento a *F. graminearum* è di tipo orizzontale e quantitativo.

Una delle caratteristiche delle risposte del frumento ad infezioni è l'induzione di geni coinvolti nella difesa come β -1,3 glucanasi, proteine simili alla Taumatina (Tlp-1) e Thionine (Chen *et al.*, 1999; Pritsch *et al.*, 2000, 2001; Li *et al.*, 2001; Kang and Buchenauer, 2002; Han *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Bernardo *et al.*, 2006).

La tempestività nell'attivazione e l'intensità dell'espressione di tali geni costituiscono la principale differenza tra varietà sensibili e resistenti (Pritsch *et al.*, 2000). Molti studi dimostrano che in piante transgeniche di frumento, che sovraesprimono alcuni geni come β -1,3-glucanasi, chitinasi, e proteine simili alla Taumatina (Tlp-1), si osserva una riduzione dei sintomi di FDS in serra (Mackintosh *et al.*, 2007). L'attività di questi geni sembra importante nel ritardare lo sviluppo della FDS, in particolare nelle prime fasi di progressione della malattia (Chen *et al.*, 1999; Anand *et al.*, 2003). Anche le cultivar resistenti possono risultare, tuttavia, suscettibili quando si verificano condizioni climatiche particolarmente favorevoli allo sviluppo della FDS.

La difesa fitosanitaria del frumento può portare ad una riduzione percentuale di spighe infette dal 35% al 70% in funzione del clima, area e varietà (Suty *et al.*, 1996; Doohan *et al.*, 1996; Jugnet, 1994). Le sostanze, risultate più efficaci nel contenimento della fusariosi e registrate in Italia, sono Procloraz e Tebuconazolo che sono applicate in una finestra d'intervento assai stretta, corrispondente alla fase iniziale di emissione delle antere (GS 60-65) (Menniti *et al.*, 2003; Pancaldi *et al.*, 2004 e 2005). Henriksen ed Elen (2005) avevano registrato una lieve,

ma non significativa, attività del Bion nel ridurre la FDS nel frumento tenero. Tuttavia i dati sono relativi ad un solo anno di prova e sono gli unici che indicano questo tipo di risultato. Yu e Muehlbauer (2001) riportano che l'applicazione di Bion[®] non contribuisce alla resistenza dell'ospite nei confronti del patogeno. L'espressione di geni WCI (Wheat Chemically Induced), osservata 24 ore dopo il trattamento con Bion[®] e tre giorni prima dell'inoculo, costituisce un investimento energetico della pianta che modula risorse metaboliche in una direzione non fisiologica a seguito dello stimolo chimico; questo investimento, tuttavia non porta ad una riduzione nell'aggressività o nella virulenza dei Fusaria coinvolti nella FDS.

Nelle prove condotte in due anni, caratterizzati da scenari climatici differenti, tale risposta fisiologica si evidenzia come un ritardo nell'infezione delle tesi trattate, evidente nelle prove condotte nella stagione più favorevole allo sviluppo epidemico della malattia. Nelle stagioni meno favorevoli, questo rallentamento delle prime fasi infettive porta ad una riduzione finale della gravità, evidenziata nelle prove 2006, che è comparabile alla riduzione ottenuta con il prodotto chimico. Nelle prove 2007, dove la componente climatica è risultata favorevole al patogeno, questa lieve riduzione iniziale scompare con l'evolversi dell'infezione, che, nelle tesi trattate con l'induttore di resistenza, alla fine, risulta anche leggermente superiore.

E' anche da considerare, che nelle tesi sottoposte ad inoculo naturale, negli anni di maggiore conduttività per il patogeno, neanche il trattamento con il fungicida a base di Tebuconazolo ha garantito una copertura efficace, come riportato da Milus e Parson (1994) che avevano già segnalato l'inefficacia del Tebuconazolo nel ridurre l'incidenza e la contaminazione da DON in particolari condizioni. Anche Heier *et al.* (2005), trovandosi, invece, ad operare in condizioni di bassa conducibilità, hanno evidenziato l'inefficacia di tutti i trattamenti, riportando una gravità inferiore nelle tesi dove nessun fungicida era stato applicato, in accordo con Henriksen e Elen (2005). Nelle prove 2006, il contenuto di DON della granella, seppure generalmente basso e non differenziabile statisticamente, è risultato mediamente ridotto dal trattamento con Horizon, così come la percentuale dei *F.graminearum* isolabile dalla granella. L'anno successivo, in conseguenza di fattori ambientali più favorevoli allo scoppio epidemico della FDS, Horizon sembra avere ridotto il contenuto di DON delle cariossidi ma non il grado d'infezione dei tessuti.

L'FDS e l'accumulo di micotossine sono influenzate da diversi parametri, non sempre controllabili, infatti studi pluriennali riportano che più del 48 % della variazione del contenuto di DON sia imputabile al clima (Schaafsma *et al.*, 2001).

Infatti fattori come temperatura, umidità, presenza di altri microorganismi, ospiti alternativi, attività dell'acqua, composizione quali-quantitativa dell'inoculo, possono influenzare il

contenuto finale di micotossine nell'ospite (Doohan *et al.*, 2003). Inoltre, Sarlin *et al.* (2006) in indagini sulla FDS dell'orzo e del frumento tenero dove avevano trovato, una diretta relazione tra DNA fungino, stimato attraverso Real-Time PCR, ed il quantitativo di DON, hanno evidenziato che gli effetti ambientali sulla formazione delle micotossine complicano notevolmente la stima del contenuto di tricoteceni nei cereali, basandosi sulla stima della quantità di DNA fungino.

Sebbene la mancanza dell'intero insieme di dati, nelle prove 2006, non permetta di fare considerazioni puntuali, dove il principale elemento d'inoculo è stato *F. graminearum*, è stata notata una certa correlazione diretta tra percentuale di cariossidi contaminate da *F. graminearum* e contenuto di DON.

Negli esperimenti del 2007, dove tale parametro è stato considerato nella sua interezza, si è osservato una correlazione diretta tra μg di DNA e percentuale di cariossidi contaminate da *F. graminearum*, ma non con il grado di contaminazione da DON. Al contrario, anche se non su base statistica, esiste un andamento inverso tra i valori medi del contenuto di DON e quelli del quantitativo di DNA presente nelle cariossidi.

I primers usati nella quantificazione assoluta del DNA fungino attraverso chimica SYBR Green I erano specifici per *F. graminearum* e non amplificavano nessun'altra delle specie di Fusaria potenzialmente coinvolte nella malattia in campo. Probabilmente, come evidenziato anche dai dati sull'incremento di malattia e dalle percentuali di *Fusarium* spp., *F. graminearum* non è stato il principale produttore di DON nelle situazioni sperimentali considerate. Tutte le tesi sottoposte ad inoculo naturale, infatti, hanno fatto registrare livelli di DON sensibilmente superiori rispetto a quelle sottoposte ad inoculo artificiale. L'unica tesi del sottogruppo inoculato artificialmente con ceppi di *F. graminearum*, produttori di 15-ADON, che ha mostrato livelli di contaminazione comparabili a quelli delle tesi non inoculate, è stata quella trattata con Bion[®] a GS 59, dove il contenuto di DNA di *F. graminearum* è risultato inferiore rispetto alle altre tre tesi dello stesso sottogruppo che hanno raggiunto in media livelli di contaminazione da DON inferiori pur contenendo maggiore quantità di DNA fungino.

La valutazione del parametro resa, evidenzia una forte attività di *F. graminearum* nel ridurre la produzione, anche in questo caso nel primo anno di prova le rese molto basse non hanno permesso di discriminare questa specifica attività. Nel secondo anno invece, tutte le tesi sottoposte ad inoculo artificiale hanno mostrato rese assai inferiori a quelle sottoposte ad inoculo naturale. Come precedentemente riportato l'efficacia dei fungicidi nel contenere la fusariosi della spiga è fortemente contraddittorio, tuttavia il trattamento fungicida a base di

Tebuconazolo ha in generale contenuto i sintomi e ridotto gli effetti della FDS nei sistemi in cui *F. graminearum* è risultato essere il principale agente causale (prove 2006) diversamente, dove altri organismi sono subentrati (principalmente *F. culmorum*), il grado di contenimento del fungicida chimico è risultato subottimale, e soprattutto nelle prove 2007 nel sottogruppo sottoposto ad inoculo naturale ha dimostrato non contribuire alla riduzione né della malattia né del contenuto di DON, la resa tuttavia è sempre stata incrementata dalla difesa operata con Horizon[®].

La lotta alla FDS attraverso stimolatori di difese di resistenza sistemica analoghi dell'acido salicilico, mostra essere subordinata oltre che al tipo d'inoculo anche al decorso stagionale. Dove le condizioni climatiche risultano stressanti di per se, il trattamento con Bion[®] ha stimolato una certa resistenza nella pianta. In condizioni di forte conducibilità della malattia invece, l'effetto che si può ottenere è quello di rallentamento sulla diffusione del patogeno nella spiga nei primi giorni dell'infezione. In presenza di fattori ambientali assai favorevoli al patogeno tuttavia, questo rallentamento comporta un successivo incremento nella virulenza che si traduce in un aumento di tutti i parametri fitopatometrici. Il costo ecologico di tale stato, inoltre, si riflette sulla produzione, che risulta penalizzata nelle tesi sottoposte ad induzione chimica della SAR.

PAPER IV

ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELLA RESISTENZA INDOTTA NEL FRUMENTO DURO CV SIMETO

Premessa

L'infezione da parte di un patogeno generalmente si traduce nella pianta ospite in una risposta di difesa primaria, localizzata nella zona di infezione (LAR), che, rapidamente trasdotta alle cellule, ai tessuti e agli organi contigui, conduce ad una situazione di resistenza sistemica acquisita, SAR. La conoscenza sull'interazione ospite-patogeno nel sistema frumento duro - *F. graminearum* è limitata, specialmente negli aspetti di tipo molecolare.

Nel frumento tenero si conoscono, invece, diversi tratti genici collegati all'interazione nelle prime fasi della FDS. Alla risposta di difesa del frumento, sono correlati diverse proteine di patogenesi (Pathogenesis-related, PR), proteine simili a NPR1 (Chen *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Pritsch *et al.*, 2000, 2001) ed enzimi come: perossidasi, superossido dismutasi, catalasi, fenilalanina ammonio liasi, acido ascorbico perossidasi ed ossidasi (Chen *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2001). L'interazione appare complessa e non razza specifica (van Eeuwijk *et al.*, 1995), porta in 24 ore all'espressione di proteine PR riconosciute essere marcatrici di SAR come PR-1, PR-2 (β ,1-3 glucanasi), PR-3 (chitinasi di tipo III), PR-4 (proteine simili alla heveina), PR-5 (proteine simili alla Thaumatina) (Li *et al.*, 2000; Pritsch *et al.*, 2000, 2001; Makandar *et al.*, 2006).

La risposta ai microorganismi patogeni, assomiglia alla risposta SAR che si ottiene applicando composti che fungono da segnale nell'attivare il meccanismo di difesa. Trattamenti con Acido Salicilico (SA) ed ancor meglio i suoi analoghi funzionali BTH (Benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothionic acid S-methyl ester) ed INA (2,6-dichloroisonicotinic acid) possono potenziare la SAR in un vasto numero di interazioni pianta-patogeno (Ryals *et al.*, 1996). Nel frumento esaploide BTH è il più efficace induttore di SAR mediata da SA, e induce l'espressione di geni WCI (Wheat Chemically Induced) in maniera più marcata rispetto a SA ed INA (Gorlach *et al.*, 1996). Ciò nonostante si ritiene che nessuno dei geni coinvolti nella SAR, attivati da microorganismi (Pritsch *et al.*, 2001) o da analoghi di SA (Yu e Muehlbauer, 2001) possano avere un ruolo nella resistenza alla FDS (Li e Yen, 2008).

L'Acido Jasmonico (JA) è un'altra molecola segnale importante nel veicolare, nella pianta, risposte di difesa verso stress abiotici. generalmente si ritiene che la via mediata da JA agisca in maniera antagonista rispetto alla via metabolica attivata da SA e sembra operi attivamente contro patogeni di tipo necrotrofo nelle dicotiledoni (Glazebrook, 2005). Nel frumento, sembra che le cv resistenti alla FDS siano maggiormente responsive a questa molecola, mostrando una modulazione caratteristica nell'espressione di enzimi chiave nella via di

segnalazione di JA. La sovraespressione, nelle prime 24 ore di interazione, di geni come allene ossido sintasi, lipossigenasi II, l'invariata espressione di geni come quelli per la calacone sintasi, e la contemporanea sottoespressione di geni tipo flavonol sintasi (Li e Yen, 2008), in cv come Sumai 3 portatrici di tratti di resistenza alla FDS rispetto a cv sensibili, mostrano come JA e SA, anche nel frumento, siano distinte e interconnesse e coinvolte nella resistenza alla FDS.

Anche Desmond e collaboratori (2005), seguendo l'espressione di alcuni geni marcatori di SAR in cv tolleranti e sensibili al mal del piede del frumento causato da *F. pseudograminearum* in Australia, hanno dimostrato un'attività di JA nel ridurre i sintomi di FDS e l'espressione dei tratti legati alla resistenza in entrambe le cv, a differenza degli analoghi di SA che hanno indotto la sovra espressione di tali geni solo in quelle resistenti.

Nel presente paper si è voluta seguire, attraverso RT Real-Time PCR, l'espressione di alcuni geni marcatori dei principali meccanismi messi in atto nella SAR in frumento duro. L'attenzione è stata rivolta ai geni *PR-2* (β 1-3 glucanasi), *PR-3* (Chitinase), *LOX II* (Lipossigenasi), che possono essere considerati marcatori caratteristici dei diversi percorsi dei segnali della SAR del frumento duro nei confronti di *F. graminearum*. Tali geni sono stati analizzati a 24 ore dall'inoculo su piante trattate con JA e BTH, infettate o no con il patogeno, in rapporto ad un gene di riferimento per Ubiquitina che non risulta influenzato nel suo profilo di espressione dagli eventi che conducono alla SAR (Li e Yen, 2008).

Materiali e Metodi

Allevamento dell'ospite

Le piante di frumento duro cv. Simeto sono state accresciute in vasi di PVC, a sezione quadrata con lato 15 cm, in numero di 5 cariossidi per vaso. All'emergenza vengono diradate al fine di lasciare 3 piante per vaso e vengono allevate in cella climatica con 16/8 h di fotoperiodo ed escursione termica 25/16 °C tra le ore di luce e le ore di buio. I trattamenti chimici con JA, ad una concentrazione di 250 μ M e Bion[®] 50 WG, ad una concentrazione di 50 mM di principio attivo, sono stati effettuati a fine spigatura GS 59-60, 72 ore prima dell'inoculo, con *F. graminearum* (caratterizzati 15-ADON). Le piante testimoni sono state irrorate con H₂O ultrapura (apparato Milli Q) (Tab. 1).

Alla fioritura, le piante sono state inoculate iniettando tra glume e glumelle della spighetta centrale della spiga principale di ognuna delle tre piante di ogni vaso, 10 μ l di una sospensione conidica di *F. graminearum* alla concentrazione di 1×10^3 conidi/ml. Il testimone

è stato inoculato con la sola acqua ultrapura. Sono state considerate tre repliche secondo lo schema sperimentale a blocchi divisi, dove tre blocchi principali relativi ai trattamenti venivano a loro volta divisi in piante inoculate e non (Tab. 1).

Dopo l'inoculo le spighe sono state chiuse in sacchetti di PVC per 24 ore.

Tabella 3: Schema sperimentale adottato nella prova, i numeri indicano i vasi, le lettere le diverse piante all'interno dello stesso vaso, e le relative spighe inoculate.

	H ₂ O			BION			J.A.											
INOCULATO	1	A	2	B	3	A	1	A	2	B	3	A	1	A	2	B	3	A
	C	B	C	A	C	B	C	B	C	A	C	B	C	B	C	A	C	B
NON INOCULATO	4	A	5	A	6	A	4	A	5	A	6	A	4	A	5	A	6	A
	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B

RT RealTime-PCR

Per l'esperimento è stata recisa la spighetta sotto il punto di inoculazione a 24 ore dall'inoculo. Precedenti ricerche hanno, infatti, indicato che, nel frumento, il momento migliore per valutare le differenze nell'espressione dei geni correlati alla difesa sia 24 ore dopo l'inoculo (Pritsch *et al.*, 2000; Yen *et al.*, 2000; Xing *et al.*, 2004).

Il materiale raccolto è stato rapidamente posto, previa asportazione delle reste, in tubi da 1,5 ml in azoto liquido e conservato in ultrafreezer a -80°C fino all'utilizzo.

Per l'estrazione dell' RNA totale, è stato usato il KIT di estrazione RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Le glume (\approx 50 mg) sono prima state frantumate in azoto liquido dentro tubi da 1,5 ml con l'aiuto di micro pestelli appositi.

La RT RealTime-PCR è stata ottimizzata in due passaggi come segue: 150 ng di RNA totale sono stati retro trascritti in cDNA utilizzando il sistema ImProm-IITM (Promega) e inneschi oligo (dT)₂₀ (Invitrogen UK) in un volume finale di 20 μ l.

Per ogni reazione sono stati miscelati in ghiaccio 0,5 μ g di inneschi con l'RNA in un volume finale di 5 μ l. La miscela è portata in termoblocco a 70 °C per 5' e raffreddata in ghiaccio per altri 5'; successivamente vengono aggiunti gli altri elementi della miscela di reazione (4 μ l Buffer 5X, 2mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 5nM DTT, 20 U RNasin[®] Promega e 1 μ l di ImProm-II Reverse Transcriptase). Il programma di retrotrascrizione ha seguito il profilo termico di 5' a 25°C, 60' a 42°C, al termine la reazione è stata bloccata con un passaggio di 15' a 70 °C.

Il secondo passaggio è stato effettuato con la Real-Time PCR ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, utilizzando 4 µl di cDNA singolo filamento come stampo in una reazione da 25 µl con una concentrazione 25 pM di ciascun innesco e 12,5 µl di SYBR® Green I master mix (ABI, Foster City, CA). Il profilo termico della reazione a catena della polimerasi è stato 10' a 94°C, seguito da 40 cicli di 15'' a 94°C e 1' a 62 °C. Ogni esperimento è stato seguito da analisi dei picchi di dissociazione 94 °C 1', 50°C 20'' letture ogni 0,31 °C fino a 90°C. Il prodotto della reazione è stato separato in gel di agarosio, colorato con bromuro di etidio e visualizzato in luce U.V.

La quantificazione relativa è stata fatta rispetto al gene dell'Ubiquitina. L'espressione differenziale dei geni di interesse (*PR-2*, *PR-3*, *LOX II*), è stata normalizzata e il cambiamento di espressione rispetto al gene di riferimento è stato calcolato con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sulla base della media di 9 piante inoculate e 9 piante non inoculate, dopo aver valutato che l'efficienza di amplificazione tra controllo endogeno e geni di interesse fosse relativamente equivalente, come indicato nella guida Applied Biosystems (Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR).

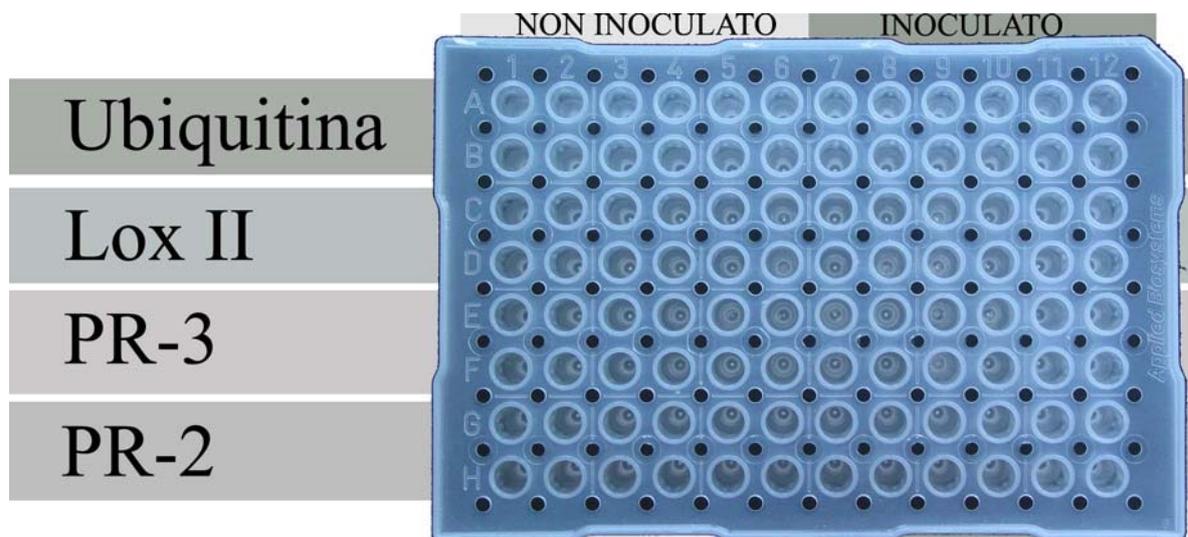


Figura 1: schema di caricamento della piastra utilizzata per la rt Real Time PCR.

I marcatori utilizzati per l'esperimento Real-Time sono stati disegnati utilizzando Primers-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) su regioni conservate delle regioni geniche codificanti per le proteine di interesse delle principali monocotiledoni coltivate, utilizzando la sequenza consenso derivante dall'allineamento delle diverse sequenze disponibili on line (Tab. 2). Tutti i marcatori sono stati testati con il software (OligoMail v 2.0) per verificare l'assenza o il grado di strutture secondarie, e o per la formazione di dimeri. Sono stati scelti i primers caratterizzati da buona specificità e risposta lineare alle diluizioni

seriali del cDNA (Tab. 3). La quantificazione relativa di un gene permette di stabilire se e quanto un gene è espresso in relazione ad un altro gene considerato.

Tabella 4: Sequenze utilizzate per il disegno degli inneschi molecolari utilizzati nella Real-Time PCR

Bersaglio	NCBI n°	Origine	Tipo
<i>Ubiquitina</i>	AY297059	<i>Triticum aestivum</i>	mRNA
	X56601	<i>Triticum aestivum</i>	mRNA
<i>LOX II</i>	AK248213	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	cDNA
	TAU32428	<i>Triticum aestivum</i>	mRNA
	DQ474240	<i>Triticum turgidum</i>	mRNA
	Y18212.1	<i>Triticum aestivum</i>	mRNA
	DQ090946	<i>Triticum aestivum</i>	mRNA
<i>PR-2</i>	DQO78255.1	<i>Triticum aestivum</i>	mRNA
	AF479647.2	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	gene,
	AF515785.1	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	gene,
	AF030166.1	<i>Oryza sativa</i>	mRNA
	M13237.1	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	mRNA
<i>PR-3</i>	AF112966.1	<i>Triticum aestivum</i>	mRNA
	AF112963.1	<i>Triticum aestivum</i>	mRNA
	AK250561	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	cDNA
	AK252734.1	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	cDNA
	AK251988.1	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	cDNA

Tabella 5: Primers scelti per l'esperimento Real-Time PCR.

GENE	Primers	Sequenze (5'→3')	Lunghezza	Tm	GC%	amplicone
<i>Ubiquitina</i>	Ubi1F	GGTGGACTCCTTCTGGATGTT	21	60,36	52.38%	181
	Ubi1R	GACCCTCACCGGCAAGACCA	20	68,00	65.00%	
<i>LOX II</i>	LoxI/F	GTGCAGGAGCTTGTACACCG	20	61,85	60.00%	135
	LoxI/R	TACGCCTCCGTGAACGACTA	20	61,75	55.00%	
<i>PR-2</i>	Glc/F	AGCCCGAAGCTCCTCTCC	18	61,99	66.67%	208
	Glc/R	GCGTGAAGGTGGTGATTTC	20	62,78	55.00%	
<i>PR-3</i>	Chit/F	GGACTTGATCCCGTTCGAAGA	20	62,50	55.00%	140
	Chit/R	GCAAGTACGGTTATTGCGGG	20	62,61	55.00%	

Per determinare la significatività dei dati e della differenza tra le medie dei dati normalizzati con il calcolo del $\Delta\Delta Ct$ è stato utilizzato il Software statistico Stat-Graph. Le medie sono state differenziate con il test di Duncan dove risultavano significative all'analisi della varianza.

Rilievo fitopatometrico

Alla quarta settimana dall'inoculo è stato fatto il rilievo fitopatometrico utilizzando una scala di valutazione assimilabile a quella proposta da Parry *et al.* (1984). La percentuale delle spighe infette e la gravità della malattia sono state calcolate come medie delle osservazioni come nel paper III (pag. 60)

Contaminazione delle cariossidi

E' stata considerata, inoltre, la percentuale di cariossidi infette derivante dal conteggio delle colonie di *F. graminearum* cresciute dalle cariossidi raccolte a fine maturazione poste, dopo disinfezione in soluzione 2% di ipoclorito di sodio, in piastre Petri da 8,5 cm su PDA addizionato con gli antibiotici (0,003% p/v).

Risultati

RT RealTime-PCR

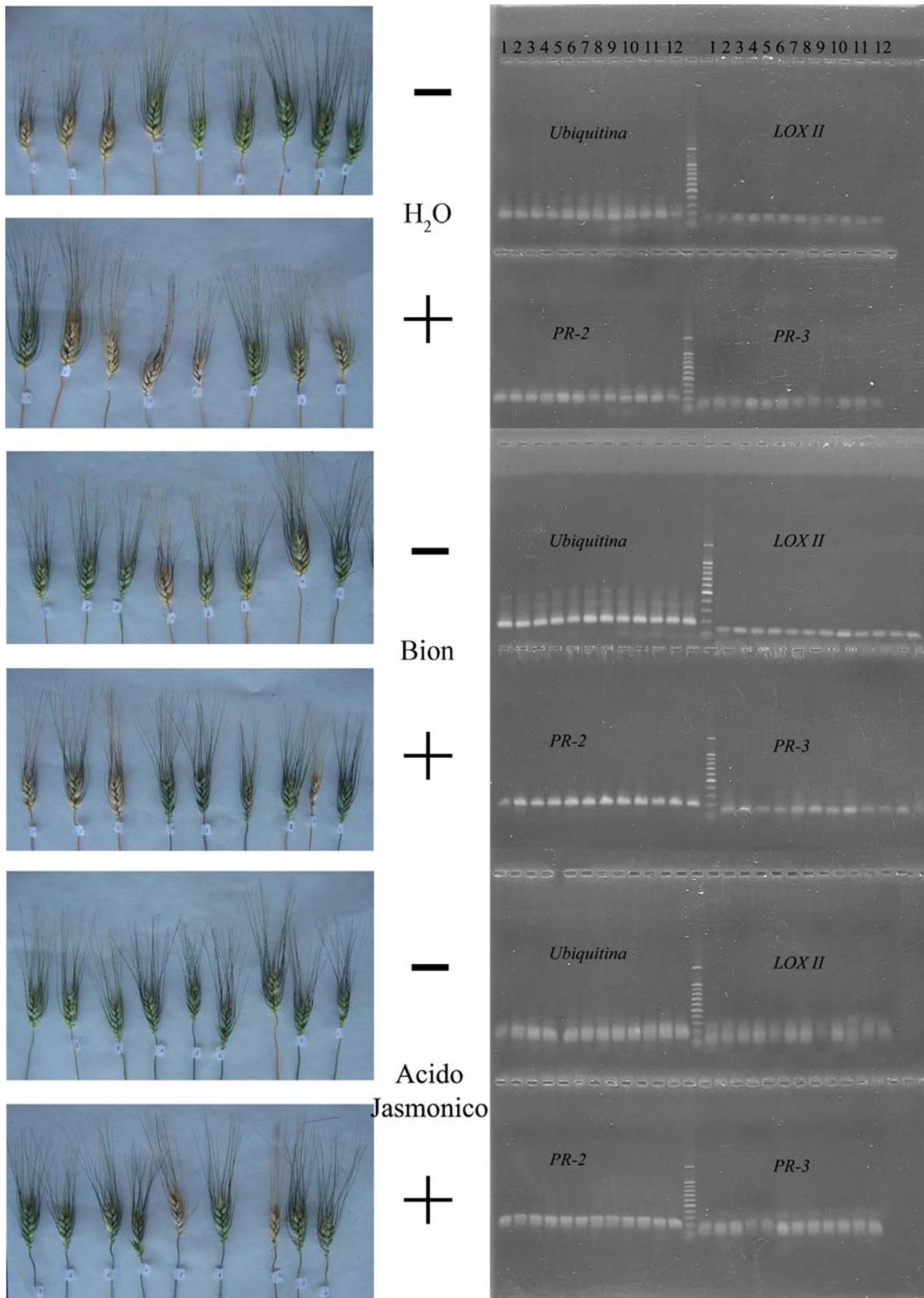


Figura 2: Spighe utilizzate nella prova (a sinistra). Gel di controllo della RT-Real Time PCR con i prodotti dei marcatori utilizzati al termine dei 40 cicli (a destra). (1,2,3,4,5,6) tesi non inoculate inoculate (7,8,9,10,11,12) tesi inoculate (Marker 100 bp, Promega).

Figura 3: Grafico delle medie e della deviazione standard ottenuto dall'analisi statistica dei valori minimi e massimi di espressione del gene per la lipossigenasi (A), PR-2 (B), PR-3(C). I dati derivano dalla media di 9 piante.

Rilievo fitopatometrico

Tutte le piante inoculate con iniezione nella spiga hanno mostrato dopo una settimana i sintomi dell'invasione da parte del patogeno fungino (Foto 1).

Alla quarta settimana i sintomi erano presenti solo sulle tesi inoculate (Fig. 4), con una gravità di malattia massima di quasi il 53 %, per le tesi non trattate. Nelle piante sottoposte ad induzione di resistenza mediata da Bion[®], i sintomi sono risultati essere più lievi, raggiungendo una gravità media di circa il 30%. Il grado di malattia è risultato essere ancora più basso (12% circa), nelle piante in cui era stato applicato JA 72 ore prima dell'inoculo con *F. graminearum* (Fig. 4).



Foto 1: Sintomi sulla gluma della spighetta nel punto di inoculo, e spighetta mancante, prelevata per le analisi molecolare.

Contaminazione delle cariossidi

La percentuale di cariossidi infette stimata dal conteggio in piastra è risultata ridotta significativamente dai trattamenti con JA e con Bion[®], con maggiore efficacia media del primo trattamento rispetto al secondo (Fig. 4).

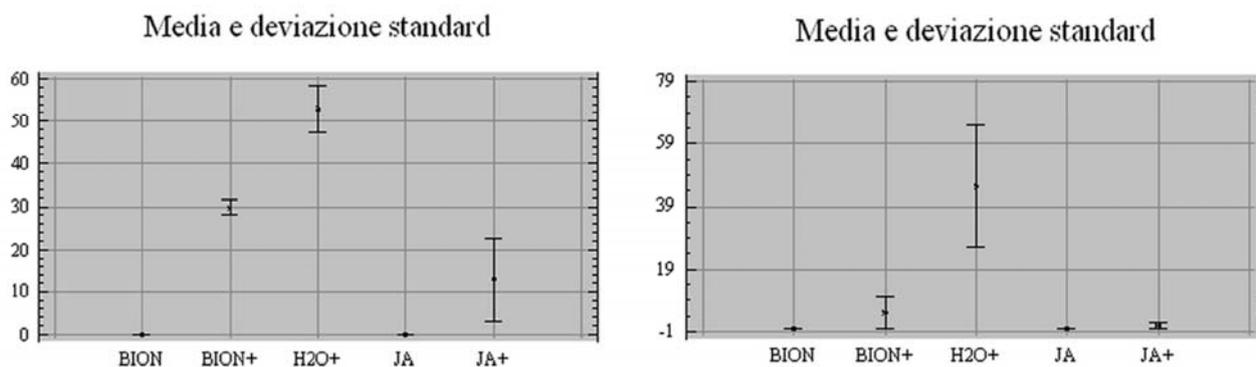


Figura 4: Grafico delle medie e della deviazione standard ottenuto dall'analisi statistica dei valori di gravità di malattia (a sinistra) e valori di infezione % delle cariossidi (a destra). I dati derivano dalla media di 9 piante.

Discussione

Per la prima volta su frumento duro è stata analizzata biomolecolarmente l'attivazione di una risposta SAR verso *F. graminearum*. Per questo sono stati appositamente disegnati diversi primers sui geni *PR-2*, *PR-3*, *LOX II* ed ubiquitina, fra questi sono stati selezionate le coppie risultate più informative che sono state testate con successo in questo lavoro. Il limitato numero di geni considerati non permette di fare considerazioni generali sulle caratteristiche della SAR attivate da nell'interazione ospite - patogeno. Tuttavia appare evidente un ruolo importante della via attivata da JA. La lipossigenasi risulta stimolata da JA e da etilene ed è deputata alla formazione di idroperossidi dell'acido α -linolenico (18:3) o linoleico (18:2). Questi risultano il substrato di partenza per diversi gruppi di composti, in particolare la lipossigenasi risulta enzima chiave nel ciclo Ottadecanoico e dei Jasmonati e come segnale per attivare la via di segnalazione del Ca^{2+} e di conseguenza nella trasduzione dei segnali cellulari legati alla resistenza indotta. Nelle nostre prove Bion[®] induce nelle piante di frumento duro trattate, un aumento della traduzione di questo gene, che però rimane costante in presenza di infezione attiva. L'acido jasmonico, invece, sembra ridurre in assenza di infezione l'espressione di questo enzima e viceversa, indurre nei tessuti prossimi al punto d'inoculo, una forte attività lipossigenasica, nella fase di riconoscimento e nelle prime 24 ore di colonizzazione da parte di *F. graminearum*.

Nel frumento tenero, l'espressione di PR-proteins non è legata direttamente alla resistenza alla FDS, tuttavia, l'espressione dei geni *PR-2* e *PR-3* viene incrementata da trattamenti con Bion[®] e JA, come già dimostrato da diversi autori (Pritsch *et al.*, 2001; Yu e Muehlbauer,

2001; Li e Yen 2008; Pasquer *et al.*, 2005). Tale espressione tuttavia appare perturbata in presenza del patogeno.

Le β -1-3,endo –glucosidasi, enzimi atti ad idrolizzare i legami glicosidici dei glucani presenti nel sistema, appaiono espresse nel frumento duro nel normale processo di patogenesi. I trattamenti con Bion[®] incrementano questa attività nelle piante infette, mentre JA sembra aumentare la traduzione di questi tratti solo in assenza del patogeno.

Le Chitinasi PR-3, che hanno attività enzimatica sulla chitina, il principale costituente della parete cellulare dei funghi superiori, rispondono all'attivazione con gli elicitori chimici mostrando dopo l'inoculazione una attività traduzionale superiore rispetto alle piante non trattate.

La gravità di malattia risulta tuttavia ridotta da entrambi i tipi di molecola segnale, dimostrando comunque una certa attività di Bion[®] e JA nell'indurre modificazioni fisiologiche nella pianta. L'effetto maggiore è stato indotto da JA, che sembra aver ridotto notevolmente i sintomi di FDS nelle condizioni sperimentali utilizzate. Anche Bion[®] ha garantito una riduzione della gravità di malattia e di percentuale di cariossidi infette, ma in maniera minore rispetto a JA.

Generalizzando si può affermare che sono riconoscibili almeno due diversi profili di resistenza sistemica acquisita nel frumento duro in accordo con quanto osservato per il frumento tenero. Per chiarire, tuttavia, se il percorso mediato da JA sia sinergico o antagonista a quello mediato da Bion[®], è importante seguire l'andamento di enzimi come la Allene ossido sintasi, che risulta modulata positivamente da JA, la flavonol sintasi, che risulta ridotta da JA e la calacone sintasi che invece risulta ridotta da JA, e indotta da SA e etilene (Schenk *et al.*, 2000). Inoltre, la riduzione nell'espressione di PR-2 e PR-3 nelle piante trattate con gli induttori ed inoculate, rispetto a quelle non inoculate, lascia pensare ad una attività di modulazione operata da effettori fungini, che agiscono nel ridurre i tratti del sistema immunitario basale nell'ospite, tipica delle interazioni non ospite.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Anand A., Zhou T., Trick H.N., Gill B.S., Bockus W.W., Muthukrishnan S., 2003. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* 54,1101–1111.
- Andersen A.L., 1948. The development of *Gibberella zae* head blight of wheat. *Phytopathology* 38, 595-611.
- Anderson D.W., Black R.M., Lee C.G., Pottage C., Rickard R.L., Sanford M.S., Webber T., 1989. Structure activity studies of trichothecenes: cytotoxicity of analogues and reaction products derived from T-2 toxin and neosolaniol. *J. Med. Chem.* 52, 555-562.
- Anderson J.A., Stack R.W., Liu S., Waldron B.L., Fjeld A.D., Coyne C., 2001. DNA markers for fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theory Appl. Genetics* 102, 1164-1168.
- Aoki T., O'Donnell K., 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* 91, 597-609.
- Arcangeli G., Bacchiocchi C., Lazzari V., Lazzati S., Meyer J., Cantoni A., 2006. Prothioconazole: Una nuova sostanza attiva per il contenimento delle malattie fungine dei cereali - *ATTI Giornate Fitopatologiche* II, 21-26.
- Atanasoff D., 1920. Fusarium blight (scab) of wheat and other cereals. *Journal of Agricultural Research* 20,1 -32.
- Bai G.H., Shaner G., 1994. Scab of wheat: prospects for control. *Plant Disease* 78, 760-766.
- Bai G.H., Guo P.G., Kolb F.L., 2003. Genetic relationships among head blight resistant cultivars of wheat assessed on the basis of molecular markers. *Crop Sci* 43, 498–507.
- Bakan B., Pinson L., Cahagnier B., Melcion D., Semon E., Richard-Molard D., 2001. Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives Contaminants* 18, 998-1003.
- Balmas V., Corazza L., 1994. *Fusarium graminearum* Group 2 causal agent of scab of durum wheat in central Italy. *Informatore fitopatologico* 44(11), 59-62.
- Balmas V., Santori A., Corazza L., 2000. Le specie di *Fusarium* più comuni in Italia: suggerimenti per il loro riconoscimento. *Petria* 10, suppl. 1, 1-60.
- Balmas V., Zefelippo M., Corazza L., 1995. *Fusarium* infection of the spike: an ever more frequent disease. *L'Informatore agrario* 51(35), 55-57.
- Ban T., 2000. Review studies on the genetics of resistance to Fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum* in wheat. In Proceedings of the International Symposium on Wheat Improvement for Scab Resistance, Suzhou and Nanching, China, 5–11 May 2000. Edited by J. Raupp, Z. Ma, P. Chen, and D. Liu. Kansas State University Printing, Manhattan, Kans. pp. 82–93.
- Bateman G.L., 2005. The contribution of ground-level inoculum of *Fusarium culmorum* to ear blight of winter wheat. *Plant Pathol.* 54, 299-307.
- Bent A.F., Mackey D., 2007. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 399-436.
- Beßer K., Jarosch B., Langen G., Kogel K.H., 2000. Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol Plant Pathol* 1, 277–286.
- Bernardo A., Bai G., Guo P., Xiao K., Guenzi A.C., Ayoubi P., 2006. *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between head blight resistant and susceptible cultivars. *Funct. Integr. Genomics*, in press

- Booth C., 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Bottalico A., Perrone G., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 611–624
- Brandfass C., Karlovsky P., 2008. Upscaled CTAB-based DNA extraction and Real-Time PCR assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in plant material with reduced sampling error. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 2306-2321
- Brennan J.M., Fagan B., Van Maanen A., Cooke B.M., Doohan F.M., 2003. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* 109, 577–587.
- Buertsmayr, H., Lemmens, M., Hartl, L., Doldi, L., 2002. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theory Appl. Genetics* 104, 84-91.
- Bushnell W.R., Hazen B.E., Pritsch C., 2003. Histology and physiology of *Fusarium* head blight. In *Fusarium head blight of wheat and barley* (Leonard, K.J., Bushnell, W.R., eds.). St. Paul, MN: APS Press, 44-83.
- Campell K.A.G., Lipps P.E., 1998. Allocation of resources: Sources of variation in *Fusarium* head blight screening nurseries. *Phytopathology* 88, 1078-1086.
- Carter J.P., Rezanoor H.N., Desjardins A.E., Nicholson P., 2000. Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathol.* 49, 452–460.
- Carter J.P., Rezanoor HN., Holden D., Desjardins A.E., Platter R.D., Nicholson P., 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 108, 573-583.
- Casulli F., Pancaldi D., De Lillo E., Alberti I., 1995., Observations on wheat crown rot and head blight caused by *Fusarium* spp. *International Seminar on Fusarium–Mycotoxins, Taxonomy and ...*,
- Chen W.P., Chen P.D., Liu D.J., Kynast R., Friebe B., Velazhahan R, Muthukrishnan S, Gill B.S. 1999. Development of wheat scabsymptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene. *Theor. Appl. Genet.* 99, 755–760.
- Clear R., Patrick S., 2006. *Fusarium* head blight in western Canada. Canadian Grain Commission. <http://grainscanada.gc.ca>.
- Corazza L., Balmas V., Pasquini M., 1989. La scabbia del frumento nell'Italia centrale. *L'informatore Agrario* 45 (23), 45-47.
- Cumagun C.J.R., Bodwen R.L., Jurgenson J.E., Leslie J.F., Miedaner T., 2004. Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology* 94, 520-526.
- Delaney T.P., Fridrrich L., Ryals J.A., 1995. Arabidiopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6602-6606.
- Demeke T., Clear R.M., Patrick S.K., Gaba D., 2005. Species-specific PCR based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 271-284.
- Desjardin A.E., 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology. APS Press, St. Paul, MN.
- Desmond O.J., Edgar C.I., Manners J.M., Maclean D.J., Schenk P.M., Kazan K., 2005. Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom

- development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67, 171–179.
- Dill-Macky R., Jones R.K., 2000. The effects of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease* 84, 71-76.
 - Dong X., 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:547–552.
 - Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205–207.
 - Doohan F.M., Brennan J.M, Cooke B.M., 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 755-768.
 - Doohan F.M., Nicholson P., Parry D.W., 1996. Efficacy of the fungicides Prochloraz and Pyrimethanil against *Fusarium culmorum* ear blight of wheat. *Brighton Crop Protection Conference, Pest & Disease* 1, 409-410.
 - Dubin H.J., Gilchrist L., Reeves J., McNab A., eds. 1997. *Fusarium* head scab: Global status and prospects. CIMMYT, Mexico, DF, Mexico. 130 p.
 - Farmer E.E., Ryan C.A., 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129–134.
 - Fekete C., Logrieco A., Giczey G., Hornok L., 1997. Screening of fungi for the presence of the trichodiene synthase encoding sequence by hybridization to the *Tri5* gene cloned from *Fusarium poae*. *Mycopathologia* 138, 91-97.
 - Francis R.G, Burgess L.W., 1977. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'graminearum' in eastern Australia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 68, 421-427.
 - Gagkaeva, T.Y., Yli-Mattila, T., 2004. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* in Europe and Asia. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 550–562.
 - Gale L.R., 2003. Population biology of *Fusarium* species causing head blight of grain crops. *Fusarium* head blight of wheat and barley. APS Press, St. Paul, MN, pp. 120–143.
 - Gale L.R., Ward T.J., Balmas V., Kistler H.C., 2007. Population subdivision of *Fusarium graminearum* sensu stricto in the upper Midwestern United States. *Phytopathology* 97, 1434-1439.
 - Gerlach W., Nirenberg H., 1982. The genus *Fusarium* - a pictorial atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 209, 1–406.
 - Gilbert F., Fernando W.G.D., 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26, 464-472.
 - Gilbert J., Tekauz A., 2000. Review. Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22, 1-8.
 - Gilbert S.M., Clarkson D.T., Cambridge M., Lambers H., Hawkesford M.J., 1997. SO₄²⁻ deprivation has an early effect on the content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant Physiology* 115, 1231–1239.
 - Giraud T., Refrégier G., Gac I.L., de Vienne D.M., Hood M.E., 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 45, 791–802.
 - Glazebrook J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–207.
 - Golkari S., Gilbert J., Prashar S., Procunier J.D., 2007. Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnol J.* 5, 38–49.
 - Grolach J., Volrath S., Knauf-Beiter F., Hengy G., Beckhove U., Kogel K.-H., Oostendorp M., Staub T., Ward E., Kessmann H., Ryal J., 1996. Benzothiadiazole, a

- novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629–643.
- Goswami R.S., Kistler H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5, 515–525.
 - Guenther J.C., Trail F., 2005. The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia* 97, 229-237.
 - Haidukowki M., Pascale M., Perrone G., Pancaldi D., Campagna C., Visconti A., 2005. Effect on fungicides on the development of Fusarium head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 191-198.
 - Han F.P., Fedak G., Ouellet T., Dan H., Somers D.J, 2005. Mapping genes expressed in *Fusarium graminearum*-infected heads of wheat cultivar 'Frontana'. *Genome* 48, 88–96.
 - Hause B., Vörös K., Kogel K.H., Besser K., Wasternack C., 1999. A jasmonate-responsive lipoxygenase of barley leaves is induced by plant activators but not by pathogens. *J Plant Physiol* 154,459–462.
 - Heier T., Jain S. K., Kogel K.-H., Pons-Kühnemann J., 2005. Influence of N-fertilization and Fungicide Strategies on Fusarium Head Blight Severity and Mycotoxin Content in Winter Wheat. [*Journal of Phytopathology* 153 \(9\), 551-557.](#)
 - Henriksen B., Elen O., 2005. Natural *Fusarium* Grain Infection Level in Wheat, Barley and Oat after Early Application of Fungicides and Herbicides. [*Journal of Phytopathology* 153 \(4\), 214-220.](#)
 - Hohn T.M., Beremand P.D., 1989. Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 79, 131-138.
 - Hohn T.M., Desjardins A.E., 1992. Isolation and gene disruption of the tox5 gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Molec. Plant-Microbe Interactions* 5, 249-256.
 - Hohn T.M., Desjardins A.E., McCormick, S.P., 1995. The *Tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 248, 95-102.
 - Hohn T.M., Krishna R., Proctor R.H., 1999. Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genet. Biol.* 26, 224-235.
 - Horberg H.M., 2002. Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* and *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 108, 73-80.
 - Hutcheon J.A., Jordan V.W.L., 1992. Fungicide timing and performance for Fusarium control in wheat - *Proceedings of the Brighton Cop Protection Conference, Pests and Disease*, Vol. 2 Farnham UK. BCPC Publication 633-638.
 - Infantino A., Conca G., Di Giambattista G., Pucci N. and Porta-Puglia A., 2001. Lo stato sanitario delle cariossidi di frumento. *L'Informatore Agrario* 18, 90–91
 - Jain S.K., Langen G., Hess W., Borner T., Hückelhoven R., Kogel K.H., 2004. The white barley mutant albostrians shows enhanced resistance to the biotroph *Blumeria graminis* f.sp. hordei. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 374–382.
 - Jansen C., von Wettstein D., Schäfer W., Kogel K.-H., Felk A., Maier F.J., 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and

- trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16892–16897.
- Jennings P., Coates M.E., Turner J.A., Chandler E.A., Nicholson P., 2004a. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathol.* 53, 182-190.
 - Jennings P., Coates M.E., Turner J.A., Chandler E.A., Nicholson P., 2004b. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathol.* 53, 643-652.
 - Ji L., Cao K., Hu T., Wang S., 2007. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from China by PCR assay. *Phytopathology* 155, 505-512.
 - Joffe A.Z. , 1986 - *Fusarium* species: their biology and toxicology. Ed. Wiley
 - Johnson A.G., Dickson J.G., Johan H., 1920. An epidemic of *Fusarium* blight (scab) of wheat and other cereals. *Phytopathology* 10, 51.
 - Johnson C., Boden E., Arias J., 2003. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1846–1858.
 - Jones R.K., 2000. Assessments of *Fusarium* head blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. *Plant Dis.* 84, 1021-1030.
 - Jugnet M.P., 1994. Fusarioses: vers des traitements mieux cibles. *Cultivar* 356, 43-45.
 - Khan N.I., Schisler D.A., Boehm M.J., Lipps P.E., Slininger P.J., 2004. Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biol. Control* 29, 245–255
 - Kang Z., Buchenauer H., 2002. Immunocytochemical localization of β -1,3-glucanase and chitinase in *Fusarium culmorum*-infected wheat spikes. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 60, 141–153.
 - Khonga E.B., Sutton J.C., 1988. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. *Canadian Journal of Plant Pathology* 10, 232-240.
 - Kimura M., Anzai H., Yamaguchi I., 2001. Microbial toxins in plant-pathogen interactions: biosynthesis, resistance mechanisms, and significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47, 149-160.
 - Kimura M., Kaneko I., Komiyama M., Takatsuki A., Koshino H., Yoneyama K., Yamaguchi I., 1998. Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101. *J. Biol. Chem.* 273, 1654-1661.
 - Kinkema M., Fan W., Dong, X., 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* 12, 2339–2350.
 - Koehler B., Dickson J.G., Holbert J.R., 1924, Wheat scab and corn root rot caused by *Gibberella saubinetii* in relation to crop successions. *Journal of Agricultural Research* 27, 861-70.
 - Kosiak B., Skjerve E., Thrane U., Torp M., 2003. The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. *Acta Agric. Scand.* 53, 168-176.
 - Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Watanabe H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7, 253-259.
 - Kurek E., Jaroszuk C.S., Shtsels J.Z., 2003. Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biol. Control* 26, 48-56.

- Lacey J., Bateman G.L., Mirocha C.J., 1999. Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 134, 277-283.
- Láday M., Juhász Á., Mule G., Moretti A., Szécsi Á., Logrieco A., 2004. Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 545–550.
- Le Douarec A., Barchietto T., Desbrosses B., Foessel P., Seng J.M., 2008, Le Bromuconazole : Face Aux Fusarioses Du Blé – *Phytoma La Défense Des Végétaux* 615, 28-31
- Lee T., Oh D-W., Kim H-S., Lee J., Kim Y-H., Yun S-H., Lee Y-W., 2001. Identification of Deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7), 2966-2972.
- Lee T., Han Y.K., Kim K.H., Yun S.H., Lee Y.W., 2002. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 2148-2154.
- Leslie J.F., Summerell B.A., 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing professional, Ames, Iowa, U.S.A.
- Lewadowski S., Bushnell W.R., 2001. Development of *Fusarium graminearum* on floret surface of field-grown barley. 2002 National Fusarium Head Blight forum Proceedings. East Lansing: Michigan State University, p. 128.
- Li W.L., Faris J.D., Muthukrishnan S., Liu D.J., Chen P.D., 2000. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theor. Appl. Genet.* 102, 353–362.
- Li G., Yen Y., 2008. Jasmonate and Etylene Signaling Pathway May Mediate Fusarium Head Blight Resistane in Wheat. *Crop Science* 48,1888-1896.
- Liu S., Anderson J.A., 2003. Marker assisted evaluation of Fusarium head blight resistant wheat germplasm. *Crop Sci.* 43, 760-766.
- Llorens A., Hinojo M.J., Mateo R., Gonzalez-Jaen M.T., Valle-Algarra F.M., Logrieco A., Jimenez M., 2006. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *Int. J. Food Microbiol.* 106, 287-306.
- Logrieco A., Mulè G., Moretti A., Bottalico A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 597-609.
- Lohdi M. A., Ye G., Weeden F., Reisch B. I., 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant molecular biology reporter* 12, 6-13.
- Lops R., Pascale M., Pancaldi D., Visconti A., 1998. Infezioni fungine e presenza di deossinivalenolo in cariossidi di frumento prodotte in diverse regioni italiane. *Informatore Fitopatologico* 48, 60-66.
- Lu W.Z., Cheng S.H., Wang Y.Z., 2001. Study on Wheat Fusarium Head Blight. Science Press, Beijing, P.R. China.
- Luongo L., Galli M., Corazza L., Meekes E., De Haas L., Van der Plas C.L., Kohl J., 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. In: Wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Sci. Technol.* 15, 229-242.
- Luz W.C., Stockwell C.A., Bergstrom G.C., 2003. Biological control of *Fusarium graminearum*. In: Leonard, K.J., Bushnell, W.R., (ed.) “Fusarium head blight of wheat and barley”, 381-394.

- Mackintosh C., Lewis J., Radmer L.E., Shin S., Heinen S.J., Smith L.A., Wyckoff M.N., Dill-Macky R., Evans C.K., Kravchenko S., Baldrige G.D., Zeyen R.J. and Muehlbauer G.J., 2007. Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Cell Rep.* 26, 479–488.
- MacInnes J., Fogelman R., 1923, Wheat scab in Minnesota. *University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin* 18, 32 pp.
- Makandar R., Essig J.S., Schapaugh M.A., Trick H.N., Shah J., 2006. Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of Arapidopsis NPR1. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19,123–129.
- Maier F.J., Miedaner T., Hadelers B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H., Schäfer W., 2006. Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Mol. Plant Pathol.* 7, 449–460.
- Markell S.G., Francl L.J., 2003. *Fusarium* head blight inoculum: species prevalence and *Gibberella zeae* spore type. *Plant Dis.* 87, 814-820.
- Matsumoto G., Wuchiyama J., Shingu Y., Kimura M., Yoneyama K., Yamaguchi I., 1999. The trichothecene biosynthesis regulatory gene from the type B producer *Fusarium* strains: sequence of *Tri6* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 2001-2004.
- Mauler-Machnik A., Kerz-Mohlendick F., Dutzmann S., 2004. US Patent App. 10/576,181.
- McCormick S.P., 2003. The role of DON in pathogenicity. In: Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (Eds.), *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 165-183.
- McCormick S.P., Hohn T.M., Desjardins A.E., 1996. Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 353-359.
- McLaughlin C.S., Vaughan M.H., Campbell I.M., Wei C.W., Stafford M.E., Ansen B.S., 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. In: Rodricks, J., Hesseltine, C., Mehlman, M. (Eds.), *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Chem-Orbital, Park Forest, IL, pp. 263–273.
- McMullen M., Jones R., Gallenberg D., 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81, 1340–1348.
- Menniti A.M., Pancaldi D., Maccaferri M., Casalini L., 2003. Effect of fungicides on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain - *European Journal of Plant Pathology* 109, 109-115.
- Mentewab A., Rezanoor H.N., Gosman N., Worland A.J., Nicholson P., 2000. Chromosomal location of *Fusarium* head blight of Wheat and Barley. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota, 165-183.
- Mesterhazy A., 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* 108, 675-684.
- Mesterhazy A., 1997: Breeding for resistance to *Fusarium* head blight of wheat. In: H. J. Dubin, L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds), *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*, Mexico.
- Mesterhazy, A., 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114, 377-388.

- Mesterhazy A., Bartok T., Mirocha C.G., Komoroczy R., 1999. Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding* 118, 97-110.
- Miedaner T., Schilling A.G., Geiger H.H., 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. *Journal of Phytopathology* 149, 641-648.
- Miller J.D., Culley J., Fraser K., Hubbard S., Meloche F., Ouellet T., Seaman W.L., Seifert K.A., Turkington K., Voldeng H., 1998. Effect of tillage practice on fusarium head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20, 95-103.
- Miller J.D., Greenhalgh R., Wang Y.Z., Lu M., 1991. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia* 83, 121-130.
- Miller J.D., Young J.C., Sampson D.R., 1985. Deoxynivalenol and Fusarium head blight resistance in spring cereals. *Phytopathology*, 4, 359-367.
- Milus E.A., Parsons C.E., 1994. Evaluation of foliar fungicides for controlling Fusarium head blight of wheat. *Plant Disease* 78 (7), 697-699.
- Molina A., Görlach J., Volrath S., Ryals J., 1999. Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 53-58.
- Montorsi F., Pezzali M., Margarita L., 1988. Alcune osservazioni su semente di grano duro in Italia settentrionale. *Informatore Fitopatologico* 38 (10), 63-67.
- Morooka, N., Uratsuji N., Yoshizawa T., Yamamoto H., 1972. Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* species. *J. Food Hygiene Soc Japan* 13, 368-375.
- Munkvold G.P., 2003. Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109, 705-713.
- Muthomi J.W., Schutze A., Dehne H.W., Mutitu E.W., Oerke E.C., 2000. Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. *J. Plant Dis. Prot.* 107, 113-123.
- Nei M., Li W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5269-5273.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O., 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University press, University Park, USA.
- Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W. and Joyce D., 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53, 17-37
- O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K., Casper H.H., 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 7905-7910.
- O'Donnell K., Ward T.J., Aberra D., Kistler H.C., Aoki T., Orwig N., Kimura M., Bjonnstad, Klemsdal S.S., 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology* 45, 1514-1522.
- O'Donnell K., Ward T.J., Geiser D.M., Kistler H.C., Aoki Y., 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes support formal recognition of nine phylogenically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol.* 41, 600-623.

- Obts A., Fuchs H., 2000. The contamination of winter and spring sown cereals with *Fusarium* results from random seed samples produced in Bavaria 1987-99. Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur and Pflanzenbau, München 4, 21-25.
- Osborne L.E., Stein J.M., 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119 (1-2), 103-108.
- Pancaldi D., Grazzi G., Alberti I., 1996. La fusariosi della spiga di frumento in Emilia Romagna nel 1995. *Informatore fitopatologico* 46 (4), 16-20.
- Pancaldi D. and Torricelli R., 1999. Presenza di specie di *Fusarium* su cariossidi di frumento duro in Emilia-Romagna nel triennio '94-'96. *L'Informatore Agrario* 3, 42-46.
- Pancaldi D., Alberti I., 2001. Le principali malattie su foglia e spiga del frumento. *L'Informatore Agrario* 20, 63-69.
- Pancaldi D., Marchi A., Covarelli L., Nicholson P., 2003. Identificazione e quantificazione mediante PCR di alcune specie di *Fusarium* agenti causali della fusariosi della spiga del frumento su spighe senza sintomi. *Informatore Fitopatologico* 5, 42-47.
- Pancaldi D., Pisi A., Alberti I., Romani S. 2004. Control of *Fusarium* head blight and accumulation of deoxynivalenol in durum wheat grain, semolina and bran. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 351-359.
- Pancaldi D., Campagna C., Haidukowki M., Pascale M., Perrone G., Visconti A., 2005. Efficacia di fungicidi sulla "fusariosi della spiga" ed effetto sul contenuto di deossinivalenolo nel frumento. *Informatore fitopatologico* 55 (1), 57-61.
- Parry D.W., Bayles R.A., Priestley R.H., 1984. Resistance of winter wheat varieties to ear blight (*Fusarium culmorum*). *Journal of the National Institute of Agricultural Botany* 16, 465-468.
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grains - a review. *Plant Pathol.* 44, 207-238.
- Parry D.W., Nicholson P., 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology* 45, 383-39.
- Pascale M., De Girolamo A., Visconti A., Pancaldi D., 2000. Indagine sulla presenza di deossinivalenolo in cereali prodotti in alcune aree del Nord Italia nel 1998. *L'Informatore Agrario* 10, 68-73.
- Pascale M., Pancaldi D., Visconti A., Perrone G., Bottalico A., 2001. *Fusarium* ear blight, deoxynivalenol and toxigenic *Fusarium* species in selected wheat cultivars assayed all over Italy, in 2000. In: Proceedings of 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 17-20 September 2001 University of Evora, Portugal, 123-125.
- Pasquer F., Isidore E., Zarn J., Keller B., 2005. Specific patterns of changes in wheat gene expression after treatment with three antifungal compounds. *Plant Mol. Biol.* 57, 693-707.
- Pasquini M., Cardone A.M., Casini F., Casulli F., Chierico M., Contoli S., Converso R., Corazza L., Del Vecchio A., Iori A., Lombardi T., Lombardo G.L., Mazzocchetti A., Natalizi G., Notario T., Pancaldi D., Raimondo I., Ratti C., Riccardi M., Rubies-Autonell C., Sereni L., Vallega V., Virzi N. and Vitale S., 2001. Monitoraggio delle malattie sui cereali autunno-vernini: le principali malattie del frumento. *L'Informatore Agrario* 1, 33-39.
- Paul P.A., El-Allaf S.M., Lipps P.E., Madden L.V., 2004. Rain splash dispersal of *Gibberella zeae* within canopies in Ohio. *Phytopathology* 94, 1342-1349.

- Peglion V., 1900. Sulla cosiddetta “Golpe Bianca” del frumento. *Bollettino Notiziario Agrario* 20, 17-26.
- Penninckx I.A., Eggermont K., Terras F.R., Thomma B.P., De Samblanx G.W., Buchala A., 1996. Pathogen induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8, 2309–2323.
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavolovic M., 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Org.* 77, 754–766.
- Pereyra S.A., Dill-Macky R., Sims A.L., 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease* 88, 724-730.
- Pestka J.J., Smolinski A.T., 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 8, 39–69.
- Pisi A., Tonti S., Prodi A., Nipoti P., Alberti I., Pancaldi D., 2008. Strategies to control *Fusaria* to reduce toxin contaminations in durum wheat - CEFood Meeting Cavtat 15-17th May 2008, Book of Abstracts, 172.
- Placinta C.M., D’Mello J.P.F., MacDonald A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereals grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.* 78, 21-37.
- Pritsch C., Muehlbauer G.J., Bushnell W.R., Somers D.A., Vance C.P., 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Microbe Interact* 13,159–169.
- Pritsch C., Vance C.P., Bushnell W.R., Somers D.A., Hohn T.M., Muehlbauer G.J., 2001. Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 58, 1–12.
- Proctor R.H., Hohn T.M., McCormick S.P., 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin in biosynthetic gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 593-601.
- Purss G.S., 1971. Pathogenic specialization in *Fusarium graminearum*. *Australian Journal of Agricultural Research* 22, 553-61.
- Qu B., Li H.P., Zhang J.B., Xu J.B., Huang T., Wu A.B., Zhao C.S., Carter J., Nicholson P and Liao Y.C., 2008a. Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. *Plant Pathology* 57, 15-24.
- Qu B., Li H.P., Zhang J.B., Huang T., Carter J., Liao Y.C. and Nicholson P., 2008b. Comparison of genetic diversity and pathogenicity of fusarium head blight pathogens from China and Europe by SSCP and seedling assays on wheat. *Plant Pathology* 57, 642-651.
- Quarta A., Mita G., Haidukowski M., Santino A., Mulè G., Visconti M., 2005. Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Food Additives and Contaminants* 22(4), 309–315.
- Reynoso M.M., Ramirez M.L., Leslie J.F., Chulze S.N., 2007. Trichothecene chemotypes of isolate of *Gibberella zeae* recovered from wheat in Argentina. In: *Proceedings of 2007 National Head Blight Forum, Kansas City, 2007*: 34.
- Rossi V., Ravanetti A., Patteri E., Giosue S., 2001. Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing Fusarium head blight. *Journal of Plant Pathology* 83, 189-198.
- Ruckebauer P., Buestsmayr H., Lemmens M., 2001. Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). *Euphytica* 119, 121-127.

- Rudd J.C., Horsley R.D., McKendry A.L., Elias E.M., 2001. Host plant resistance genes for Fusarium head blight: I. Sources, mechanisms, and utility in conventional breeding systems. *Crop Sci.* 41, 620–627.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M.D., 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 8, 1809-1819
- Ryu J., Ohtsubo K., Izumiyama N., Nakamura K., Tanaka T., Yamamura H., Ueno Y., 1988. The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 11, 38-47.
- Salas B., Steffenson B.J., Casper H.H., Tacke B., Prom L.K., Fetch Jr. T.G, Swartz P.B., 1999. Fusarium species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease* 83, 667–674.
- Sarlin T., Yli-Mattila T., Jestoi M., Rizzo A., Paavanen-Huhtala S., Haikara A., 2006. Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt, *Europ. J. Plant Pathol.* 114, 371–380.
- Schaafsma A.W., Tamburic-Ilinic L., Miller J.D., Hooker D.C., 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Can. J. Plant. Pathol.* 23, 279–285.
- Schaffrath U., Zabbai F., Dudler R., 2000. Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *Eur J Biochem* 267, 5935–5942.
- Schilling A.G., Miedaner T., Geiger H.H., 1997. Molecular variation and genetic structure in field populations of *Fusarium* species causing head blight in wheat. *Cereal Research Communication* 25, 549-54.
- Schroeder H.W., Christensen J.J., 1963. Factors affecting resistance of wheat scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53, 831-838.
- Schenk P.M., Kazan K, Wilson I., Anderson J.P., Richmond T, Somerville S.C., Manners J.M., 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 11655–11660.
- Scoz L.B., Astolfi P., Reartes D.S., Schmale III D.G., Moraes M.G., Del Ponte E.M., 2008. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology* DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.01949.x
- Shan D.A., Pucci N., Infantino A., 2005. Regional and varietal differences in the risk of wheat seed infection by fungal species associated with Fusarium head blight in Italy. *Eur. J. Plant Pathol.* 112, 13-21.
- Simpson R., Weston G.E., Turner J.A., Jennings P., Nicholson P., 2001. Differential Control of Head Blight Pathogens of Wheat by Fungicides and Consequences for Mycotoxin Contamination of Grain - *European Journal of Plant Pathology* 107, 421-431.
- Singh R.P., Ma H., Rajaram S., 1995. Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Frontana. *Plant Disease* 79 (3), 238-240.
- Smith W.G., 1884. Diseases of Field and Garden Crops. London MacMillan & Co., 208-13.
- Snijders C.H.A., 1990. Fusarium head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96, 187-198.
- Spoel S.H., Koornneef A., Claessens S.M., Korzelius J.P., Van Pelt J.A., Mueller M.J., 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15, 760–770.

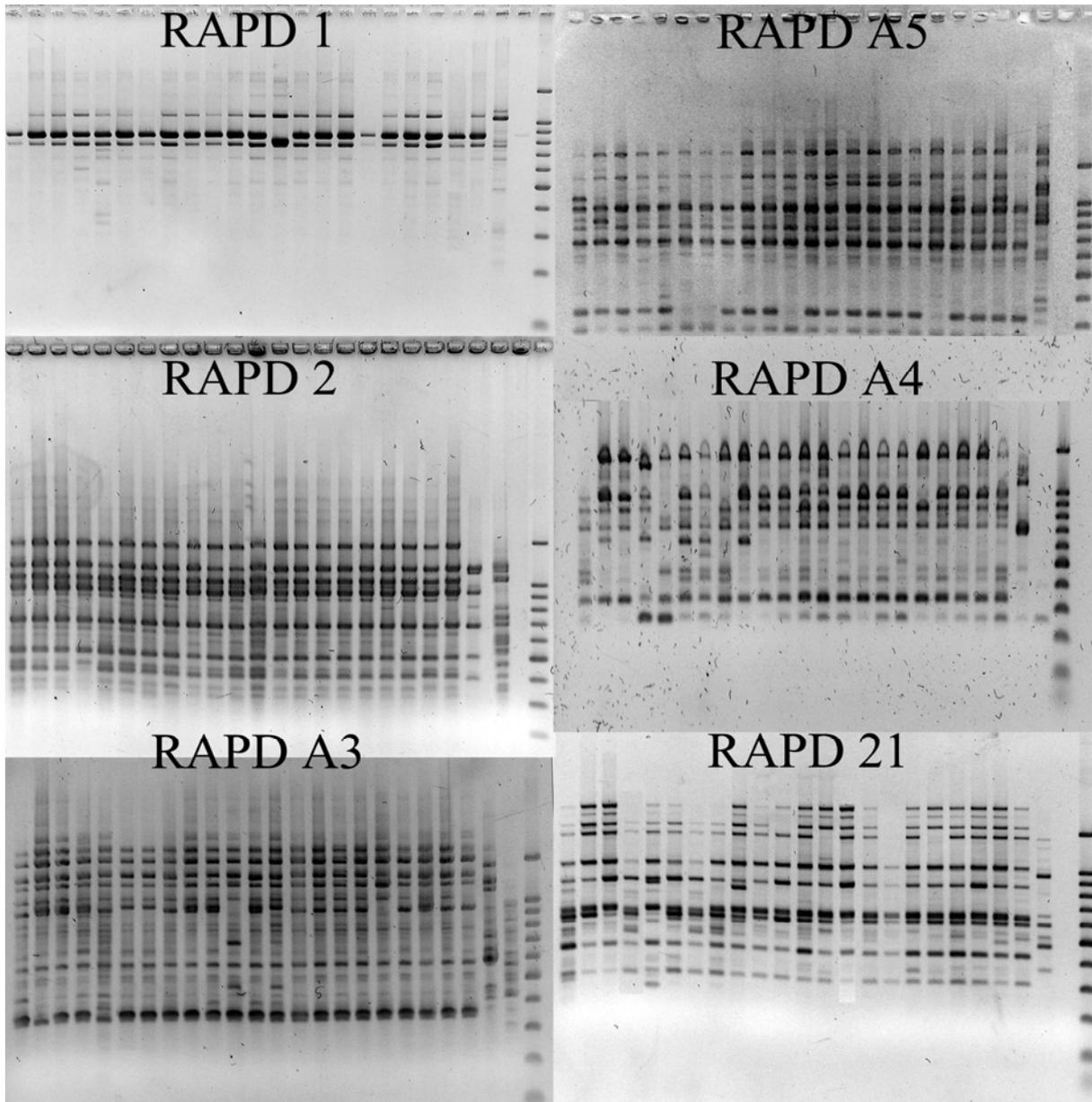
- Stack R.W., 1999. Return of an old problem: Fusarium head blight of small grains. APSnet Plant Pathology Online. <http://www.apsnet.org/online/feature/FHB/Top.html>.
- Stack R.W., McMullen M. P., 1985. Head blighting potential of Fusarium species associated with spring wheat heads. *Can. J. Plant Pathol.* 7, 79-82.
- Starkey D.E., Ward T.J., Aoki T., Gale L.R., Kistler H.C., Geiser D.M., Suga H., Tóth B., Varga J., O'Donnell K., 2007. Global molecular surveillance reveals novel Fusarium head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genet. Biol.* 44 (11), 1191–1204.
- Strange R.N, Smith H., 1978. Effect of choline, betaine and wheat germ extract on growth of cereals pathogens - *Transaction of the British Mycological Society* 70, 193-199.
- Sturz A.V., Johnston H.W., 1983. Early colonization of the ears of wheat and barley by *Fusarium poae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 5, 107–110.
- Suga H., Karugia G.W., Ward T., Gale L.R., Tomimura K., Nakajima T., Miyasaka A., Koizumi S., Kageyama K., Hyakumachi M., 2008. Molecular Characterization of the *Fusarium graminearum* Species Complex in Japan. *Phytopathology* 98 (2) 159-166.
- Sutton J.C., 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.* 4, 195-209.
- Suty A., Mauler-Machnik A., Couron R., 1996. New findings on the epidemiology of fusarium ear blight on wheat and its control with tebuconazole. *Brighton Crop Prot. Conf. – Pests and Diseases*, 511-516.
- Tag A.G., Garifullina G.F., Peplow A.W., Ake C. Jr, Phillips T.D., Hohn T.M., Beremand, M.N., 2001. A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5294-5302.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S., Fisher M.C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31, 21–31.
- Teich A.H., Hamilton J.R., 1985. Effect of cultural practices, soil phosphorus, potassium, and pH on the incidence of Fusarium head blight and deoxynivalenol levels in wheat. *Applied and Environment Microbiol* 49, 1429-1431.
- Toth B., Kaszony G., Bartok T., Varga J., Mesterhazy A., 2008. Common resistance of wheat to members of the *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. *Plant Breeding* 127,1-8.
- Toth B., Mesterhazy A., Horvath Z., Bartok T., Varga M., Varga J., 2005. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. *Eur. J. Plant Pathol.* 113, 35–45.
- Toth B., Mesterhazy A., Nicholson P., Teren J., Varga J., 2004. Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 587-599.
- Tonti S., Prodi A., Sandalo S., Pancaldi D., Flamini L., Pisi A., 2007. Chemotyping of *Fusarium graminearum* from durum wheat in an area of Emilia Romagna region (North of Italy). XIV Convegno Nazionale SIPaV, 19-21 Settembre, Perugia, *Journal of Plant Pathology* 89 (3, Supplement), S63.
- Trail F., Xu H., Loranger R., Gadoury D., 2002. Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia* 94, 181
- Ueno Y., Ishii K., 1985. Chemical and biological properties of trichothecenes from *Fusarium sporotrichioides*. In: Lacey, J. (Ed.), *Trichothecenes and Other Mycotoxins*.

- Proc. Int. Mycotoxin Symposium*. Sydney, Australia, 1984. John Wiley & Sons, New York, pp. 307–316.
- Ueno Y., Nakajima M., Sakai K., Ishii K., Sato N., Shimada N., 1973. Comparative toxicology of trichothecene mycotoxins: inhibition of protein synthesis in animal cells. *J. Biochem.* 74, 285–296.
 - van Eeuwijk E.A., Mesterházy A., Kling C.I., Ruckebauer P., Saur L., Bürstmayr H., Lemmens M., Keizer L.C.P., Maurin N., Snijders C.H.A., 1995. Assessing non-specificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with European strains of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. nivale* using a multiplicative model for interaction. *Theor. Appl. Genet.* 90, 221–228.
 - Van Loon L.C., 1997. Induced resistance in plants and the role of Pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103, 753-765.
 - Verhagen B.W., Glazebrook J., Zhu T., Chang H.S., van Loon L.C., Pieterse C.M., 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 895–908.
 - Vesonder R.F, Ceigler A., Jensen A.H., 1973. Isolation of the emetic principle from *Fusarium graminearum*-infected corn. *Applied Microbiology* 26,1008-1010.
 - Vigier B., Reid L.M., Seifert K.A., Sterwert D.W., Hamilton R.I., 1997. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Can J. Plant Pathol.* 19, 60-65.
 - Vogelgsang S., Sulyok M., Hecker A., Jenny E., Krska, Schuhmacher R., Forrer H.R., 2008. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology*, DOI10.1007/s10658-008-9279-0
 - Voigt K., Schleier S., Bruckner B., 1995. Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics* 27, 528-35.
 - Waalwijk C., Kastelein P., de Vries I., Kerenyi Z., van der Lee T., Hesselink T., Kohl J., Kema G., 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 109, 743–754.
 - Wagacha J.M., Muthomi J.M., 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Science Direct.* 26, 877-885.
 - Ward T.J., Bielawski J.P., Kistler H.C., Sullivan E., O'Donnell K., 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 9278-9283.
 - Ward T.J., Clear R.M., Rooney A.P., O'Donnell K., Gaba D., Patrick S., Starkey D.E., Gilbert J., Geiser D.M., Nowicki T.W., 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genet. Biol.* 45, 473–484.
 - Weichert H., Stenzel I., Berndt E., Wasternack C., Feussner I., 1999. Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves – preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Lett* 464, 133–137.
 - Xing D.-H., Yen Y., Jin Y., Rudd J.C., 2004. Study of genes important to scab pathogenesis and resistance in wheat. In: Proc. of the 2nd Int. Wheat Scab Symp. 11–15 Dec. 2004, Orlando, FL. p.534–538.
 - Xu X.M., Parry D.W., Nicholson P., Thomsett M.A., Simpson D., Edwards S.G., Cooke B.M., Doohan F.M., Brennan J.M., Moretti A., Tocco G., Mule G., Hornok L., Giczey G., Tatnell J., 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing

- Fusarium ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* 112, 143-154.
- Yang Y., Qi M., Mei C., 2004. Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant J* 40, 909–919.
 - Yen Y., Xing D.-H., Rudd J.C., Jin J., 2000. Differentially expressed genes during scab development. In: Proc. of Int. Wheat Scab Symp., Suzhou and Nanjing, China. 5–10 May 2000. Nanjing Agricultural Univ., Suzhou and Nanjing. p. 239–244.
 - Yli-Mattila T., Mach R.L., Alekhina I.A., Bulat S.A., Koskinen S., Kullnig-Gradinger C.M., Kubicek C.P. and Klemsdal S.S., 2004. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, β -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology* 95, 267-285.
 - Yli-Mattila T., O'Donnell K., Ward T., Gagkaeva T., 2008. Trichotecene chemotype composition of *Fusarium graminearum* and related species in Finland and Russia. *Journal of Plant Pathology* 90 (3) S 3.60.
 - Yu G.Y., Muehlbauer G.J., 2001. Benzothiadiazole-induced gene expression in wheat spikes does not provide resistance to Fusarium head blight. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59, 129–136.
 - Zeller K.A., Bowden R.L., Leslie J.F., 2004. Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from the United States. *Mol. Ecol.* 13, 563–571.
 - Zhang S., Schisler D.A., Boehm M.J., Slininger P.J., 2007. Utilization of chemical inducers of resistance and *Cryptococcus flavescens* OH 182.9 to reduce Fusarium head blight under greenhouse conditions. *Biological Control* 42, 3, 308-315.
 - Zhou W., Kolb F.L., Riechers D.E., 2005. Identification of proteins induced or upregulated by Fusarium head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 48, 770–780.

ALLEGATI

ALLEGATO PAPER II



Profili RAPD ottenuti per 22 isolati oggetto di studio, Marcatore (100 bp Promega)

ALLEGATO PAPER III

Correlations

	DON_ppm	DNA_ug_g_1	DNA_ug_g_2	Fg	FUS
DON_ppm		0,0448 (31) 0,8109	0,1362 (31) 0,4649	0,1193 (31) 0,5225	-0,1198 (31) 0,5210
DNA_ug_g_1	0,0448 (31) 0,8109		0,7535 (31) 0,0000	0,4839 (31) 0,0058	0,1085 (31) 0,5613
DNA_ug_g_2	0,1362 (31) 0,4649	0,7535 (31) 0,0000		0,7181 (31) 0,0000	0,0160 (31) 0,9319
Fg	0,1193 (31) 0,5225	0,4839 (31) 0,0058	0,7181 (31) 0,0000		0,0528 (31) 0,7778
FUS	-0,1198 (31) 0,5210	0,1085 (31) 0,5613	0,0160 (31) 0,9319	0,0528 (31) 0,7778	
Gm1	-0,0874 (31) 0,6401	0,2010 (31) 0,2782	0,0544 (31) 0,7714	-0,3025 (31) 0,0982	0,2474 (31) 0,1796
Gm2	-0,1502 (31) 0,4200	0,1721 (31) 0,3547	0,0287 (31) 0,8780	-0,2654 (31) 0,1490	0,2524 (31) 0,1707
Inc_Int_ar	0,1293 (31) 0,4881	-0,2125 (31) 0,2511	-0,0187 (31) 0,9206	0,2827 (31) 0,1233	-0,2901 (31) 0,1134
Inc_GM_arc	0,1448 (31) 0,4371	-0,1678 (31) 0,3670	-0,0185 (31) 0,9214	0,2427 (31) 0,1884	-0,3664 (31) 0,0426
Inc1	-0,1443 (31) 0,4388	0,2154 (31) 0,2445	0,0495 (31) 0,7914	-0,2957 (31) 0,1063	0,2418 (31) 0,1900
Inc2	-0,0791 (31) 0,6724	0,2331 (31) 0,2070	0,1360 (31) 0,4655	-0,1525 (31) 0,4128	0,2200 (31) 0,2345
ResaTha	0,1016 (31) 0,5864	-0,1507 (31) 0,4185	-0,0204 (31) 0,9132	0,2537 (31) 0,1685	-0,3123 (31) 0,0872

Correlation
(Sample Size)
P-Value

	Gm1	Gm2	Inc_Int_ar	Inc_GM_arc	Incl
DON_ppm	-0,0874 (31) 0,6401	-0,1502 (31) 0,4200	0,1293 (31) 0,4881	0,1448 (31) 0,4371	-0,1443 (31) 0,4388
DNA_ug_g_1	0,2010 (31) 0,2782	0,1721 (31) 0,3547	-0,2125 (31) 0,2511	-0,1678 (31) 0,3670	0,2154 (31) 0,2445
DNA_ug_g_2	0,0544 (31) 0,7714	0,0287 (31) 0,8780	-0,0187 (31) 0,9206	-0,0185 (31) 0,9214	0,0495 (31) 0,7914
Fg	-0,3025 (31) 0,0982	-0,2654 (31) 0,1490	0,2827 (31) 0,1233	0,2427 (31) 0,1884	-0,2957 (31) 0,1063
FUS	0,2474 (31) 0,1796	0,2524 (31) 0,1707	-0,2901 (31) 0,1134	-0,3664 (31) 0,0426	0,2418 (31) 0,1900
Gm1		0,9686 (31) 0,0000	-0,8876 (31) 0,0000	-0,8783 (31) 0,0000	0,9668 (31) 0,0000
Gm2	0,9686 (31) 0,0000		-0,8923 (31) 0,0000	-0,8782 (31) 0,0000	0,9793 (31) 0,0000
Inc_Int_ar	-0,8876 (31) 0,0000	-0,8923 (31) 0,0000		0,9618 (31) 0,0000	-0,9188 (31) 0,0000
Inc_GM_arc	-0,8783 (31) 0,0000	-0,8782 (31) 0,0000	0,9618 (31) 0,0000		-0,8803 (31) 0,0000
Incl	0,9668 (31) 0,0000	0,9793 (31) 0,0000	-0,9188 (31) 0,0000	-0,8803 (31) 0,0000	
Inc2	0,8964 (31) 0,0000	0,9372 (31) 0,0000	-0,8759 (31) 0,0000	-0,8564 (31) 0,0000	0,9362 (31) 0,0000
ResaTha	-0,9469 (31) 0,0000	-0,9722 (31) 0,0000	0,8793 (31) 0,0000	0,8731 (31) 0,0000	-0,9596 (31) 0,0000

Correlation
(Sample Size)
P-Value

	Inc2	ResaTha
DON_ppm	-0,0791 (31) 0,6724	0,1016 (31) 0,5864
DNA_ug_g_1	0,2331 (31) 0,2070	-0,1507 (31) 0,4185
DNA_ug_g_2	0,1360 (31) 0,4655	-0,0204 (31) 0,9132
Fg	-0,1525 (31) 0,4128	0,2537 (31) 0,1685
FUS	0,2200 (31) 0,2345	-0,3123 (31) 0,0872
Gm1	0,8964 (31) 0,0000	-0,9469 (31) 0,0000
Gm2	0,9372 (31) 0,0000	-0,9722 (31) 0,0000
Inc_Int_ar	-0,8759 (31) 0,0000	0,8793 (31) 0,0000
Inc_GM_arc	-0,8564 (31) 0,0000	0,8731 (31) 0,0000
Inc1	0,9362 (31) 0,0000	-0,9596 (31) 0,0000
Inc2		-0,9426 (31) 0,0000
ResaTha	-0,9426 (31) 0,0000	

Correlation
(Sample Size)
P-Value

The StatAdvisor

This table shows Pearson product moment correlations between each pair of variables. These correlation coefficients range between -1 and +1 and measure the strength of the linear relationship between the variables. Also shown in parentheses is the number of pairs of data values used to compute each coefficient. The third number in each location of the table is a P-value which tests the statistical significance of the estimated correlations. P-values below 0.05 indicate statistically significant non-zero correlations at the 95% confidence level. The following pairs of variables have P-values below 0.05:

DNA_ug_g_1 and DNA_ug_g_2
DNA_ug_g_1 and Fg
DNA_ug_g_2 and Fg
FUS and Inc_GM_arc
Gm1 and Gm2
Gm1 and Inc_Int_ar
Gm1 and Inc_GM_arc
Gm1 and Incl
Gm1 and Inc2
Gm1 and ResaTha
Gm2 and Inc_Int_ar
Gm2 and Inc_GM_arc
Gm2 and Incl
Gm2 and Inc2
Gm2 and ResaTha
Inc_Int_ar and Inc_GM_arc
Inc_Int_ar and Incl
Inc_Int_ar and Inc2
Inc_Int_ar and ResaTha
Inc_GM_arc and Incl
Inc_GM_arc and Inc2
Inc_GM_arc and ResaTha
Incl and Inc2
Incl and ResaTha
Inc2 and ResaTha

Correlazione lineare tra le variabili prese in esame nella prova del 2008.

FOTO PAPER III

A



B



C



D



E



F



