

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e  
Alimentari**

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 07/D1

Settore Scientifico disciplinare: AGR 12

**Caratterizzazione bio-molecolare e ruolo di  
specie di *Fusarium* associate alla Fusariosi  
della spiga su frumento duro**

Presentata da: BARBARA AMATO

**Coordinatore Dottorato**

Prof. Giovanni Dinelli

**Relatore**

Prof.ssa Annamaria Pisi

**Correlatore**

Dott. Antonio Prodi

**Esame finale anno 2015**

E' ben difficile in geografia,  
come in morale, capire il  
mondo senza uscire di casa  
propria. Voltaire

## Abbreviazioni

AcDON	acetyldeossinivalenolo
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ANOVA	Analisi di varianza
Ap Index	Indice di aggressività Petri-dish
AUDPC standard	Area under disease progress curve standard
AUHPC	Area under healthy progress curve
BEA	beauvericina
Clr	coleoptile length reduction
CTAB	hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide
Cv	cultivar
DAS	diacetossiscipernolo
DNA	Acido deossiribonucleico
DON	deossinivalenolo
ENs	enniatine
FAO	Food and Agriculture Organization
FB1	fumonisina 1
FB2	fumonisina 2
FDS	Fusariosi della spiga
FHB	Fusarium head blight
FusX	FusarenoneX
Gr	germination rate reduction
HR	Hypersensitive reaction
HT-2	15-Acetoxy-3alpha,4beta-dihydroxy-8alpha-[3-methylbutyryloxy]-12,13-epoxytrichothec-9-ene
JECFA	Joint Export Committee on Food Additives
MAS	monoacetossiscipernolo
MON	moniliformina
NEO	neosolaniolo
NIV	nivalenolo
OTA	ocratossina

PDA	potato dextrose agar
QLT	Quantitative trait loci
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSR	Simple sequence repeats
T-2	4beta,15-diacetoxy-3alpha,dihydroxy-8alpha-[3-methylbutyryl-oxy]-12,13-epoxytrichothecc-9-ene
WHO	World Health Organization
ZEA	zearalenone
ZOH	zearalenolo

### **Parole-chiave**

Frumento duro, FDS, *F. poae*, *F. culmorum*, aggressività, Petri-dish test, inoculazione artificiale, antesi, Real Time PCR, biomassa, micotossine.

## INDICE

CAPITOLO I.....	8
INTRODUZIONE GENERALE .....	8
LA COLTIVAZIONE DEL FRUMENTO DURO .....	9
LA FUSARIOSI DELLA SPIGA .....	10
GLI AGENTI PATOGENI.....	12
EPIDEMIOLOGIA E PROCESSO INFETTIVO .....	14
MICOTOSSINE .....	15
RESISTENZA ALLA FUSARIOSI DELLA SPIGA .....	18
CONTROLLO CHIMICO.....	20
CONTROLLO BIOLOGICO .....	21
FIGURE E TABELLE .....	23
BIBLIOGRAFIA .....	27
SCOPO DELLA RICERCA – OBIETTIVI.....	37
CAPITOLO II.....	39
VALUTAZIONE DELL’AGGRESSIVITA’ DI CEPPI DI <i>FUSARIUM POAE</i> : APPLICAZIONE DEL SAGGIO <i>IN VITRO</i> “PETRI-DISH TEST” SU FRUMENTO DURO.....	39
ABSTRACT .....	40
INTRODUZIONE .....	40
MATERIALI E METODI .....	42
Ceppi fungini <i>F. poae</i> .....	42
Produzione di conidi.....	43
Set-up del saggio <i>in vitro</i> Petri-dish test.....	43
Analisi statistica.....	45
RISULTATI .....	45
Aggressività dei ceppi di <i>F. poae</i> .....	45
DISCUSSIONE .....	46
FIGURE E TABELLE .....	50
BIBLIOGRAFIA .....	54
CAPITOLO III .....	58
VALUTAZIONE DELL’AGGRESSIVITA’ DI CEPPI DI <i>FUSARIUM CULMORUM</i> : APPLICAZIONE DEL SAGGIO <i>IN VITRO</i> “PETRI-DISH TEST” SU FRUMENTO DURO.....	58
ABSTRACT .....	59
INTRODUZIONE .....	59
MATERIALI E METODI .....	62

Ceppi fungini di <i>F. culmorum</i> .....	62
Produzione di conidi .....	63
Set-up del saggio <i>in vitro</i> Petri-dish test.....	63
Analisi statistica.....	65
RISULTATI .....	65
Aggressività dei ceppi di <i>F. culmorum</i> .....	65
DISCUSSIONE .....	66
FIGURE E TABELLE .....	69
BIBLIOGRAFIA .....	74
CAPITOLO IV .....	79
VALUTAZIONE DELLA PATOGENICITA' DI CEPPI DI <i>FUSARIUM POAE</i> ATTRAVERSO INOCULAZIONE ARTIFICIALE IN SERRA DI PIANTE DI FRUMENTO DURO E QUANTIFICAZIONE DELLA BIOMASSA TRAMITE REAL TIME PCR.....	79
ABSTRACT .....	80
INTRODUZIONE .....	81
MATERIALI E METODI .....	82
Ceppi fungini <i>F. poae</i> .....	82
Produzione di conidi .....	82
Processo di inoculazione in serra.....	83
Estrazione del DNA di <i>Fusarium poae</i> con metodo CTAB.....	84
Sviluppo di un protocollo di Real Time PCR per <i>Fusarium poae</i> .....	85
Quantificazione della biomassa di <i>Fusarium poae</i> attraverso la Real Time PCR con SYBR® Green I.....	87
Analisi statistica.....	88
RISULTATI .....	88
Rilievi e sintomi su spighe di frumento duro: inoculazione pre – antesi e antesi ..	88
Biomassa <i>F. poae</i> .....	89
Correlazioni statistiche: .....	90
Biomassa – sintomi e biomassa – concentrazione.....	90
DISCUSSIONE .....	91
FIGURE E TABELLE .....	94
BIBLIOGRAFIA .....	104
DISCUSSIONE GENERALE .....	109
BIBLIOGRAFIA .....	115
APPENDICE .....	121
ABSTRACT .....	122
INTRODUCTION .....	123

2. MATERIALS AND METHODS .....	124
2.1 Experimental design .....	124
2.2 Mycological analysis and species identification .....	125
2.3 DNA extraction from wheat flour and real-time PCR analysis.....	125
2.4 Mycotoxin analysis.....	126
3. RESULTS .....	127
3.3 Fungal colonization and mycotoxin content of kernels.....	127
DISCUSSION.....	131
ACKNOWLEDGMENTS .....	134
REFERENCES .....	134

## **CAPITOLO I**

### **INTRODUZIONE GENERALE**

## LA COLTIVAZIONE DEL FRUMENTO DURO

Il frumento (*Triticum* spp.) è un cereale della famiglia delle *Graminaceae* (o *Poaceae*), tribù *Triticeae*, genere *Triticum*. Le specie più importanti sono il frumento duro (*T. durum* Defs. o *T. turgidum* L. sub-specie *durum*) e il frumento tenero (*T. aestivum* L.). Il primo è una specie tetraploide ( $2n = 28$ , genomi AABB), mentre il secondo è esaploide ( $2n = 42$ , genomi AABBDD). Il frumento duro si differenzia dal tenero per i caratteri morfologici relativi a spiga e cariosside: la spiga, vista in sezione, è compressa lateralmente con reste lunghe e spesso pigmentate; la cariosside è più grossa e ha una struttura vitrea e consistente.

I cereali sono uno dei principali alimenti sia per l'uomo che per gli animali, e costituiscono circa i 2/3 del fabbisogno totale, grazie al contenuto in proteine, zuccheri, lipidi e in minori quantità, sali minerali e vitamine.

L'optimum di temperatura per la coltivazione del frumento è intorno 25°C, con adeguato livello di umidità durante la stagione di crescita, tuttavia precipitazioni troppo frequenti portano a riduzioni nel raccolto dovuti a malattie e marciumi. La raccolta nelle zone temperate avviene tra aprile e settembre nell'emisfero Nord e tra ottobre e gennaio nell'emisfero Sud.

Il successo della coltivazione del frumento è dovuto alla grande adattabilità agronomica in diversi ambienti, alla facilità di stoccaggio e trasporto, ma soprattutto alla trasformazione in farine per produrre alimenti che rappresentano i principali componenti di tutte le diete (Morris *et al.*, 2011). Dalla macinazione delle cariossidi di frumento duro si ottiene la semola, una farina granulosa, utilizzata principalmente per la produzione di pasta, mentre dalla macinazione di cariossidi di frumento tenero si ottiene una farina con granuli molto sottili, per la produzione di pane e prodotti lievitati.

I frumenti teneri comprendono il maggior numero di varietà, hanno la massima estensione colturale e sono prevalentemente coltivati nei paesi nordici. I grani duri, invece, sono tipici dei paesi meridionali. I principali Paesi produttori di frumento sono riportati nella tabella 1.1, dove è messa in evidenza la produzione stimata per l'anno 2013 (dati Eurostat). L'Italia è un gran produttore di frumento, e questo è dovuto anche al clima, favorevole a questa coltura. Il grafico 1.1 mostra la produzione di frumento suddiviso nelle tre grandi aree italiane: Nord, Centro e Sud. La tabella 1.2 riporta come la coltivazione di frumento duro è ripartita nelle province della regione Emilia Romagna.

Dalle cariossidi si ricavano anche amido, alimenti soffiati per dietetica e, previa fermentazione, alcool. Con le moderne tecniche di macinazione, dalla cariosside del frumento si separa il germe, da cui si può ricavare un olio (detto olio di frumento) di colore giallo-bruno, soggetto ad irrancidirsi facilmente ed è impiegato soprattutto nella produzione dei saponi.

La filiera produttiva è ampia, partendo dall'agricoltore, industrie sementiere, centri di stoccaggio, industrie di prima e seconda trasformazione, fino ad arrivare al consumatore.

All'interno della filiera è importante il miglioramento dello standard qualitativo del frumento, allo scopo di garantire un adeguato livello dell'offerta nazionale e remuneratività della coltura, ridurre l'importazione per le partite di qualità superiore e tutelare quindi le caratteristiche dei prodotti agroalimentari che caratterizzano il "made in Italy".

La coltivazione del frumento può essere danneggiata da parassiti i cui agenti patogeni possono già essere presenti nelle sementi influenzando la produzione sia quantitativamente che qualitativamente. Una delle fitopatie che danneggia maggiormente la coltivazione del frumento è la fusariosi della spiga, che ha come agente causale specie fungine appartenenti al genere *Fusarium*, di cui tratteremo ampiamente nei prossimi paragrafi.

## **LA FUSARIOSI DELLA SPIGA**

La fusariosi della spiga (FDS), nota a livello mondiale come *Fusarium Head Blight* (FHB) è una delle più importanti fitopatie dei cereali; colpisce *Poaceae* coltivate e spontanee, principalmente frumento duro e tenero, orzo, segale, avena, triticale, mais, riso ed è diffusa negli areali temperati e semitropicali di coltivazione di questi cereali (Europa, Asia, Sud Africa, Sud America, Stati Uniti, Canada e Australia).

La malattia comparve per la prima volta in Inghilterra nel 1884, e fu individuata da Smith, che attribuì la causa al fungo *Fusarium culmorum*. Successivamente le segnalazioni di FDS si sono susseguite a livello globale, tanto che, nell'ultimo decennio del XX secolo, la malattia è divenuta il principale fattore limitante la coltivazione del frumento in molte parti del mondo (Stack, 1999; Dubin *et al.*, 1997). Già dagli anni '20 casi di FDS causata dal fungo *Fusarium graminearum* (Schwabe) su frumento erano stati segnalati in America (Jonson *et al.*, 1920; Atanasoff, 1920; MacInnes e Fogelmann, 1923; Koehlr *et al.*, 1924); successivamente anche in Inghilterra, Russia, Svezia,

Francia, Germania, Australia, Brasile, Olanda, Norvegia, Giappone e Canada (Parry *et al.*, 1995).

Anche in Italia non sono mancati casi di FDS, infatti nel 1900 Peglion segnalò la malattia, ma è dal 1995 che si è diffusa ampiamente nel centro-nord della nostra 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 della malattia variano in base all'andamento climatico, agli areali di coltivazione, alle varietà coltivate, con perdite di produzione stimate dal 30% al 70% (Parry *et al.*, 1995; Stack, 2000; Haidukowski *et al.*, 2005).

Tutti i fattori, che comprendono la tecnica agronomica, la scelta e l'impiego di varietà a bassa suscettibilità alla malattia, la difesa fitosanitaria, interagiscono tra loro e contribuiscono ad aumentare la complessità del sistema, e il clima, principale fattore di rischio quando favorevole allo sviluppo dei patogeni, assume di fatto una valenza superiore ai fattori di rischio agronomici (Campagna *et al.*, 2005).

Infatti, elevati valori di umidità relativa e frequente bagnatura della superficie della spiga rappresentano le condizioni ideali per la crescita dei funghi patogeni.

I primi sintomi di FDS sono ben evidenti su spighe immature e si manifestano come un disseccamento localizzato su poche spighe. Se le condizioni ambientali sono favorevoli alla crescita del fungo, l'infezione si può estendere e può portare al parziale o totale disseccamento della spigetta; a questo livello si parla di imbianchimento, da cui prende il nome la malattia (Fusarium Head Blight) (Figure 1.1 e 1.2).

Sintomi più gravi portano alla formazione di zone brunastre del rachide e alla comparsa tra le spighe di masse gelatinose colorate dal salmone all'arancio chiamate sporodochi, localizzate in corrispondenza delle glume e rappresentano le fruttificazioni agamiche del fungo. Gli sporodochi consistono di masse conidiche portate da conidiofori sviluppatasi da un intreccio compatto di ife (Figura 1.3).

Le cariossidi prodotte da spighe infette appaiono striminzite, grigiastre o rossastre, di frattura farinosa (Figura 1.4), ma se l'infezione è tardiva, possono avere un aspetto simile a quelle sane anche se contaminate dal fungo (Meriggi e Pradolesi, 2006).

La sintomatologia aspecifica che deriva dall'infezione si associa ad alcuni prodotti detti metaboliti secondari, o meglio micotossine, chiamati così perché secreti dopo il periodo di moltiplicazione e di crescita cellulare, che costituiscono contaminanti pericolosi per la salute dell'uomo e degli animali (Vesonder *et al.*, 1973; Joffe, 1978; D'Mello *et al.*, 1999).

I danni provocati dalla FDS sono di tipo quali-quantitativo: riduzione della qualità, dovuta a modificazioni come distruzione della parete cellulare, alterazione della frazione lipidica e riduzione di quella proteica, diminuzione della germinabilità e quantità delle sementi. Le cariossidi che appaiono imbianchite, sottoposte ad analisi molecolari mostrano contaminazione da micotossine; tutto ciò comporta una riduzione della resa, con conseguente perdita economica, difficoltà nel commercio, esportazione e marketing (Gowsami e Kistler, 2004).

## GLI AGENTI PATOGENI

I miceti a cui si attribuisce la FDS appartengono al genere *Fusarium*: - *F. graminearum* Schwabe [teleomorfo *Gibberella zae* Schwein (Petch)], *F. culmorum* (W.J.Smith) Sacc., *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. [teleomorfo *Gibberella avenacea* R.J.Cook] - e al genere *Microdochium*: *M. nivale* var. *nivale* e var. *majus*.

Esistono altre specie di *Fusarium* ritrovate sulle spighe e sulle cariossidi di frumento duro, ma isolate con minor frequenza: *F. cerealis* o *F. croockwellense* Burgess, Nelson e Toussou, *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. sporotrichioides* Sherb., *F. acuminatum* Ellis e Everhart, *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sin. *F. moniliforme*, Sheldon), *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, *F. semitectum* Berkley e Ravenel. Queste specie al momento sono considerate di minor importanza eziologica (Nicholson *et al.*, 2003), tuttavia recentemente diversi autori hanno riportato il ritrovamento occasionale di specie quali *F. verticillioides* e *F. proliferatum* anche su frumento duro, nonostante siano agenti patogeni che infestano prevalentemente colture di mais (Shepard *et al.*, 2005; Desjardins *et al.*, 2007; Palacios *et al.*, 2011; Amato *et al.*, 2015 paper under review, (vedi Appendice)).

Ciascuna specie può coesistere insieme ad un'altra sulla stessa spiga, oppure la colonizzazione può avvenire in successione (Campagna *et al.*, 2005).

I principali patogeni della FDS, ritrovati in tutto il mondo, sono *F. graminearum* e *F. culmorum* (Sturz e Johnston, 1983). Ogni micete predilige determinate condizioni biologiche e ambientali che, in parte, spiegano la diversa distribuzione (Osborne e Stein, 2007). *F. graminearum* predilige zone umide e clima caldo-temperato, come buona parte del Nord America (Goswami e Kistler, 2004), Cina ed emisfero australe, si sviluppa a temperature comprese tra i 20°C - 30°C (Parry *et al.*, 1995), e quest'ultimo valore rappresenta la temperatura massima di accrescimento. La produzione e lo

sviluppo delle ascospore, rilasciate dal peritecio, che rappresentano la principale fonte di inoculo della malattia, sono influenzate dall'umidità e da temperature che oscillano da 13°C a 33°C con un optimum intorno ai 25-28°C (Sutton, 1982). *F. culmorum* predilige regioni più fredde come Inghilterra, Europa del Nord e Canada (Desjardin, 2006). L'optimum di temperatura di crescita varia dai 15°C ai 20°C (Parry *et al.*, 1994; Pettitt *et al.*, 1996).

Per entrambe le specie si possono distinguere due principali chemiotipi, che rappresentano i diversi profili metabolici delle micotossine (tricoteceni) prodotte. Il primo chemiotipo corrisponde ai ceppi fungini che posseggono il gene deputato alla sintesi di deossinivalenolo (DON) e il secondo ai ceppi che sintetizzano nivalenolo (NIV). Il chemiotipo DON può essere ulteriormente diviso in base alla forma monoacetilata di DON prodotta, in produttori di 3-acetilDON (3-ADON) e produttori di 15-acetilDON (15-ADON) (Miller *et al.*, 1991). Ad oggi le popolazioni di *F. culmorum* includono solo i chemiotipi DON + 3ADON e NIV (Covarelli *et al.*, 2014).

Questi differenti chemiotipi (NIV, DON, 3-ADON, 15-ADON) sembrano avere una diversa patogenicità e aggressività nei confronti delle piante, oltre che tossicità verso le cellule animali.

Brennan *et al.* (2007) identificarono un isolato di *F. poae* che mostrava la stessa aggressività di *F. graminearum* e di *F. culmorum* nei confronti dell'infezione di diverse cultivar di grano.

Ad oggi viene sottolineata l'importanza anche di *F. poae* come responsabile della fitopatìa FDS, poichè sta assumendo un ruolo sempre più importante in Argentina, Canada, Finlandia, Germania, Svizzera, Ungheria, Slovacchia, Italia, Irlanda e Regno Unito (Vogelgsang *et al.*, 2008; Stenglein, 2009). In Italia, questa situazione è confermata da uno studio dettagliato effettuato in Emilia Romagna in cui si riporta un aumento della frequenza d'isolamento dalle cariossidi passata dal 9% del 1998 al 23% del 2007 (Pancaldi *et al.*, 2010).

*F. poae* è isolato nelle glume, dove causa tipiche lesioni necrotiche (Doohan *et al.*, 1998) (Figura 1.5). Si isola di frequente nelle zone a clima temperato e richiede temperature più basse rispetto a *F. graminearum* e *F. culmorum* (Stenglein, 2009). Secondo Sturz e Johnston (1983) le spighe vengono colonizzate inizialmente da *F. poae* e ciò favorirebbe la successiva colonizzazione di altre specie di *Fusarium*.

Il riconoscimento delle specie appartenenti al genere *Fusarium* è reso possibile dalle caratteristiche morfologiche proprie di ciascuna specie, sia a livello macroscopico -

colorazione della colonia su terreno PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, USA), sviluppo e tipologia del micelio - che microscopico - presenza/assenza e morfologia di macroconidi/microconidi, cellula basale, apicale, numero di setti, clamidospore - secondo le chiavi analitiche di Leslie e Summerell (2006).

Le fonti di inoculo primario per la malattia provengono dai residui di piante infette sulle quali il fungo può svernare come micelio saprofitico (Sutton, 1982), come clamidospore, che ben resistono nei residui colturali in condizioni avverse (Griffiths, 1974), oppure può formare periteci con ascospore in grado di rimanere vitali fino a due anni (Pereyra *et al.*, 2004). Le ascospore rilasciate dai residui superficiali di terreno sono considerate come una delle prime fonti di inoculo per l'epidemia (Bai e Shaner, 1994). Altre fonti di inoculo sono costituite dai conidi (spore agamiche).

Mancanza di rotazioni o successioni colturali tra mais e frumento spesso sono associate a consistenti epidemie di FDS rispetto a successioni con altre colture cerealicole (Shaner 2003), poichè il mais ospita gli stessi agenti patogeni del frumento.

In primavera, le condizioni climatiche e ambientali (clima mite e un buon grado di umidità) sono favorevoli per lo sviluppo dei conidi e dei periteci, ovvero i produttori delle ascospore (Doohan *et al.*, 2003; Trail *et al.*, 2002), insieme allo stadio di fioritura delle colture di cereali.

La produzione dell'inoculo di *Fusarium* è favorita da fattori climatici-chiave: temperatura, disponibilità d'acqua, aria e luce. Sutton (1982) ha dimostrato che l'inoculo dipende da condizioni climatiche temperate, piuttosto che fredde; in caso di riproduzione sessuale le temperature ottimali di produzione di periteci e ascospore per *Giberella zea* sono di 29°C e 25-28°C, rispettivamente, accompagnate da un aumento dell'umidità relativa (Doohan *et al.*, 2003). Tuttavia Gilbert e Tekauz (2000) asserirono che esiste una soglia di umidità oltre la quale il rilascio delle ascospore viene rallentato o bloccato.

La dispersione dei propaguli avviene tramite vento, piogge ("rain-splash"), o grazie all'azione combinata di entrambi, oppure tramite insetti che trasportano l'inoculo sulle spighe, sopra o dentro le infiorescenze, dove germinano e iniziano quindi l'infezione (Bai e Shaner, 2004).

## **EPIDEMIOLOGIA E PROCESSO INFETTIVO**

Esistono tre principali elementi che controllano il rapporto tra ospite (frumento) e patogeno (*Fusarium* spp.): il genoma di entrambi, l'interazione reciproca e l'ambiente.

Quest'ultimo influenza sia la crescita che la riproduzione del patogeno e può favorire la colonizzazione nell'ospite; tuttavia sembra che il genoma della pianta e del patogeno siano determinanti per l'infezione. Quindi è molto importante considerare l'interazione ospite - patogeno a livello cellulare e molecolare per poter comprendere i processi coinvolti nello sviluppo della malattia (Stenglein, 2009).

Com'è stato detto, il principale patogeno della FDS è *F. graminearum*; tuttavia anche *F. poae* è in grado di produrre spore asessuali che vengono disperse dal vento e possono causare la malattia.

L'aumento di infezione nello stadio di antesi del frumento è ben documentato da molti lavori (Pugh *et al.*, 1933; Andersen, 1948; Strange e Smith, 1971), in cui si afferma che l'antesi rappresenta lo stadio di crescita più suscettibile all'infezione di *Fusarium*. Ciò ha fatto supporre che le antere debbano contenere sostanze in grado di stimolare la crescita delle ife fungine; nel 1978 Strange e Smith dimostrarono la presenza di sostanze quali betaina e colina che stimolano lo sviluppo delle ife.

Dal momento che il periodo di vulnerabilità della pianta è breve, il fungo patogeno si limita ad un solo ciclo di infezione per stagione (Bai e Shaner, 1994).

L'inizio del processo di infezione avviene a seguito della deposizione delle spore sopra o all'interno dei tessuti delle spighe. Il fungo non penetra direttamente nell'epidermide, ma le ife si sviluppano dapprima sulla superficie esterna dei fiori e delle glume, permettendo al fungo di crescere attraverso gli stomi e altre zone suscettibili dell'infiorescenza. Successivamente le ife penetrano nelle aperture tra lemma e palea su spighette deiscenti dove i tessuti sono più sottili (Bushnell *et al.*, 2003). Il micelio si diffonde quindi nell'infiorescenza tramite i tessuti conduttori del rachide, invadendola e causando i sintomi tipici della FDS. La formazione della cariosside può essere parzialmente o totalmente compromessa (Meriggi e Pradolesì, 2006).

Il successo dell'infezione dipende da fattori tra cui clima temperato, umidità (Xu, 2003), suscettibilità della cultivar (Wagacha e Muthomi, 2007) ed eccessiva concimazione con azoto (Doohan *et al.*, 2003). L'abbondanza di fonti di inoculo primario e le condizioni climatiche, principalmente temperatura e umidità durante lo stadio di antesi, concorrono a determinare la gravità di malattia della FDS (Bai e Shaner, 2004).

## **MICOTOSSINE**

Le micotossine sono prodotti del metabolismo secondario di cinque principali generi di

funghi: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium* e *Penicillium*.

La prima forma di micotossicosi, sindromi tossiche derivate dall'esposizione alle micotossine, fu ufficialmente riconosciuta nel 1800; si trattò dell'ergotismo, una patologia caratterizzata da necrosi degli arti e causata dall'ingestione di segale contaminata da *Claviceps purpurea*.

Le micotossine possono svilupparsi su numerose derrate alimentari, in particolari condizioni ambientali, e sono tossiche per l'uomo e per gli animali. Vengono secrete dopo il periodo di moltiplicazione e di crescita cellulare, per tale motivo sono chiamate anche "metaboliti secondari", in contrapposizione ai "metaboliti primari", che si formano durante le fasi di sviluppo e sono componenti essenziali del micete. Vengono elaborate dal fungo verso la fine del ciclo vitale di sviluppo, quando si ha un accumulo di grosse quantità di metaboliti non più necessari alla crescita. Sono molecole molto stabili dal punto di vista chimico - fisico, non vengono distrutte dal calore e sono difficilmente degradabili con i tradizionali sistemi di lavorazione e cottura degli sfarinati. Inoltre, persistono anche dopo la morte del fungo produttore; sono secrete in basse quantità, ma la loro tossicità è comunque elevata.

I cereali costituiscono una delle specie vegetali maggiormente esposte alla contaminazione da micotossine.

I funghi tossigeni sono dotati di capacità parassitaria e saprofitaria; in condizioni favorevoli possono quindi svilupparsi sia sulle piante prima del raccolto, che nelle derrate vegetali dopo il raccolto e durante i processi di conservazione e trasformazione (Poggiolini e Baccarini, 2006).

Nell'ambito della stessa specie i funghi possono produrre diverse micotossine e una stessa micotossina può essere prodotta da funghi di genere e specie differenti. In più, nell'ambito delle specie potenzialmente tossigene, solo ceppi specifici le producono (Poggiolini e Baccarini, 2006).

Le micotossine rappresentano un punto chiave del processo di infezione, poichè sono coinvolte nel meccanismo di inibizione della risposta di resistenza della pianta (Maier *et al.*, 2006); la loro presenza dipende da molteplici fattori, tra cui il ceppo fungino, le condizioni climatiche di crescita, le tecniche di coltivazione e il livello di suscettibilità della pianta - ospite (Pancaldi *et al.*, 2010).

Le tossine maggiormente diffuse si suddividono in:

- Alcaloidi: prodotti da *Claviceps purpurea*: gli effetti biologici degli alcaloidi causano una vaso-costrizione che provoca sindrome cancrenosa, inoltre agiscono

sul sistema nervoso centrale con riduzione dell'attività dei centri vasomotori e aumento di quelli ipotalamici.

- Aflatossine: prodotte da 3 specie di *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e la più rara *A. nomius*, che contaminano direttamente alimenti vegetali e, indirettamente, le derrate di origine animale. Gli alimenti particolarmente esposti alla contaminazione sono granelle di cereali come il mais, alimenti ad alto tenore lipidico, spezie, frutta secca. Gli effetti riscontrati sono di tipo: cancerogeno, epatotossico, immunosoppressore e genotossico.
- Ocratossine: prodotte da *Aspergillus*, *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius* e *Penicillium*, *P. verrucosum*. La tossina (OTA) può essere presente in diversi prodotti vegetali come cereali, caffè, arachidi, frutta secca, spezie, uva, formaggi, etc. Gli effetti causati sono di tipo neurotossico, teratogeno, immunosoppressore e cancerogeno.
- Patulina: prodotta dal fungo *Penicillium claviforme*. La patulina è stata rinvenuta in numerosi alimenti tra cui le mele. E' dotata di proprietà antibiotiche e ha effetto citotossico e immunosoppressore.
- *Alternaria*-tossine comprendono: alternariolo (AOH), alternariolo monometil estere (AME), acido tenuazoico (TeA) e altertossine (ATX), contaminanti occasionali dei derivati del pomodoro, e provocano negli animali effetti dannosi tra cui effetti fetotossici e teratogeni.
- *Fusarium*-tossine comprendono: Tricoteceni, Zearalenoni e Fumonisine; sono prodotte dal genere *Fusarium*, sono contaminanti di cereali tra cui frumento tenero, duro e mais.

Tra le *Fusarium*-tossine, quelle che si trovano con maggior frequenza nel grano sono: deossinivalenolo (DON), nivalenolo (NIV), zearalenone (ZEA) prodotte da *F. graminearum* e *F. culmorum*; T-2 e HT-2 prodotte da *F. poae* e *F. sporotrichioides*.

Nella tabella 1.3 sono riportate in maniera più dettagliata le specie di *Fusarium* e le rispettive micotossine prodotte.

La contaminazione da micotossine negli alimenti e nei mangimi è riconosciuta, sia in ambito scientifico che legislativo, come prioritaria in termini di sicurezza alimentare. Ai fini della tutela della salute pubblica, il tenore dei contaminanti negli alimenti è mantenuto a livelli tollerabili sul piano tossicologico dai limiti massimi che vengono definiti dalla Commissione Europea.

La Commissione Europea ha emanato due regolamenti relativi al campionamento delle micotossine negli alimenti e nei mangimi: il regolamento CE n. 401/2006 della Commissione del 23 Febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari e il regolamento CE n. 152/2009 della Commissione del 27 Gennaio 2009 che fissa i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti, regolamento che riprende integralmente il DM del 20 Aprile 1978. Le disposizioni generali di entrambi i regolamenti prevedono l'applicazione delle procedure in conformità con le disposizioni del regolamento 882/2004 sul controllo ufficiale.

Per quanto riguarda il frumento, la micotossina che viene rilevata con maggior frequenza è il deossinivalenolo (DON) (Lops *et al.*, 1998; Campagna *et al.*, 2005); questo è confermato anche da indagini condotte su migliaia di campioni di frumento a livello mondiale con la Commissione congiunta di esperti di additivi alimentari (JECFA – Joint Export Committee on Food Additives), dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO – World Health Organization) e della FAO (Food and Agriculture Organization). E' risultato infatti che su 11444 campioni il 57% risultava positivo alla micotossina DON con una concentrazione tra 1-5700 µg/Kg.

La tossina appartiene al gruppo B dei tricoteceni, è in grado di inibire la sintesi proteica nelle cellule eucariotiche e causare effetti di tipo neuro ed immunotossico (Benett e Klich, 2003).

I tenori massimi di *Fusarium*-tossine sono stabiliti dal regolamento CE n. 1881/2006 della Commissione del 19 Dicembre 2006 ed entrato in vigore il 9 Gennaio 2007, e dal successivo atto modificatore ovvero il regolamento CE n. 1126/2007 della Commissione del 28 Settembre 2007, entrato in vigore il 30 Settembre 2007.

Recentemente sono stati emanati provvedimenti per la regolamentazione delle micotossine T-2 e HT-2 (2013/165/EU del 27 Marzo 2013), che fino ad allora non erano state prese in considerazione per mancanza di dati, ma che sono considerate altrettanto pericolose al pari delle altre micotossine già sottoposte a normativa.

## **RESISTENZA ALLA FUSARIOSI DELLA SPIGA**

Tutti gli organismi vegetali, non essendo capaci di macro-movimenti, si adattano all'ambiente in cui vivono per crescere e riprodursi, sono in grado di percepire stimoli esterni ed elaborare segnali di risposta che si traducono in modificazioni fisiologiche, volte alla loro sopravvivenza.

Quando un patogeno attacca un organismo ospite vegetale la resistenza si manifesta attraverso sintomi che riflettono l'incapacità del patogeno a crescere, per cui questo tipo di risposta è detta ipersensibile (HR, hypersensitive reaction) e la presenza del patogeno si evidenzia con la comparsa di zone necrotiche sui tessuti dell'ospite.

La resistenza alla fusariosi della spiga è molto complessa (Mesterhazy, 2002), alcuni ricercatori hanno proposto diversi tipi di resistenza: tipo I, resistenza all'infezione iniziale (Schroeder e Christensen, 1963); tipo II, resistenza alla diffusione dei sintomi di imbianchimento nella spiga (Schroeder e Christensen, 1963); tipo III, resistenza all'infezione delle sementi (Mesterhazy, 1995 e 1999); tipo IV, tolleranza all'infezione (Mesterhazy, 1995 e 1999) e tipo V, resistenza all'accumulo della micotossina DON (Miller *et al.*, 1985). Per distinguere le prime due tipologie di resistenza sono stati sviluppati due approcci di inoculazione: il tipo I è valutato spruzzando una sospensione conidica su spighe in fioritura e contando successivamente le spighe infette; il tipo II con un tipo di inoculazione ad iniezione tra le singole infiorescenze della spiga e contando le spighe imbianchite (Bai e Shaner, 2004). La gravità di malattia spesso non dipende da infezioni secondarie, ma piuttosto dall'invasione del patogeno all'interno dei tessuti vegetali a seguito di inoculazione o per spruzzo o per iniezione diretta (Bai e Shaner, 1994; Dill-Macky, 2003; Mesterhazy, 2003). Generalmente entrambe le procedure di inoculazione descritte vengono svolte in serra, dove si possono controllare tutte le variabili associate all'infezione, a differenza dell'analisi di campo, dove se le condizioni ambientali sono favorevoli all'infezione, non è possibile distinguere i due tipi di resistenza (Bai e Shaner, 2004).

La resistenza di tipo III può essere misurata come la percentuale di semi infetti, però se sono presenti anche la resistenza di tipo I o II, queste possono contribuire a ridurre tale percentuale, pertanto bisogna fare attenzione quando si vuole valutare il contributo della resistenza all'infezione delle sementi (Shaner, 2002).

Il frumento duro sembra essere 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.

Tutti i meccanismi di resistenza dipendono dall'azione coordinata di più geni, che consentono una riduzione della gravità di malattia. Studi molecolari con marcatori molecolari quali RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple sequence repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 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) per mappare i geni deputati alla resistenza della FDS.

## **CONTROLLO CHIMICO**

Una delle strategie di lotta alla fusariosi della spiga è l'uso di prodotti fitosanitari della categoria dei fungicidi per ridurre il potenziale di inoculo. I principi attivi dei fungicidi impiegati nella lotta alla FDS appartengono alla classe dei triazoli: tebuconazolo, epossiconazolo, bromuconazolo, e imidazoli: prochloraz.

Queste molecole hanno caratteristiche molto simili come la struttura e il meccanismo di azione; interferiscono sul metabolismo dei lipidi inibendo la sintesi degli steroli, componenti fondamentali della membrana cellulare, e alterandone la 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 un'azione completa, preventiva, curativa ed eradicante.

I triazoli sono tra i fungicidi più efficaci per ridurre livelli di DON e NIV (Ioos *et al.*, 2005); spesso però le complesse relazioni tra fungicidi, sviluppo della malattia, composizione dell'inoculo e accumulo di micotossine, rende difficoltosa la valutazione dell'efficacia del trattamento. Uno studio condotto da Simpson *et al.* (2001) ha dimostrato che l'applicazione dei fungicidi per ridurre il rischio di FDS comporta diversi esiti sul controllo dei funghi patogeni. In questo lavoro l'efficacia del trattamento con fungicidi è stata valutata tramite tecniche molecolari di PCR quantitativa e quantificazione di DON; in particolare, trattamenti con tebuconazolo, prochloraz e fluquinconazolo hanno portato sia alla riduzione dei sintomi che di DON, mentre trattamenti con azoxystrobina hanno generato un aumento dei livelli di DON. Queste sostanze sono in grado di agire sia contro le specie tossigene (*Fusarium*) che, contro quelle non tossigene (*Microdochium*).

In uno studio condotto da Edwards e Godley (2010) su avena per saggiare l'efficacia del fungicida a base di prothioconazolo applicato in diversi tempi, è emerso che il prodotto era efficace solo quando le condizioni ambientali erano prevalentemente secche; infatti

piogge abbondanti favoriscono il cosiddetto “rain splash” dell’inoculo e quindi la dispersione delle spore di *Fusarium* che possono mascherare l’azione del fungicida.

L’uso dei fungicidi non è ritenuto, ad oggi, dalla comunità scientifica il mezzo più efficace contro la FDS, poiché sebbene possa ridurre le perdite di raccolto e produzione di frumento, potrebbe non diminuire l’accumulo di micotossine in maniera significativa. I costi dei trattamenti, la tempistica di applicazione, la mancanza di studi che affermano un fungicida come altamente efficace, sono fattori che limitano l’uso del controllo chimico contro FDS (Bai e Shaner, 2004).

In condizioni artificiali l’uso di fungicidi nel controllo della FDS 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); mentre l’efficienza del controllo in condizioni naturali di infezione risulta inferiore al 70% su frumento (Stack, 1999). Lehoczki-Krsjak *et al.* (2010) sostengono che la combinazione di cultivar resistenti e applicazione di fungicidi può favorire la riduzione dei livelli di DON; anche Paul *et al.* (2006) affermano che l’uso di fungicidi deve essere inserito in un programma di gestione delle pratiche agronomiche (aratura, rotazione delle colture) insieme con l’uso di cultivar resistenti.

Infine, l’uso dei fungicidi pone un serio problema in termini di sicurezza alimentare a causa dei possibili residui che questi composti possono lasciare sulla granella (Jones, 2000).

Gli interventi chimici devono quindi rientrare in una strategia di lotta integrata.

## **CONTROLLO BIOLOGICO**

Strategie di controllo biologico di FDS sono di rilevante importanza in quanto sono legate alla fase di fioritura, che rappresenta una finestra temporale molto stretta di suscettibilità delle piante (Xu e Nicholason, 2009).

Sono stati proposti diversi funghi e batteri antagonisti a *Fusarium* tra cui: *Sporobolomyces roseus* e *Paenibacillus macerans* che si trovano sulla spiga durante le prime fasi di fioritura e riducono lo sviluppo della fusariosi causata da *F. graminearum*; *Microsphaeropsis* spp. o *Trichoderma harzianum* su residui colturali infetti di mais o di frumento riducono lo sviluppo di *F. graminearum*, diminuendo la produzione di periteci e conseguente rilascio di ascospore (Luz *et al.*, 2003); isolati di *Clonostachys rosea* sono 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 mais (Luongo *et al.*, 2005) e ceppi di *Pseudomonas fluorescens* inibiscono la crescita di *F. culmorum* sia *in vivo* che *in vitro* (Kurek *et al.*, 2003). Jochum *et al.* (2006) ipotizzano che l'azione di *Lysobacter enzymogenes* ceppo C3 possa ridurre la diffusione delle specie di *Fusarium* e aumentare la resistenza locale dell'ospite; Binder (2007) riporta che specie appartenenti al genere *Eubacterium* possono trasformare chimicamente il gruppo epossido dei tricoteceni in un diene, eliminando parte della tossicità del DON.

Diversi autori hanno improntato la loro ricerca sullo studio di agenti di lotta biologica per contrastare lo sviluppo di *F. graminearum* e la produzione di DON. He *et al.* (2009) hanno dimostrato che, in condizioni ambientali controllate, *Paenobacillus polymyxa* è un potenziale agente di lotta biologica contro lo sviluppo di *F. graminearum* e colonizzando le spighe di frumento, per la riduzione della produzione di DON; Shi *et al.* (2014) hanno utilizzato invece *Bacillus amyloliquefaciens* dimostrando la sua capacità nell'inibire la crescita di *F. graminearum* e ridurre la produzione di DON.

Studi sul controllo biologico per ridurre la FDS e i livelli di micotossine, in particolare DON, rappresentano una priorità per le organizzazioni agricole e per la regolamentazione (He *et al.*, 2009).

Come per il controllo chimico, anche per il controllo biologico, la scarsità di studi che dimostrano l'efficacia di questi trattamenti *in vivo* limita l'uso di questo tipo di controllo. Tuttavia il controllo biologico può essere un ulteriore aiuto per il contenimento della FDS ed è da considerarsi uno strumento aggiuntivo all'interno di un programma di lotta integrata.

## FIGURE E TABELLE



Figura 1.1: Diversi stadi di infezione di spighe affette da FDS.



Figura 1.2: Particolare del sintomo dell'imbianchimento della spiga.



Figura 1.3: Sporodochi su spiga affetta da FDS.



Figura 1.4: Cariossidi discolorate e rossastre affette da FDS.



Figura 1.5: Tipica lesione necrotica su gluma causata da *F. poae*.

Tabella 1.1: Paesi produttori di frumento duro e relative quantità totali (dati Eurostat 2013).

Paese	Frumento totale (1000 t)
Bulgaria	5097
Czech Republic	4700,7
Denmark	4139
Germany	25019,1
Estonia	406,3
Ireland	533,9
Greece	1585,6
Spain	7597,9
France	38613,9
<b>Italy</b>	<b>7009,9</b>
Cyprus	35,2
Latvia	1435
Lithuania	2862,3
Luxembourg	91,1
Hungary	5095,8
Netherlands	1331,4
Austria	1597,7
Poland	9469,5
Romania	7463,9
Slovenia	138,9

Produzione frumento duro - Italia 2013

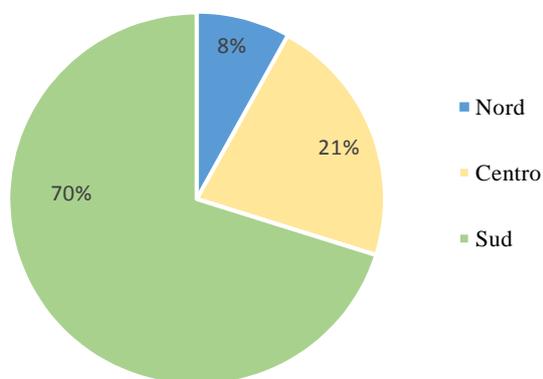


Grafico 1.1: Produzione frumento duro nelle tre principali zone italiane (dati Istat 2013).

Tabella 1.2: Produzione frumento duro in Emilia Romagna, anno 2013 (dati Istat 2013).

<b>Emilia Romagna</b>	<b>Produzione Frumento duro (q)</b>
Piacenza	146800
Parma	181060
Reggio nell'Emilia	25340
Modena	52200
Bologna	758460
Ferrara	986160
Ravenna	407750
Forlì-Cesena	51750
Rimini	61250

Tabella 1.3: Micotossine prodotte da diverse specie di *Fusarium*.

<b>SPECIE DI <i>FUSARIUM</i></b>	<b>MICOTOSSINE</b>
<i>F. acuminatum</i>	T-2, MON, NEO
<i>F. avenaceum</i>	MON, ENs, 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, T-2, HT-2, NEO, MAS
<i>F. proliferatum</i>	FB1, BEA, FUS
<i>F. sambucinum</i>	DAS, MAS
<i>F. semitectum</i>	BEA
<i>F. sporothrichioides</i>	T-2, NEO, MAS, HT-2
<i>F. subglutinans</i>	BEA, MON
<i>F. tricinctum</i>	MON
<i>F. verticillioides</i>	FB1, FB2

AcDon= AcetilDeossinivalenolo, DON (Deossinivalenolo); NIV (Nivalenolo); BEA (Beauvericina); FB1 e FB2 (Fumonisine); FUS (Fusaproliferina); ENs (Eniantine); MAS (Monoacetoxyscirpenolo); MON (Moniliformina); NEO (Neosolaniolo); DAS diacetossiscirpenolo; T-2; HT-2; ZEA (Zearalenone); ZOH (Zearalenolo).

## BIBLIOGRAFIA

- Andersen A. L.**, 1948. The development of *Gibberella zae* headblight on wheat. *Phytopathology* 38: 595-611.
- 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. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 1164-1168.
- Atanasoff D.**, 1920. Fusarium blight (scab) of wheat and other cereals. *Journal of Agricultural Research* 20: 1-32.
- Bai G.H., Shaner G.E.**, 1994. Wheat scab: perspective and control. *Plant Disease* 78: 760-766.
- Bai G.H., Shaner G.E.**, 2004. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* Head Blight. *Annual Review of Phytopathology* 42: 135-161.
- 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., Zefelippo M., Corazza L.**, 1995. *Fusarium* infection of the spike: an ever more frequent disease. *L'Informatore agrario* 51 (35): 55-57.
- Bennett W., Klich M.**, 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516.
- Binder E.M.**, 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science Technology* 133:149-166
- Brennan J.M., Leonard G., Fagan B., Cooke B.M., Ritieni A., Ferracane R., Nicholson P., Simpson D., Thomsett M., Doohan F.M.**, 2007. Comparison of commercial European wheat cultivars to *Fusarium* infection of head and seedling tissue. *Plant Pathology* 56: 55-64.
- Buertsmyr, H., Lemmens, M., Hartl, L., Doldi, L.**, 2002. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat I. Resistance to

- fungus spread (Type II resistance). *Theory Applied 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.
- Campagna C., Haidukowski M., Pancaldi D., Pascale M., Ravaglia S., Silvestri M., Visconti, A.,** 2005. Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento. *L'informatore agrario* 1: 39-47.
- Commissione delle Comunità Europee,** 2006. Regolamento (CE) n. 401/2006, del 23-02-2006. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea: L: 70, 12-34.
- Commissione delle Comunità Europee,** 2006. Regolamento (CE) n. 1881/2006, 19-12-2006. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea. L. 364, 5-24.
- Commissione delle Comunità Europee,** 2006. Regolamento (CE) n. 1126/2007, 28-9-2007. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea: L. 255, 14-17.
- Commissione delle Comunità Europee,** 2009. Regolamento (CE) n. 152/2009, 27-01-2009. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea: L54, 1-3.
- Commissione delle Comunità Europee,** 2013. Raccomandazione CE 165/2013/UE, 27-03-2013. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L91, 12-15.
- Corazza L., Balmas V., Pasquini M.,** 1989. La scabbia del frumento nell'Italia centrale. *L'informatore Agrario* 45 (23): 45-47.
- Covarelli L., Beccari G., Prodi A., Generotti S., Etruschi F., Juan C., Ferrer E., Manes J.,** 2014. *Fusarium* specie, chemotype characterization and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Journal of Science of Food and Agriculture* 95: 540-551.
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C.,** 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity.

*Animal Feed Science & Technology* 80: 183-205.

**Desjardin A.E.**, 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology. ASP Press, St. Paul, MN.

**Desjardins A.E., Busman M., Proctor R.H., Stessman R.**, 2007: Wheat kernel black point and fumonisin contamination by *Fusarium proliferatum*. *Food Additives and Contaminants* 24: 1131-1137.

**Dill-Macky R.**, 2003. Inoculation methods and evaluation of *Fusarium* head blight resistance in wheat. Eds Leonard K.J., Bushnell W.R. APS Press St. Paul Minnesota, pp. 184-210.

**Doohan F.M., Brennan J.M., Cooke B.M.**, 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 755-768.

**Doohan F.M., Parry D.W., Jenkinson P., Nicholson P.**, 1998. The use of species-specific PCR-based assay to analyze *Fusarium* ear blight on wheat. *Plant Pathology* 47: 197-205.

**Dubin H.J., Gilchrist L., Reeves J., McNab A.**, eds. 1997. *Fusarium* head scab: Global status and prospects. *CIMMYT, Mexico, DF, Mexico*. 130 p.

**Edwards S.G., Godley N.P.**, 2010. Reduction of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. *Food Additives and Contaminants* 27 (5): 629-635.

**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.

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

**Griffiths D.A.**, 1974. The origin, structure and function of chlamydospores. *Nova*

*Hedwigia* 25: 503–547.

- Haidukowski M., Pascale M., Perrone G., Pancaldi D., Campagna C., Visconti A.,** 2005. Effect of fungicides on *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.
- He J., Boland G.J., Zhou T.,** 2009. Concurrent selection for microbial suppression of *Fusarium graminearum*, *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1805-1817.
- Ioos R., Belhadj A., Menez M., Faure A.,** 2005. The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. *Crop Protection* 24: 894-902.
- Jochum C.C., Osborne L.E., Yuen G.Y.,** 2006. *Fusarium* head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes*. *Biological Control* 39: 336-44.
- Joffe A.,** 1978. *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as principal causes of alimentary toxic aleukia. In: Wyllie TD, Morehouse LG, Eds. *Handbook of mycotoxins and mycotoxicoses*, New York: Marcel Dekker Vol. 3: 21-86.
- Johnson A.G., Dickson J.G., Johan H.,** 1920. An epidemic of *Fusarium* blight (scab) of wheat and other cereals. *Phytopathology* 10, 51.
- Jones R.K.,** 2000. Assessments of *Fusarium* head blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. *Plant Disease* 84: 1021-1030.
- 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.
- Kurek E., Jaroszuk C.S., Shtssls J.Z.,** 2003. Rye (*Secale cereale*) growth promotion

- by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biological Control* 26: 48-56.
- Leslie J.F., Summerell B.A.**, 2006. The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell publishing, U.S.A.*
- Lehoczki-Krsjak S., Szabo-Hever A., Toth B., Kotai C., Bartok T., Varga M., Farady L., Mesterhazy A.**, 2010. Prevention of *Fusarium* mycotoxin contamination by breeding and fungicide application to wheat. *Food Additives and Contaminants* 27 (5): 616-628.
- Liu S., Anderson J.A.**, 2003. Marker assisted evaluation of *Fusarium* head blight resistant wheat germplasm. *Crop Science* 43: 760-766.
- Lops R., Pascale M., Perrone G., Pancaldi D., Visconti A.**, 1998. Infezioni fungine e presenza di deossinivalenolo in cariossidi di frumento prodotte in diverse regioni italiane. *Informatore Fitopatologico* 4: 60-66.
- 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 Science Technology* 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., (eds) “*Fusarium* head blight of wheat and barley”: 381-394.
- MacInnes J., Fogelman R.**, 1923. Wheat scab in Minnesota. *University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin* 18, 32 pp.
- Maier F.J., Miedaner T., Hadelar B., Felix A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H., Schafer W.**, 2006. Involvement of trichotecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5)

- gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* 7 (6): 449-461.
- Meriggi P., Pradolesi G.F.**, 2006. La gestione della fusariosi della spiga e del rischio micotossine. *Agronomica* 2: 4-6.
- Mesterhazy A.**, 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114: 377-386.
- Mesterhazy A., Bartok T., Mirocha C., Komoroczy R.**, 1999. Nature of resistance of wheat to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination and their consequences for breeding. *Plant Breeding* 118: 97-110.
- 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.**, 2003. Breeding wheat for *Fusarium* head blight resistance in Europe. In: *Fusarium Head blight of wheat and barley*. Eds Leonard K.J., Bushnell W.R. APS Press St. Paul Minnesota: 211-240.
- Miller J.D., Crow M., Stockdale F.**, 1985. Slow and fast myosin heavy chain content defines three types of myotubes in early muscle cell cultures. *Cell Biology* 101: 1643-1650.
- Miller J.D., Greenhalgh R., Wang Y.Z., Lu M.**, 1991. Trichothecene chemiotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia* 83: 121-130.
- Montorsi F., Pezzali M., Margarita L.**, 1988. Alcune osservazioni su semente di grano duro in Italia settentrionale. *Informatore Fitopatologico* 38 (10): 63-67.
- Morris C.F., Simeone M.C., King G.E., Lafiandra D.**, 2011. Transfer of soft kernel texture from *Triticum aestivum* to durum wheat *Triticum turgidum* spp. *durum*. *Crop Science* 51: 114-122.

- Nicholson P., Chandler E., Draeger R.C., Gosman N.E., Simpson D.R., Thomsett M., Wilson A.H.,** 2003. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of *Fusarium* head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 691-703.
- Osborne L.E., Stein J.M.,** 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119: 103-108.
- Palacios S.A., Ramirez M.L., Cabrera Zalazar M., Farnochi M.C., Zappacosta D., Chiacchiera S.M., Reynoso M.M., Chulze S.N., Torres A.M.,** 2011: Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 12264-12269.
- 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., Tonti S., Prodi A., Salomoni D., Dal Pra M., Nipoti P., Alberti I., Pisi A.,** 2010. Survey of the main causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 258-266.
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L.,** 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grains - a review. *Plant Pathology* 44: 207-238.
- Parry D.W., Pettitt T.R., Jenkinson P., Lees A.K.,** 1994. The cereal *Fusarium* complex. In: Blakeman P and Williamson B (eds) *Ecology of Plant Pathogens* (pp 301–320) CAB International, Wallingford, UK.
- Paul P.A., Lipps P.E., Hershmann D.E., McMullen P., Draper A., Madden L.V.,** 2006. A Quantitative Review of Tebuconazole Effect on *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol Content in Wheat. *The American Phytopathological Society* 97 (2): 211-220.

- Peglion V.**, 1900. Sulla cosiddetta “Golpe Bianca” del frumento. *Bollettino Notiziario Agrario* 20: 17-26.
- Pereyra S.A., Dill Macky R., Sims A.L.**, 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease* 88: 724-730.
- Pettitt T.R., Parry D.W.**, 1996. Effect of climate change on *Fusarium* foot rot of winter wheat in the United Kingdom. In: Frankland J.C., Mangan N. and Gadd G.M. (eds) *Fungal and Environmental Change* Cambridge University Press: 21-31.
- Poggiolini S., Baccarini G.**, 2006. Fusarium-tossine e frumento: il 2006 l’anno di nuovi provvedimenti legislativi per l’alimentazione umana. *Agronomica* 2: 7-10.
- Pugh G. W., Johann H., Dickson J. G.**, 1933. Factors affecting infection on wheat heads of *Gibberella saubinetii*. *Journal of Agricultural Research* 46: 771-97.
- Ruckenbauer P., Buestsmayr H., Lemmens M.**, 2001. Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). *Euphytica* 119: 121-127.
- Schroeder W., Christensen J.**, 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831-838.
- Shaner G.E.**, 2002. Resistance in hexaploid wheat to *Fusarium* head blight. Natl. *Fusarium* Head Blight Forum Proc. Elanger, KY, East Lansing: MI State Univ. Press: 208–211.
- Shaner G.E.**, 2003. Epidemiology of *Fusarium* head blight of small grain cereals in North America. In: *Fusarium Head blight of wheat and barley*. Eds Leonard K.J., Bushnell W.R. APS Press St. Paul Minnesota: 84-119.
- Shephard G.S., Westhuizen L. van der, Gatyeni P.M., Katerere D.R., Marasas W.F.O.**, 2005: Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9293-9296.
- Shi C., Yan P., Li J., Wu H., Li Q., Guan S.**, 2014. Biocontrol of *Fusarium*

- graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11: 1094-1105.
- 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.
- 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.
- 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., Wolf-Hull C.E., Casper H.H., Hansen J.M.,** 2000. DON level in grain from inoculated plant with *Fusarium graminearum* is not correlated to the DON producing potential of individual cultures. *National Fusarium Head Blight Forum, Cincinnati*, 198.
- Stenglein S.A.,** 2009. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology* 91 (1): 25-36.
- Strange R.N., Smith H.,** 1971. A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiological Plant Pathology* 1: 141-50.
- Strange R.N., Smith H.,** 1978. Effects of choline, betaine and wheat germ extract on growth of cereal pathogens. *Transactions of the British Mycological Society* 70: 193-9.

- 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.
- Sutton, J.C.**, 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195-209.
- Trail F., Xu H., Loranger R., Gadoury D.**, 2002. Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia* 94: 181-189.
- Vesonder R.F, Ceigler A., Jensen A.H.**, 1973. Isolation of the emetic principle from *Fusarium graminearum*-infected corn. *Applied Microbiology* 26: 1008-1010.
- Vogelgsang S., Sulyok M., Hecker A., Jenny E., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H-R.**, 2008. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology* 122: 265-276.
- 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.
- Xu X.M.**, 2003. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology* 109: 683-689.
- Xu X.M., Nicholson P.**, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* 47: 83-103.

## SCOPO DELLA RICERCA – OBIETTIVI

Lo studio della Fusariosi della spiga (FDS) necessita l'approfondimento delle conoscenze delle specie di *Fusarium*, considerate i principali agenti causali della fitopatia, poichè ognuna di esse possiede capacità patogeniche e tossigene differenti. Le specie considerate tra gli agenti causali principali sono *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* e di recente anche *F. poae*. L'importanza del ruolo di *F. graminearum* nel complesso della FDS è ben nota, mentre il coinvolgimento di *F. poae* nella malattia è tutt'ora oggetto di discussione nella comunità scientifica. Pertanto la caratterizzazione dal punto di vista micologico e biomolecolare di ceppi appartenenti a questa specie fungina, *F. poae*, è stata al centro di questa ricerca.

Ceppi di *F. poae* sono stati test saggiati, tramite lo sviluppo di un saggio *in vitro* “Petri-dish test”, per valutare l'aggressività che è stimata da parametri statistici quali AUHPC e AUDPC standard, insieme con altri elementi come la riduzione della lunghezza del coleottilo e del tasso di germinazione. Questi combinati insieme, generano un indice di aggressività che permette di classificare quanto un patogeno è aggressivo. La messa a punto del saggio è stata eseguita sulla base del test sviluppato per *F. graminearum* da Purahong *et al.* (2012) e si è deciso di estendere l'applicazione dello stesso saggio anche ad alcuni ceppi di *F. culmorum*. Questo è stato fatto per valutare la riproducibilità del test su diverse specie fungine, in modo da ottenere un metodo affidabile e rapido che possa essere adattato anche ad altri patogeni, da poter applicare per selezionare i ceppi patogeni che potranno essere usati per esperimenti successivi in serra o in campo.

In seguito si è proceduto all'allestimento di una prova in serra per una inoculazione artificiale di ceppi di *F. poae* su piante di frumento duro (Cv Simeto) sensibili alla Fusariosi della spiga, saggiando sia diverse concentrazioni conidiche, che diversi stadi di crescita della pianta, per poter valutare *in vivo* il comportamento di ciascun ceppo fungino.

L'inoculazione artificiale in serra è un procedimento necessario sia per visualizzare i sintomi, che per studiare il potenziale patogenico e l'aggressività di singoli ceppi fungini. Infatti è l'unico modo per tenere controllate le variabili climatiche quali temperatura e umidità, ed escludere la competizione con altre specie di *Fusarium*, che renderebbero altrimenti più complesso il riconoscimento della malattia e soprattutto l'attribuzione dei sintomi alle specie fungine.

I dati ricavati dalla prova in condizioni controllate sono stati utilizzati per valutare una possibile correlazione con i dati ottenuti dalla prova *in vitro*.

Per completare il lavoro di caratterizzazione dei ceppi di *F. poae*, le spighe infette sia sintomatiche che non, provenienti dalla prova di inoculazione in serra, sono state macinate fino a ridurle in sfarinato e si è proceduto a stimare la quantità di biomassa fungina mettendo a punto un protocollo di Real time PCR, utilizzando la chimica SYBR® Green I, come intercalante con attività fluorofora.

La tecnica di Real time PCR ottimizzata per *F. poae* si è dimostrata essere specifica per questa specie, e molto vantaggiosa per via dei ridotti costi di analisi complessivi e contemporaneamente in grado di analizzare e quantificare la biomassa di un numero elevato di campioni.

La Real Time PCR è quindi un ottimo strumento per rilevare una possibile infezione da parte di *Fusarium* su frumento anche laddove non ci siano sintomi evidenti.

## **CAPITOLO II**

### **VALUTAZIONE DELL'AGGRESSIVITA' DI CEPPI DI *FUSARIUM POAE*: APPLICAZIONE DEL SAGGIO *IN* *VITRO* "PETRI-DISH TEST" SU FRUMENTO DURO**

## **ABSTRACT**

La fusariosi della spiga (FDS) è una fitopatologia fungina che colpisce le colture cerealicole ed è causata da specie fungine appartenenti ai generi *Fusarium* e *Microdochium*. *Fusarium poae* è considerato ad oggi una delle principali specie fungine responsabili della malattia; il suo potenziale patogenico però non è sempre stato oggetto di studi, in quanto la sua importanza si è affermata solamente in tempi recenti. Lo studio delle caratteristiche di patogenicità e aggressività di specie fungine è importante per capire in modo più approfondito la stretta relazione che intercorre tra pianta ospite e patogeno nel sistema FDS – frumento duro.

Questo lavoro descrive un test *in vitro* per la valutazione dell'aggressività di ceppi fungini, in particolare di *F.poa*, riconosciuto dalla comunità scientifica come uno degli agenti causali della Fusariosi della spiga su frumento duro.

Il saggio *in vitro*, utilizzato in questa sperimentazione, è una modificazione del Petri-dish test, già sviluppato con successo per *F. graminearum* (Purahong *et al.*, 2012), adattato al sistema *F. poae* – frumento duro. Sono state prese in considerazione diverse temperature di incubazione (15, 22 e 25°C) per verificare l'effetto della temperatura sullo sviluppo del fungo e quindi sull'epidemiologia.

Tutti i ceppi di *F. poae* considerati si sono mostrati patogeni. Il livello di aggressività tra gruppi di ceppi si è differenziato statisticamente, inoltre tutti i ceppi sono risultati essere statisticamente differenti rispetto al controllo negativo. I parametri statistici ottenuti di AUHPC, AUDPC standard, insieme a quelli relativi alla riduzione di germinazione delle sementi di frumento duro e riduzione della lunghezza del coleotile, sono risultati essere correlati con l'indice di aggressività Ap index ( $p < 0.01$ ), il cui valore, attribuito a ciascun ceppo fungino, permette uno screening, rapido ed economico dei ceppi da poter utilizzare per successive prove in serra e in campo.

## **INTRODUZIONE**

La malattia fungina Fusariosi della spiga (FDS), che colpisce una vasta gamma di colture cerealicole, tra cui frumento, mais e orzo, è stata ed è tutt'ora oggetto di studio a livello mondiale (Parry *et al.*, 1995; Goswami e Kistler, 2004). Gli effetti principali riguardano una scarsa resa del raccolto e una bassa qualità per quelle sementi (Vogelgsang *et al.*, 2008a) che risultano essere contaminate da micotossine. Queste sono molecole molto importanti, poichè minacciano la sicurezza alimentare sia

dell'uomo che degli animali (Bennett e Klich, 2003), argomento che desta sempre più interesse e allo stesso tempo preoccupazione nella comunità scientifica.

Tra gli agenti causali predominanti ritroviamo *F. graminearum* Schwabe, *F. culmorum* (WG Smith) e *F. poae* (Peck) Wollenweber (Nicholson *et al.*, 1998). *F. poae* ad oggi è considerato a tutti gli effetti uno degli agenti causali della Fusariosi della spiga, sebbene in passato sia stato ritenuto un debole patogeno (Audenaert *et al.*, 2009). La sua crescente importanza deriva dal fatto che può produrre un numero elevato di micotossine, tra cui tricoteceni di tipo A (diacetossiscirpenolo, DAS; monoacetossiscirpenolo, MAS; T-2 HT-2; neosolaniolo, NEO) e tipo B (nivalenolo, NIV; fusarenone X, FusX), così come beauvericine ed enniatine (Thrane *et al.*, 2004; Uhlig *et al.*, 2006). Inoltre, il ritrovamento sempre più frequente di ceppi di *F. poae* in Nord Europa (Vogelgsang *et al.*, 2008b) così come in Italia (Shah *et al.*, 2005; Pancaldi *et al.*, 2010; Infantino *et al.*, 2012) ha fatto crescere l'attenzione su questo patogeno fungino, come ben sottolineato anche dalla review di Stenglein (2009).

Nello studio dell'epidemiologia è molto importante considerare l'effetto delle condizioni ambientali sulla crescita del patogeno, sviluppo della malattia e conseguente produzione di micotossine, così come le condizioni di crescita delle piante di frumento. L'importanza dei fattori climatici è sottolineata da diversi autori (Schaafsma *et al.*, 2001; Doohan *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008; Xu e Nichloson, 2009); questi fattori influenzano la produzione e dispersione dell'inoculo e la conseguente infezione delle spighe di grano (Sutton, 1982), specialmente durante la fase di crescita della pianta più suscettibile alla malattia.

*F. poae* cresce prevalentemente in condizioni ambientali secche e temperate (Xu *et al.*, 2005, 2007; Pancaldi *et al.*, 2010) e induce delle lesioni necrotiche sulle glume delle cariossidi (Doohan *et al.*, 1998; Vogelgsang *et al.*, 2008b).

Un parametro importante per capire il legame dell'interazione tra patogeno e organismo ospite nel sistema FDS – frumento duro è l'aggressività (Wu *et al.*, 2005). Questa rappresenta un indice quantitativo che indica il tasso a cui viene raggiunto un certo livello di gravità di malattia da un patogeno (Shaner *et al.*, 1992) e si differenzia dalla patogenicità, indice qualitativo che rappresenta l'abilità di un organismo patogeno di causare una malattia.

Per poter studiare e classificare l'aggressività di un patogeno, un metodo efficace è quello di allestire prove *in vivo* inoculando il patogeno nel momento di maggiore suscettibilità dell'ospite. Tali prove hanno lo svantaggio di richiedere tempi lunghi di

analisi e costi elevati; inoltre variabili quali stadio di crescita e condizioni ambientali possono notevolmente influenzare la riuscita dell'esperimento. Lo sviluppo di metodi alternativi, ad esempio *in vitro*, può facilitare la valutazione dell'aggressività dei ceppi patogeni.

Purahong *et al.* (2012) hanno sviluppato un saggio *in vitro* per la valutazione dell'aggressività di 32 ceppi di *F. graminearum* su piante di frumento duro; il saggio si basa sull'osservazione della riduzione della germinazione, riduzione della lunghezza del coleotile e della percentuale di semi che mostrano sintomi tipici della malattia. In origine, il metodo era stato sviluppato e messo a punto da Mesterhazy (1978) per selezionare cultivar resistenti alla FDS valutando la riduzione della percentuale di semi sani (che non mostrano sintomi) dopo inoculazione fungina. È stato dimostrato nel lavoro sopracitato di Purahong *et al.* che tutti questi parametri (riduzione della germinazione, della lunghezza del coleotile e della percentuale di semi sani) sono anche coinvolti nel determinare l'aggressività di un ceppo fungino.

Il lasso di tempo in cui avviene la riduzione della lunghezza del coleotile è un parametro che era già stato considerato come correlato all'aggressività di un ceppo: più veloce è la riduzione della lunghezza del coleotile, maggiore è l'aggressività del ceppo che ha causato tale riduzione (Brennan *et al.*, 2003).

Inoltre, in aggiunta a questo parametro, anche la riduzione della percentuale di semi sani nel tempo è un buon indicatore dell'aggressività: più è veloce la riduzione del numero di semi sani, più un ceppo è da considerare aggressivo (Purahong *et al.*, 2012).

L'insieme di questi parametri permette di individuare un indice che valuta l'aggressività di un organismo patogeno nell'interazione con la pianta-ospite. La gamma dei valori è tra 0 (non aggressivo) e 1 (altamente aggressivo).

L'obiettivo di questo lavoro è stato di analizzare una collezione di ceppi di *F. poae* provenienti da diverse zone italiane per determinarne l'aggressività *in vitro* tramite l'applicazione del Petri-dish test adattata al sistema *F. poae* – frumento duro.

## **MATERIALI E METODI**

### **Ceppi fungini *F. poae***

Per la valutazione dell'aggressività, sono stati utilizzati dieci ceppi di *F. poae* isolati da cariossidi di frumento duro di diverse cultivar e provenienti da varie località italiane (Emilia-Romagna, Toscana, Marche, Veneto, Puglia e Molise), già presenti nella

collezione del Laboratorio di Micologia Fitopatologica del DipSA e caratterizzati sia dal punto di vista molecolare, che dal profilo tossigenico (Tabella 2.1).

### **Produzione di conidi**

I ceppi di *F. poae* sono stati fatti crescere su piastre Petri contenenti come substrato PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, U.S.A.) e incubati a 25°C (Figura 2.1). Per ciascun ceppo è stata preparata una beuta contenente 150 mL di terreno liquido Czapek, preparato dissolvendo 5.3 g di Czapek broth in 150 mL di acqua distillata e successivamente sterilizzato, a cui sono stati aggiunti 3 plugs di micelio, con un “cork borer” di 5 mm di diametro che viene sterilizzato dopo l’uso per ciascun ceppo fungino. Le beute sono state poste in agitazione su uno shaker ad agitazione orizzontale e temperatura controllata a 25°C, 110 giri al minuto per 2 settimane sotto luce solare incidente (MaxQ 4000, Thermo Fisher). Dopo la prima settimana di agitazione le beute sono state controllate per verificare se la concentrazione di conidi avesse raggiunto 10<sup>6</sup> conidi/mL; per tutti i ceppi sono state necessarie due settimane di crescita sotto agitazione continua (Figura 2.2). La miscela di microconidi, micelio e terreno Czapek è stata successivamente filtrata con una siringa sterilizzata contenente un doppio strato di garza sterile. La sospensione liquida ottenuta è stata conservata in frigo a 4°C; prima di procedere all’inoculazione per il saggio Petri-dish, la concentrazione della sospensione è stata aggiustata a 10<sup>6</sup> conidi/mL, previa misurazione con cella Thoma al microscopio ottico (Labor lux 12, Leitz Wetzlar, Germania).

### **Set-up del saggio *in vitro* Petri-dish test**

Il Petri-dish test è stato utilizzato per valutare l’aggressività dei ceppi fungini di *F. poae*. Il saggio *in vitro* rispecchia quello descritto da Mesterhazy (1978, 1984, 2002), applicato a *Fusarium graminearum* da Purahong *et al.*, (2012) e quindi adattato in questo lavoro a *F. poae*.

Sementi di frumento duro appartenenti alla cultivar Simeto, sensibile alla Fusariosi della spiga, sono state sterilizzate in una soluzione al 2% di ipoclorito di sodio (NaClO) per cinque minuti e risciacquate con acqua deionizzata per cinque - sei volte, finchè l’odore di ipoclorito di sodio non era completamente dissolto.

Il processo di inoculazione è avvenuto diffondendo 10 mL di ciascuna sospensione conidica (acqua demineralizzata e sterilizzata per il controllo negativo) su un doppio

strato di carta da filtro contenuto in piastre Petri di vetro, 15 cm di diametro, precedentemente sterilizzate in autoclave. Dopo aver eliminato eventuali bolle d'aria tra la carta filtro e la sospensione liquida, 25 sementi sterilizzate come descritto sopra sono state collocate nella piastra, facendo attenzione a posizzionarle con l'embrione rivolto verso l'alto. Per garantire un costante grado di umidità relativa e scarsa circolazione dell'aria, le piastre sono state inserite in sacchetti di plastica contenenti un batuffolo di cotone bagnato; sono quindi state messe in incubatore al buio a diverse temperature: 15°C, 22°C e 25°C, per valutare l'optimum di crescita fungina. Per ciascun ceppo l'esperimento è stato allestito in doppio (Figura 2.3). Il primo controllo è avvenuto dopo due giorni dall'inoculo, contando il numero di semi germinati e quel valore è stato indicato come 100% di semi germinati. I rilievi successivi sono stati effettuati dal terzo al nono giorno dall'inoculazione. I semi infetti da *F. poae* sono stati valutati per la presenza di lesioni necrotiche, e/o per la presenza di micelio attorno ad essi. La percentuale di semi non infetti è stata interpolata in funzione del tempo e l'area che sottende la curva è calcolata dalla formula (1), AUHPC, Area Under Healthy Progress Curve, che varia tra 50 (aggressivo) e 700 (non aggressivo). Questo parametro è stato standardizzato da AUDPC standard descritto nella formula (2), ovvero Area Under Disease Progress Curve (Koutnik e Lemmens, 2007), che varia tra 0 (non aggressivo) e 1 (aggressivo). Altri parametri valutati sono stati: Clr, coleoptile length reduction (formula 3) e Gr, germination rate reduction (formula 4); il primo si riferisce alla lunghezza del coleotile nei semi germinati e il secondo al numero di semi germinati, i cui conteggi sono stati effettuati, rispetto il controllo negativo, l'ultimo giorno di rilievo. L'insieme di questi parametri ha permesso di individuare un indice di aggressività per ciascun ceppo fungino, calcolato come indicato nella formula (5).

$$(1) AUHPC = \frac{B1 + 2 \cdot B2 + 2 \cdot B3 + 2 \cdot B4 + 2 \cdot B5 + 2 \cdot B6 + 2 \cdot B7 + B8}{2}$$

(B1 – B8 percentuale di semi non infetti dal secondo al nono giorno di rilievo; B1 è settato al 100%)

$$(2) AUDPC_{stand} = \frac{700 - AUHPC}{650}$$

$$(3) Clr = \frac{\overline{Clc} - \overline{Clt}}{\overline{Clc}}$$

(Clc e Clt rappresentano la lunghezza del coleotile nel controllo e nei campioni inoculati, rispettivamente)

$$(4) Gr = \frac{NGc - NGt}{NGc}$$

(NGc e NGt rappresentano il numero di semi germinati nel controllo e nei campioni inoculati, rispettivamente)

$$(5) APindex = \frac{AUDPC_{stand} + Gr + Clr}{3}$$

I postulati di Koch sono stati soddisfatti reisolando *F. poae* dalle lesioni necrotiche sul coleotile, o identificandolo morfologicamente dal micelio che ricopriva il seme infetto.

### **Analisi statistica**

Prima di procedere con la valutazione dell'aggressività dei ceppi di *F. poae* considerati, le ripetizioni relative ai diversi parametri per ciascun ceppo sono state sottoposte ad analisi statistica per verificare l'omogeneità della varianza e la distribuzione normale; i dati sono stati normalizzati a 1/Y.

Il software Statgraphic plus – Statistical Graphic Corporation ha permesso di comparare tramite analisi ANOVA le ripetizioni di uno stesso ceppo (omogeneità della varianza) e di valutare la distribuzione di probabilità normale che descrive come dei valori reali di variabili casuali tendono a concentrarsi attorno ad un valore medio.

L'analisi statistica relativa alla comparazione multipla tra i ceppi è stata eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22) con analisi di varianza ad una via, incorporando il test post hoc LSD al 5% di livello di significatività per differenziare i ceppi di *F. poae*.

La correlazione tra i parametri di aggressività dei replicati è stata determinata dal coefficiente di correlazione di Pearson al livello di significatività del 5%.

## **RISULTATI**

### **Aggressività dei ceppi di *F. poae***

Tutti i dieci ceppi fungini utilizzati hanno indotto i tipici sintomi di lesioni necrotiche e talvolta micelio localizzato sul seme, confermandone la patogenicità.

La migliore temperatura di crescita per questo saggio e per la specie in considerazione è stata di 22°C; a 15°C non è stato possibile differenziare significativamente i ceppi dal controllo negativo, mentre a 25°C l'accrescimento eccessivo di micelio non ha reso possibile la valutazione dei parametri statistici. Tutti i ceppi hanno mostrato una moderata variazione nell'aggressività, identificata nei parametri di AUHPC che

variavano da 669 per il ceppo F 481 a 556 per i più aggressivi (F 596 e F 615), con rispettivi valori di AUDPC standard che variavano tra 0.05 e 0.22 rispettivamente (Tabella 2.2).

Il ceppo F 596, quindi, si è dimostrato essere il più aggressivo, insieme al ceppo F 615, in tutti i parametri considerati; nel complesso tutti i ceppi si sono differenziati statisticamente dal controllo negativo (Tabella 2.2). Il controllo negativo non è risultato essere contaminato, con valori di AUHPC di 700 e AUDPC standard di 0.00 (Tabella 2.2).

Una grande variazione della riduzione della lunghezza del coleotile è stata riscontrata tra i ceppi, con percentuali minime e massime di 7% e 69% rispettivamente; anche per quanto riguarda la riduzione del tasso di germinazione si è osservata una moderata variazione che oscilla tra 24% e 66% (Tabella 2.2). I parametri ottenuti dal Petri-dish test erano correlati tra di loro, in particolare l'indice di aggressività Ap index era correlato significativamente con AUDPC standard ( $r = 0.66$ ;  $p < 0.01$ ), con il tasso di riduzione di germinazione, Gr ( $r = 0.71$ ;  $p < 0.01$ ) e con la riduzione della lunghezza del coleotile, Clr ( $r = 0.53$ ;  $p < 0.01$ ) (Tabelle 2.3 – 2.4 e 2.5 rispettivamente).

E' stato possibile individuare un andamento dell'aggressività dei ceppi di *F. poae* nei giorni dei rilievi (Figura 2.4), in cui la riduzione più drastica della percentuale di semi non infetti si è avuta negli ultimi giorni di rilievo dei sintomi. Il saggio originale infatti prevedeva un numero minore di giorni di osservazione, che in questo caso è stato esteso, proprio perchè l'aggressività dei ceppi si è manifestata in generale tra il quarto e il quinto giorno di rilievo, portando ad un drastico calo della percentuale di sementi sane verso gli ultimi due giorni di valutazione dei sintomi, in particolare per i ceppi F 596 e F 615.

## **DISCUSSIONE**

Il saggio *in vitro* Petri-dish sviluppato in questo lavoro ha definito dei parametri, che nel loro insieme hanno portato alla determinazione di un indice che definisce l'aggressività di ceppi fungini patogeni di *F. poae*. I ceppi utilizzati per il saggio, isolati da cariossidi di frumento duro, hanno mostrato una moderata variabilità dell'indice globale di aggressività (Ap index), che risulta essere correlato ai tre diversi parametri considerati come potenziali indicatori di aggressività: AUDPC standard, ovvero la standardizzazione della riduzione della percentuale di semi sani in seguito ad

inoculazione, Clr, coleoptile length reduction nelle sementi asintomatiche e Gr, germination rate reduction. Nel lavoro condotto su *F. poae* l'aggressività ha portato al differenziamento statisticamente significativo di gruppi di ceppi, diversificandoli significativamente dal controllo negativo.

Dalla letteratura è noto che le condizioni ambientali sono un elemento fondamentale per favorire o, al contrario, sfavorire, la crescita di una determinata specie fungina. *F. poae* predilige temperature calde e secche e per contro, le precipitazioni possono avere un effetto negativo sull'infezione (Parikka *et al.*, 2012). In uno studio condotto da Brennan *et al.* (2003) sulla patogenicità *in vitro* dei principali agenti causali di FDS, è stato dimostrato che l'optimum di temperatura per lo sviluppo *in vitro* di *F. poae* varia tra i 20°C e 25°C; quest'osservazione è coerente con i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, dove la miglior temperatura di crescita per *F. poae* è risultata essere 22°C. Infatti l'incubazione a 15°C in condizioni stabili e controllate, quindi senza fluttuazioni, ha determinato nelle cariossidi una scarsa sintomatologia della FDS; solo in una piccola percentuale di esse si era formato il micelio o piccole lesioni necrotiche sul coleottilo, e questo probabilmente sta a significare che tale temperatura tende ad inibire lo sviluppo del fungo. Al contrario, impostando una temperatura di incubazione costante di 25°C l'eccessivo micelio sviluppato non aveva permesso una valutazione chiara dei sintomi e una misurazione dei parametri statistici necessari per calcolare l'indice di aggressività per ciascun ceppo.

I sintomi rilevati sulle sementi hanno dimostrato la patogenicità dei ceppi fungini; questa è definita come la capacità di causare una malattia e rappresenta un indice qualitativo, mentre l'aggressività è un indice quantitativo che stabilisce il livello di malattia raggiunto da un organismo ospite; più aggressivo è il patogeno, minore sarà il tempo di manifestazione della sintomatologia (Shaner *et al.*, 1992).

La maggior parte delle metodologie di valutazione della patogenicità di un dato ceppo fungino, in questo caso *F. graminearum*, agente della fusariosi della spiga, si basa sull'inoculazione eseguita in corrispondenza del periodo di massima suscettibilità della pianta, ovvero all'antesi (Pugh *et al.*, 1933; Andersen, 1948; Strange e Smith, 1971; Sutton, 1982, Wu *et al.*, 2005); questo però allunga i tempi di lavoro, richiede un maggiore sforzo nella preparazione dei materiali ed è più costoso di un test *in vitro*, come ad esempio il Petri-dish test. L'utilizzo dell'inoculazione del coleottilo, come elemento indicante la patogenicità di un determinato isolato fungino di *F. graminearum*, è stato dimostrato in un lavoro di Wu *et al.* (2005), essere un valido metodo per

determinare la patogenicità di ceppi fungini, poiché il coleotile rappresenta una parte importante della pianta per la crescita della stessa, quindi una diretta inoculazione del coleotile permette una rapida manifestazione della malattia e quindi un'altrettanta rapida valutazione della patogenicità di un ceppo fungino.

Il saggio Petri-dish prevede un'inoculazione della cariosside a livello dell'embrione e considera anche la riduzione della crescita del coleotile; ciò contribuisce ad assegnare un valore numerico a ciascun ceppo fungino che è necessario per calcolare l'indice di aggressività.

Il saggio tiene conto, inoltre, della riduzione progressiva in un determinato arco temporale delle sementi sane, interpolando i valori in una curva, AUHPC e nella standardizzazione, AUDPC standard, per cui più è aggressivo un ceppo, più precoce sarà la comparsa della malattia, quindi più drastica sarà la riduzione della percentuale di semi sani e del tasso di germinazione delle cariossidi (Purahong *et al.*, 2012).

L'aggressività è quindi un parametro fondamentale per capire l'interazione patogeno – pianta nel sistema FDS – frumento duro (Wu *et al.*, 2005).

Riguardo *F. poae*, ci sono pochi lavori in letteratura basati su metodologie per individuare i ceppi patogeni e classificarli in base all'aggressività (Shaner *et al.*, 1992).

I promettenti risultati ottenuti da Purahong *et al.* (2012) con il saggio *in vitro* per *F. graminearum* hanno permesso di poter applicare con successo, con qualche modificazione di natura tecnica, il test anche al sistema *F. poae* – frumento duro.

Il saggio *in vitro* non può mimare fedelmente la situazione *in vivo* che avviene in campo, poiché svariati fattori influenzano l'insorgenza della malattia - come la variabilità delle condizioni climatiche e geografiche, la produzione di micotossine, l'interazione con altri microorganismi - ma rappresenta un importante mezzo per selezionare in maniera rapida e mirata quei ceppi che potranno essere esaminati durante le prove in campo.

La maggior parte delle prove di inoculazione artificiale prevede l'uso di una miscela di isolati fungini, che possono mascherare le differenze tra i vari isolati non solo per quanto riguarda la capacità di causare la malattia, ma anche per quanto riguarda la capacità di produrre micotossine (Vogelgsang *et al.*, 2008a). E' molto importante quindi trovare un metodo che possa riuscire a differenziare le caratteristiche di ciascun isolato fungino, per capire in modo più approfondito il ruolo che essi esercitano nel causare la FDS.

In conclusione il saggio *in vitro* presenta dei vantaggi importanti, tra cui: (i) la rapidità di esecuzione, infatti nel giro di pochi giorni è possibile individuare i primi sintomi, rispetto ad un'analoga prova in serra o in campo aperto; (ii) i costi contenuti per i materiali; (iii) la possibilità di esecuzione durante tutto l'anno; (iv) la comparazione dell'aggressività di diversi ceppi fungini per contribuire a caratterizzarli e da selezionare per indagini future.

Questo è uno dei primi lavori in cui si mette a punto e si applica un saggio *in vitro* per la valutazione dell'aggressività di ceppi di *F. poae* nel sistema FDS – frumento duro.

## FIGURE E TABELLE

Tabella 2.1: Elenco dei ceppi di *F. poae* testati nel saggio Petri-dish.

Ceppi <i>F. poae</i>	Località
F 448	Baricella (BO), Emilia-Romagna
F 481	Baricella (BO), Emilia-Romagna
F 541	Idice (BO), Emilia-Romagna
F 556	Minerbio (BO), Emilia-Romagna
F 596	Grosseto, Toscana
F 615	Jesi (AN), Marche
F 630	Taglio di Po (RO), veneto
F 703	Bari, Puglia
F 707	Macerata, Molise
F 708	Cadriano (BO), Emilia-Romagna

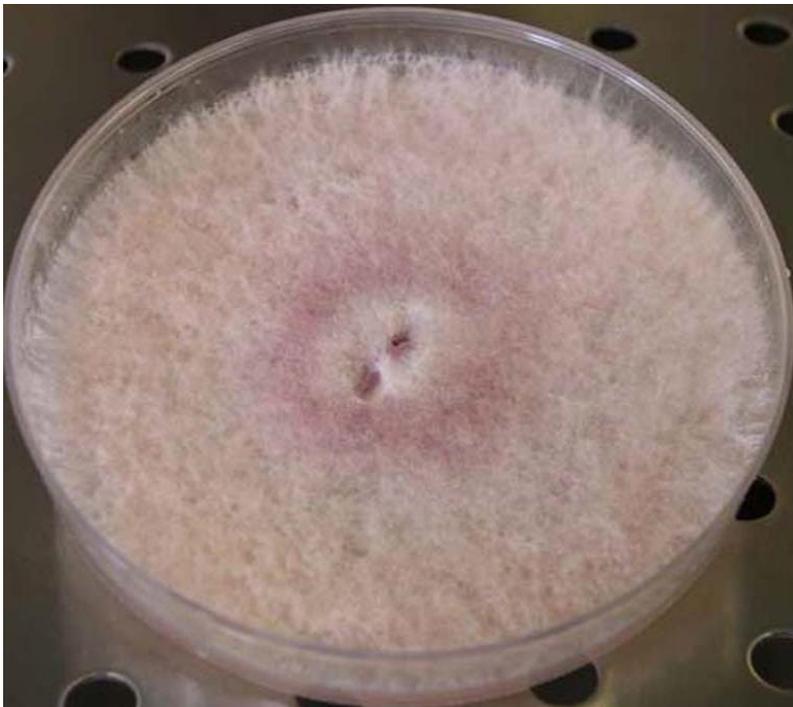


Figura 2.1: Colonia di *F. poae* cresciuta su PDA (Potato dextrose agar).



Figura 2.2: Ceppi di *F. poae* cresciuti su substrato Czapek broth.



Figura 2.3: Allestimento del saggio Petri-dish (Purahong *et al.*, 2012) su sementi di frumento duro cv. Simeto inoculate con il ceppo F 708 di *F. poae*.

Tabella 2.2: Valori medi dei parametri AUDPC standard, Clr (coleoptile length reduction), Gr (germination rate reduction) e indice di aggressività Ap index nel Petri-dish test dopo inoculazione dei ceppi di *F. poae*. Le lettere denotano che i ceppi si differenziano statisticamente ( $p < 0.05$ ) a seguito del post hoc test LSD eseguito con il software SPSS.

Ceppi <i>F. poae</i>	AUHPC	AUDPC stand	Clr	Gr	Ap Index
F 596	556	0,22	0,36	0,63	0,40 c
F 615	556	0,22	0,26	0,66	0,38 c
F 708	570	0,20	0,46	0,39	0,35 bc
F 707	626	0,11	0,51	0,37	0,33 bc
F 703	588	0,17	0,48	0,31	0,32 bc
F 481	669	0,05	0,69	0,25	0,33 bc
F 541	583	0,18	0,40	0,31	0,29 bc
F 448	639	0,09	0,61	0,24	0,31 bc
F 556	662	0,09	0,21	0,30	0,19 b
F 630	588	0,21	0,07	0,41	0,20 b
Controllo negativo	700	0,00	0,00	0,00	0,00 a

Tabella 2.3: Correlazioni statistiche tra Ap index ed AUDPC standard per *F. poae*, analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		AUDPCstd	Ap_Index_Fp
AUDPCstd	Correlazione di Pearson	1	0,658**
	Sign.		0,000
	N	26	26
Ap_Index_Fp	Correlazione di Pearson	0,658**	1
	Sign.	0,000	
	N	26	26

Tabella 2.4: Correlazioni statistiche tra Ap index e Gr per *F. poae*, analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		Ap_Index_Fp	Gr_Fp
Ap_Index_Fp	Correlazione di Pearson	1	0,714**
	Sign.		0,000
	N	26	24
Gr_Fp	Correlazione di Pearson	0,714**	1
	Sign.	0,000	
	N	24	24

Tabella 2.5: Correlazioni statistiche tra Ap index e Clr per *F. poae*, analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		Ap_Index_Fp	Clr_Fp
Ap_Index_Fp	Correlazione di	1	0,534**
	Pearson		
	Sign.		0,007
	N	26	24
Clr_Fp	Correlazione di	0,534**	1
	Pearson		
	Sign.	0,007	
	N	24	24

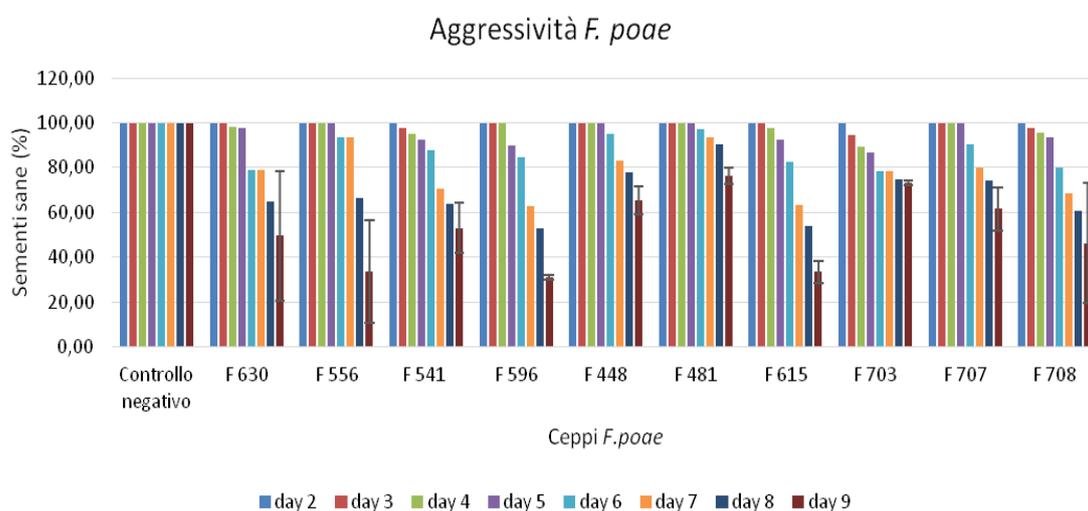


Figura 2.4: Andamento della valutazione dell'aggressività dei ceppi di *F. poae* testati nel saggio "Petri-dish" (Purahong *et al.*, 2012) in termini di percentuale di sementi sane, valutate dal secondo al nono (ultimo) giorno di rilievo post inoculazione. I dati si riferiscono ai valori medi della percentuale di semi sani conteggiati per le ripetizioni di ciascun ceppo fungino. La deviazione standard è stata calcolata tra le ripetizioni al nono giorno di rilievo.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Andersen A. L.**, 1948. The development of *Gibberella zae* headblight on wheat. *Phytopathology* 38: 595-611.
- Audernaert K., Van Broeck R., Bekaert B., De Witte F., Heremans B., Messens K., Hoefte M., Haesaert G.**, 2009. *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology* 125: 445-458.
- Bennett W., Klich M.**, 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516.
- Brennan J., Fagan B., van Maanen A., Cooke B., Doohan F.**, 2003. Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* 109: 577-587.
- Doohan F.M., Parry D.W., Jenkinson P., Nicholson P.**, 1998. The use of species-specific PCR-based assay to analyze *Fusarium* ear blight on wheat. *Plant Pathology* 47: 197-205.
- Goswami R.S., Kistler H.C.**, 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 515-525.
- Infantino A., Santori A., Shah D.A.**, 2012. Community structure of the *Fusarium* complex on wheat seed in Italy. *European Journal of Plant Pathology* 132: 499-510.
- Koutnik A., Lemmens M.**, 2007. Petri-dish infection method for aggressiveness test (in German). Standard operating protocol University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna. pp. 8.
- Mesterhazy A.**, 1978. Comparative analysis of artificial inoculation methods with *Fusarium* spp. on winter wheat varieties. *Phytopathology Z.* 93: 12-25.

- Mesterhazy A.**, 1984. A laboratory method to predict pathogenicity of *Fusarium graminearum* in field and resistance of wheat to scab. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 19 (3-4): 205-218.
- 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.
- Nicholason P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., 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.
- Pancaldi D., Tonti S., Prodi A., Salomoni D., Dal Pra M., Nipoti P., Alberti I., Pisi A.**, 2010. Survey of the main causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 258-266.
- Parikka P., Hakala K., Tiilikkala K.**, 2012. Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. *Food Additives and Contaminants* 29 (10): 1543-1555.
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L.**, 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grains - a review. *Plant Pathology* 44: 207-238.
- Pugh G.W., Johann H., Dickson J.G.**, 1933. Factors affecting infection on wheat heads of *Gibberella saubinetii*. *Journal of Agricultural Research* 46: 771-97.
- Purahong W., Alkadri D., Nipoti P., Pisi A., Lemmens M., Prodi A.**, 2012. Validation of a modified Petri dish test to quantify aggressiveness of *Fusarium graminearum* in durum wheat. *European Journal of Plant Pathology* 132: 381-391.

- Schaafsma A.W., Tamburic-Ilinic L., Miller J.D., Hooker D.C.,** 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 279-285.
- Shah 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. *European Journal of Plant Pathology* 112: 13-21.
- Shaner G. Stromberg E., Lacy G., Barker K., Pirone T.,** 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology* 30: 47-66.
- Stenglein S.A.,** 2009. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology* 91 (1): 25-36.
- Strange R.N., Smith H.,** 1971. A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiological Plant Pathology* 1: 141-50.
- Sutton J.C.,** 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195-209.
- Thrane U., Adler A., Clasen P-E., Galvano F., Langseth W., Lew H., Logrieco A., Nielsen K.F., Ritieni A.,** 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology* 95: 257-266.
- Uhlig S., Torp M., Heier B.,** 2006. Beauvericin and enniatins A, A1, B and B1 in Norwegian grain: a survey. *Food Chemistry* 94: 193-201.
- Vogelsgang S., Sulyok M., Hecker A., Jenny E., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H-R.,** 2008a. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology* 122: 265-276.

- Vogelgsang S., Sulyok M., Baezinger I., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H-R.,** 2008b. Effect of fungal strain and cereal substrate on *in vitro* mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. *Food Additives and Contaminants* 25 (6): 745-757.
- Wu A., Li H., Zhao C., Liao Y.,** 2005. Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* from China revealed by wheat coleoptiles and floret inoculations. *Mycopathologia* 160: 75-83.
- Xu X., Nicholson P.,** 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* 47: 83-103.
- Xu X., Nicholson P., Ritieni A.,** 2007. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* 119: 67-71.
- Xu X., Nicholson P., Thomsett M.A., Simpson D., Cooke B.M., Doohan F.M., Brennan J., Monaghan S., Moretti A., Mule G., Hornok L., Beki E., Tatnell J., Ritieni A., Edwards S.G.,** 2008. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* Head Blight of wheat and environmental conditions. *The American Phytopathological Society* 98: 69-78.
- Xu X., Parry D., Nicholson P., Thomsett M., Simpson D., Edwards S., Cooke B., Doohan F., Brennan J., Moretti A., Tocco G., Mulè 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.

## **CAPITOLO III**

### **VALUTAZIONE DELL'AGGRESSIVITA' DI CEPPI DI *FUSARIUM CULMORUM*: APPLICAZIONE DEL SAGGIO *IN VITRO* "PETRI-DISH TEST" SU FRUMENTO DURO**

## ABSTRACT

*Fusarium culmorum* è considerato tra gli agenti causali della Fusariosi della spiga (FDS) e della fusariosi del piede su frumento duro, fitopatie che colpiscono le colture cerealicole, causando perdite significative a livello di produzione e riduzione della qualità delle sementi.

I ceppi fungini sono in grado di contribuire alle malattie in maniera più o meno preminente. La valutazione dell'aggressività di un ceppo fungino è un dato importante per lo studio dell'epidemiologia di ciascuna malattia e per capire l'interazione tra il patogeno e l'organismo ospite.

In questo lavoro l'aggressività di 12 ceppi fungini di *F. culmorum* è stata saggiata con un test *in vitro* precedentemente descritto per *F. poae* (Capitolo II) e che deriva da una modificazione del saggio Petri-dish test già validato e sviluppato con successo per *F. graminearum* da Purahong *et al.* (2012).

La valutazione dell'aggressività ha evidenziato la patogenicità di tutti i 12 ceppi di *F. culmorum* considerati e un alto livello di aggressività degli stessi anche se non differenziato dal punto di vista statistico, mentre tutti i ceppi sono risultati essere statisticamente differenti rispetto il controllo negativo. I parametri statistici di AUHPC, AUDPC standard insieme a quelli relativi la riduzione di germinazione del coleotile e delle sementi di frumento duro, combinati insieme, hanno originato un indice di aggressività tendente al valore 1, cioè altamente aggressivo; inoltre questi indici hanno mostrato un buon livello di correlazione tra di loro, variabile tra 0.65 e 0.96 ( $p < 0.01$ ).

Questo saggio *in vitro* permette una selezione rapida di isolati fungini da poter utilizzare per successive prove in serra e anche in campo ed è adatto alla quantificazione del livello di aggressività di ceppi di *F. culmorum*.

## INTRODUZIONE

*Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. è considerato insieme con *F. graminearum* Schwabe [teleomorfo *Gibberella zae* (Schwabe) Petch] e *F. poae* (Peck) Wollenw. uno dei principali agenti causali della Fusariosi della spiga (FDS), una patologia che è in grado di devastare le colture cerealicole di tutto il mondo (Parry *et al.*, 1995; Gilbert e Tekauz, 2000; Goswami e Kistler, 2004). *F. culmorum* non ha un'elevata specificità di colonizzazione dei tessuti dell'organismo ospite, infatti lo si può isolare da radici, steli e

spiga (Parry *et al.*, 1995); tutto ciò contribuisce ad una grande variabilità di diffusione, influenzata notevolmente anche dalle condizioni climatiche e ambientali.

*F. culmorum* causa anche un'altra importante patologia del frumento: la fusariosi del piede, Fusarium root rot (FRR), conosciuta anche come Fusarium crown rot (FCR), a seconda della zona della pianta colpita dalla malattia. Nel primo caso i tessuti interessati risiedono nella parte basale del culmo, nella zona adiacente alla corona; nel secondo caso l'infezione si manifesta prevalentemente nelle radici. Le due patologie a livello sintomatico sono simili, in quanto coinvolgono la parte basale del culmo, compreso l'apparato radicale; in generale quindi la malattia viene definita "mal del piede" (Beccari *et al.*, 2011; Belli *et al.*, 2012).

I sintomi variano a seconda del momento dell'infezione: se il patogeno attacca quando la pianta si trova in uno stadio di sviluppo precoce (subito dopo la semina), si osserva una necrosi della piantina in fase di emergenza, con colorazioni brunastre a livello del coleotile e delle radici; se l'infezione avviene in una fase tardiva di crescita della pianta, le lesioni brunastre si manifestano sugli internodi dello stelo principale (Scherm *et al.*, 2013). In condizioni di umidità elevata, sui nodi emerge una massa di micelio di colore variabile dal rosso al rosa (Scherm *et al.*, 2013).

Sintomi aspecifici delle patologie riguardano la produzione di micotossine, metaboliti secondari prodotti dai patogeni fungini, contaminanti pericolosi per la salute dell'uomo e degli animali (Vesonder *et al.*, 1973; Joffe, 1978; D'Mello *et al.*, 1999). In particolare *F. culmorum* produce tricoteceni di tipo B tra cui le più conosciute deossinivalenolo (DON) e zearalenone (ZEA). DON rappresenta un fattore di virulenza che inibisce la sintesi proteica nelle cellule eucariotiche e impedisce l'innescamento e/o l'allungamento della catena polipeptidica legandosi alla subunità ribosomiale 60S (Kimura *et al.*, 1998). ZEA invece è una molecola dotata di attività estrogenica in grado di legarsi ai recettori uterini degli estrogeni determinando alterazioni dei cicli riproduttivi degli animali, ipofertilità in bovini e pollame e iper-estrogenismo nei maiali (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

Per *F. culmorum* sono stati individuati due chemiotipi, cioè profili metabolici dei tricoteceni che sono ceppo-specifici: il tipo I produce DON o la forma acetilata 3-ADON; il tipo II produce NIV (nivalenolo), considerata circa dieci volte più tossica rispetto a DON (Minervini *et al.*, 2004).

Gli agenti causali della FDS e del mal del piede spesso coincidono, per cui dove vi è incidenza di fusariosi della spiga è plausibile anche l'insorgenza del mal del piede, a causa della permanenza nel terreno di clamidospore (Dyer *et al.*, 2009). Questi patogeni

esigono determinate condizioni ambientali che, in parte, spiegano la diversa distribuzione (Osborne e Stein, 2007); in particolare *F. culmorum* predilige regioni fredde come Inghilterra, Europa del Nord e Canada (Desjardin, 2006), mentre l'optimum di temperatura di crescita varia dai 15°C ai 20°C (Parry *et al.*, 1994; Pettitt *et al.*, 1996).

I principali fattori che influenzano lo sviluppo della FDS sono correlati alle rotazioni colturali, allo sviluppo saprofitico di residui di patogeni come ascospore e frammenti ifali che costituiscono un'importante fonte di inoculo primario (Goswami e Kistler, 2004) e alle condizioni ambientali che giocano un ruolo importante nella diffusione dell'inoculo e quindi nell'infezione delle piante - ospite. Gli stessi fattori possono determinare anche l'insorgenza del mal del piede.

Il mal del piede risulta più grave quando il frumento cresce in aree temperate ed è più soggetto allo stress idrico (Bateman, 1993), la FDS, invece, si manifesta prevalentemente quando il fungo è presente nel terreno e le condizioni ambientali sono caratterizzate da umidità e frequenti piogge (Bateman, 2005).

Una volta che l'inoculo ha raggiunto l'ospite, necessita di almeno 24 ore di umidità e temperature intorno i 25°C per generare l'infezione (Doohan *et al.*, 2003; Parry *et al.*, 1995). Tra tutte le specie che causano FDS, *F. culmorum* è meno legato ad esigenze climatiche per l'infezione della pianta - ospite (Klix *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2001).

Strategie volte alla prevenzione delle patologie causate da *Fusarium* su frumento riguardano la riduzione delle successioni colturali, l'ottimizzazione delle tecniche di gestione del suolo e l'uso di varietà con bassa suscettibilità (Edwards, 2004).

Vista l'importanza di *F. culmorum* quale agente patogeno del frumento che causa fusariosi della spiga e mal del piede, anche per questa specie, come per *F. poae* (Capitolo II), si è voluto valutare l'aggressività di isolati fungini di *F. culmorum* tramite applicazione del saggio *in vitro* Petri-dish.

L'aggressività è un parametro importante, che permette di capire i meccanismi dell'interazione tra patogeno e organismo ospite nel sistema *Fusarium*/FDS - frumento duro (Wu *et al.*, 2005).

In letteratura esistono diversi metodi sviluppati per valutare la patogenicità e l'aggressività di un patogeno verso un determinato organismo - ospite, che riguardano principalmente esperimenti in campo affiancati a prove in ambiente a temperatura controllata, dove però si utilizzano delle miscele di isolati fungini della stessa specie. In queste condizioni la miscela potrebbe mascherare le differenze tra gli isolati fungini, sia

per quanto riguarda lo sviluppo della malattia sia per l'abilità di produrre micotossine (Vogelgsang *et al.*, 2008), per cui diversi isolati della stessa specie di *Fusarium* si differenziano per la quantità e il tipo di micotossine prodotte (Vogelgsang *et al.*, 2008). Proprio questa differenziazione permette di suddividere gli isolati per chemiotipi; questo è stato osservato, come detto in precedenza per *F. culmorum*, anche per *F. graminearum* (Purahong *et al.*, 2014), così come per altre specie correlate (Ward *et al.*, 2002).

Metodi alternativi per valutare l'aggressività di un patogeno fungino comprendono inoculi nei tessuti florali, radici, foglie e giovani piante (Imathiu *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2001; Hare *et al.*, 1999; Snijders 1990), ma sono laboriosi e richiedono tempistiche di analisi lunghe, nonchè sono fortemente influenzati dallo stadio di crescita della pianta, che può essere più o meno suscettibile al patogeno, e dalla variabilità delle condizioni climatiche (Wu *et al.*, 2005).

Riguardo *F. culmorum* non esistono ad oggi in letteratura studi per questo scopo, e per tale motivo l'obiettivo di questo lavoro è stato di analizzare una collezione di ceppi di *F. culmorum* provenienti da diverse zone italiane per determinarne l'aggressività *in vitro* tramite l'applicazione del Petri-dish test adattata al sistema *F. culmorum* – frumento duro. L'applicazione del saggio Petri-dish è basata sia sul lavoro di Purahong *et al.* (2012), sviluppato per *F. graminearum*, che sul lavoro svolto in questa ricerca per *F. poae* (Capitolo II).

In questo modo è stato possibile valutare la flessibilità del saggio *in vitro* Petri-dish per misurare: i parametri AUHPC, AUDPC standard, Clr, coleoptile length reduction e Gr, germination rate reduction, che combinati insieme vanno a generare un indice numerico riferito all'aggressività da attribuire a ciascun ceppo considerato.

## **MATERIALI E METODI**

### **Ceppi fungini di *F. culmorum***

Dodici ceppi di *F. culmorum* sono stati utilizzati nella valutazione dell'aggressività; i ceppi sono stati isolati da cariossidi di frumento duro di diverse cultivar in due regioni italiane (Emilia-Romagna e Toscana) già presenti nella collezione del Laboratorio di Micologia Fitopatologica del DipSA e caratterizzati sia molecularmente, che per i chemiotipi (3-ADON) (Tabella 3.1).

## **Produzione di conidi**

I ceppi di *F. culmorum* sono stati fatti crescere su piastre Petri contenenti come substrato PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, U.S.A.) e incubate a 25°C (Figura 3.1). Per ciascun ceppo è stata preparata una beuta di vetro contenente come mezzo di crescita 150 mL di terreno V8 (succo di pomodoro, Campbell foods, Belgio), preparato miscelando 1 litro di succo V8 con 5 g di carbonato di calcio, centrifugando a 4000 giri al minuto per 20 minuti; la fase liquida è stata in seguito suddivisa in diversi contenitori, diluita 1:4 con acqua distillata e infine sterilizzata in autoclave. Per la produzione dei macroconidi, alle beute contenenti V8 sono stati aggiunti 3 plugs di micelio estratti dalle piastre sopra descritte, con un “cork borer” di 5 mm di diametro, sterilizzato dopo l’uso per ciascun ceppo fungino. Le beute sono state poste su uno shaker ad agitazione orizzontale e temperatura controllata a 25°C, 120 giri al minuto per 2 settimane sotto luce solare incidente (MaxQ 4000, Thermo Fisher) (Figura 3.2). La miscela di microconidi, micelio e terreno V8 è stata successivamente filtrata con una siringa sterilizzata contenente un doppio strato di garza sterile. La sospensione liquida ottenuta, priva di micelio, è stata conservata in frigo a 4°C; prima di procedere all’inoculazione per il saggio Petri-dish, la concentrazione della sospensione è stata aggiustata a 10<sup>6</sup> conidi/mL, previa misurazione con cella Thoma al microscopio ottico (Labor lux 12, Leitz Wetzlar, Germania).

## **Set-up del saggio *in vitro* Petri-dish test**

Tutti e 12 i ceppi fungini *F. culmorum* sono stati esaminati dal saggio *in vitro* Petri-dish, per valutarne l’aggressività. Il test deriva da una modificazione dell’originale pubblicato da Mesterhazy (1978, 1984, 2002) e successivamente applicato a *F. graminearum* da Purahong *et al.* (2012).

Le cariossidi di frumento duro appartenenti alla cultivar Simeto, sensibile alla Fusariosi della spiga, sono state sterilizzate in una soluzione al 2% di ipoclorito di sodio (NaClO) per cinque minuti e risciacquate con acqua deionizzata per cinque - sei volte, finché l’odore di ipoclorito di sodio non si era completamente dissolto.

Per ciascun ceppo fungino, 10 mL di sospensione conidica filtrata e aggiustata alla concentrazione 10<sup>6</sup> conidi/mL o acqua demineralizzata e sterilizzata per il controllo negativo, sono stati distribuiti su un doppio strato di carta da filtro contenuto in piastre Petri di vetro, di diametro 15 cm, e precedentemente sterilizzate in autoclave. Eventuali

bolle d'aria tra gli strati di carta da filtro sono state eliminate da un'ansa di vetro sterilizzata. In seguito, 25 sementi sterilizzate come descritto sopra sono state collocate nella piastra, facendo attenzione a posizionarle con l'embrione rivolto verso l'alto. Per garantire un costante grado di umidità relativa e scarsa circolazione dell'aria, le piastre sono state inserite in sacchetti di plastica contenenti un batuffolo di cotone bagnato; sono quindi state messe in incubatore al buio a 22°C Per ciascun ceppo fungino l'esperimento è stato allestito in doppio. I semi germinati sono stati contati dopo 48 ore dall'inoculazione e a questo valore viene attribuito il 100% di semi sani. I successivi rilievi con conta di semi germinati, sono stati fatti giornalmente dal giorno 3 al giorno 6 (Figura 3.3); nell'ultimo giorno di rilievo è stata eseguita anche la misurazione della lunghezza del coleottilo nei semi germinati. I semi considerati infetti da *F. culmorum* che mostravano zone discolorate di colore scuro, dovute a necrosi e presenza di micelio attorno ad essi, venivano scartati dal conteggio, mentre è stata calcolata la percentuale dei rimanenti semi non infetti, interpolata in funzione del tempo e l'area che sottende la curva è stata calcolata dalla formula (1), AUHPC, Area Under Healthy Progress Curve, che varia tra 50 (aggressivo) e 400 (non aggressivo). Questo parametro è stato trasformato in AUDPC standard descritto in formula (2), ovvero Area Under Disease Progress Curve (Koutnik e Lemmens 2007), che varia tra 0 (non aggressivo) e 1 (aggressivo). Le formule (3) e (4) Clr, coleoptile length reduction e Gr, germination rate reduction si riferiscono rispettivamente alla riduzione della lunghezza del coleottilo nei semi germinati, e al numero di semi germinati, i cui conteggi sono stati effettuati l'ultimo giorno di rilievo.

Il valore medio dei parametri descritti dalle formule 2, 3 e 4 ha permesso di individuare un indice di aggressività per ciascun ceppo fungino, calcolato come indicato nella formula (5).

$$(1) AUHPC = \frac{B1+2*B2+2*B3+2*B4+B5}{2}$$

(B1 – B5: percentuale di semi non infetti dal secondo al sesto giorno di rilievo; B1 è settato 100%)

$$(2) AUDPC_{stand} = \frac{400 - AUHPC}{350}$$

$$(3) Clr = \frac{\overline{Clc} - \overline{Clt}}{\overline{Clc}}$$

(Clc e Clt rappresentano la lunghezza del coleottilo nel controllo e nei campioni inoculati, rispettivamente)

$$(4) Gr = \frac{NGc - NGt}{NGc}$$

(NGc e NGt rappresentano il numero di semi germinati nel controllo e nei campioni inoculati, rispettivamente)

$$(5) APindex = \frac{AUDPC_{stand} + \bar{Gr} + \bar{Clr}}{3}$$

Il reisolamento di ceppi *F. culmorum* dalle lesioni necrotiche localizzate nel coleottilo ha soddisfatto i postulati di Koch tramite analisi morfologica del micelio cresciuto su piastre Petri contenenti PDA.

### **Analisi statistica**

Tutti i dati grezzi ottenuti dai rilievi effettuati sulle ripetizioni di ciascun ceppo di *F. culmorum* sono stati normalizzati a 1/Y ed è stata verificata l'omogeneità della varianza tra le ripetizioni di uno stesso ceppo e la distribuzione di probabilità normale, che descrive come dei valori reali di variabili casuali tendano a concentrarsi attorno ad un valore medio, prima di procedere con l'analisi statistica. E' stato utilizzato il software Statgraphic plus - Statistical Graphic Corporation, che ha permesso di comparare tramite analisi ANOVA con test Duncan i dati sulle percentuali di semi germinati e sulla lunghezza del coleottilo, parametri che hanno permesso di individuare l'indice Ap Index che riassume globalmente l'aggressività dei ceppi analizzati.

L'analisi statistica per la comparazione multipla tra i ceppi è stata eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22) con analisi di varianza ad una via incorporando il test post hoc LSD al 5% di livello di significatività per differenziare i ceppi *F. culmorum*.

La correlazione tra i parametri di aggressività dei replicati è stata determinata dal coefficiente di correlazione di Pearson al livello di significatività del 5%.

## **RISULTATI**

### **Aggressività dei ceppi di *F. culmorum***

La patogenicità dei dodici ceppi fungini *F. culmorum* è stata confermata dal rilevamento dei tipici sintomi della FDS, cioè discolorazione delle sementi, lesioni necrotiche e presenza di micelio sul seme; la buona riuscita del test è stata dimostrata dal non rilevamento di sintomi nel controllo negativo.

La temperatura di incubazione delle piastre contenenti le sementi inoculate è stata 22°C, in quanto era già stata valutata sia nel lavoro di Purahong *et al.* (2012), sia nell'applicazione del Petri-dish test ad isolati fungini di *F. poae* (Capitolo II).

L'analisi dell'aggressività dei ceppi ha mostrato che il ceppo F 11 era il più aggressivo in tutti i parametri considerati; nel complesso tutti i ceppi sono risultati essere aggressivi; pur non differenziandosi statisticamente tra di loro, si sono invece differenziati statisticamente dal controllo negativo (Tabella 3.2). Tutti gli indici relativi al controllo negativo sono 400 per AUHPC e 0 per tutti gli altri indici valutati per la misurazione dell'indice di aggressività.

E' stato possibile individuare un andamento dell'aggressività dei ceppi *F. culmorum* nei giorni di rilievi (Figura 3.4), infatti già dal terzo giorno di rilievo (dopo 72 ore dall'inoculo) è stata osservata una riduzione molto evidente della percentuale di semi non infetti. Ciò dimostra che i ceppi utilizzati per il saggio erano tutti altamente aggressivi.

Il range di valori di AUHPC è molto ristretto, tra 76 per il ceppo F 9 e 55 per il ceppo F 11, con rispettivi valori di AUDPC standard di 0.92 e 0.99 (Tabella 3.2).

La riduzione del tasso di germinazione variava tra 26% e 43% mentre la riduzione della lunghezza del coleotile tra 53% e 92% (Tabella 3.2).

I dati ottenuti dai valori calcolati di AUDPC standard e Clr, coleoptile length reduction, sono stati ottenuti dallo stesso organo della pianta, cioè dal coleotile. L'analisi statistica ha mostrato che tra i due parametri intercorre una forte significatività e correlazione positiva ( $r = 0.87$ ;  $p < 0.01$ ), mentre una correlazione più moderata è stata ottenuta per Gr, germination rate reduction, con AUDPC standard ( $r = 0.73$ ;  $p < 0.01$ ), e con Clr ( $r = 0.65$ ;  $p < 0.01$ ) (Tabelle 3.3 – 3.4 – 3.5 rispettivamente).

L'indice di aggressività, poiché deriva da una media dei tre parametri sopracitati, è correlato positivamente con essi ( $r = 0.96$  per AUDPC standard,  $r = 0.95$  per Clr,  $r = 0.81$  per Gr;  $p < 0.01$ ) (Tabelle 3.6 – 3.7 – 3.8 rispettivamente).

## **DISCUSSIONE**

Questo lavoro è stato condotto per valutare l'affidabilità del saggio *in vitro* Petri-dish e per quantificare i livelli di aggressività di ceppi di *F. culmorum*, tenendo in considerazione che la prima applicazione di questo test è stata effettuata e validata su *F. graminearum* da Purahong *et al.* (2012).

L'aggressività dei ceppi è stata valutata e quantificata grazie a tre parametri: AUDPC standard, che rappresenta la standardizzazione della riduzione della percentuale di semi sani a seguito ad inoculazione, Clr, coleoptile length reduction e Gr, germination rate reduction, rispetto al controllo negativo. L'insieme di questi parametri ha permesso di individuare un indice di aggressività specifico per ciascun ceppo per una determinata cultivar.

Tutti i dodici ceppi di *F. culmorum* si sono mostrati patogeni; complessivamente il valore di aggressività non si discostava in maniera significativa tra i ceppi, invece molto più forte era la differenziazione statisticamente significativa tra i ceppi e il controllo negativo.

I vantaggi di un saggio di inoculazione *in vitro* sono molteplici: tutti gli esperimenti sono condotti controllando temperature di crescita e incubazione e possono essere quindi ottimizzate per ciascuna specie fungina; le condizioni ambientali, in particolare temperatura, umidità e disponibilità d'acqua, non rappresentano variabili significative per l'inoculazione, quindi l'incidenza e la gravità di malattia sono influenzate dai patogeni inoculati. Un altro aspetto positivo di un saggio *in vitro* è che può essere evitata la cross-contaminazione con altre specie o generi fungini, cosa che invece non è possibile escludere in una prova condotta in campo aperto e che può rappresentare un incremento della gravità della malattia oppure una competizione tra diverse specie per i nutrienti (Xu *et al.*, 2007; Xu e Nicholson, 2009).

La maggior parte dei metodi di inoculazione artificiale per FDS prevede che l'inoculo sia fatto all'antesi, che rappresenta il momento di massima suscettibilità della pianta all'infezione (Pugh *et al.*, 1933; Andersen, 1948; Strange e Smith, 1971; Sutton, 1982), per cui il tempo impiegato globalmente dall'allestimento di una prova all'analisi dei dati è molto più lungo, in quanto regolato dagli stadi fenologici della pianta.

L'inoculazione a livello del coleotile promuove l'interazione tra i tessuti della pianta di frumento e il patogeno fungino (Wu *et al.*, 2005) e quando si manifestano i tipici sintomi di imbianchimento o necrosi è perché le cellule ifali di *Fusarium* spp. hanno invaso questo tessuto. Studi su infezioni a livello del coleotile causati da *F. graminearum* sono stati condotti anche da Zang *et al.* (2012), a livello genetico, in cui attraverso inoculazione spray di sospensione fungina, hanno monitorato l'avanzamento del fungo, visibile a partire da 16 ore dall'inoculazione. Hanno inoltre identificato un gene necessario alla sporulazione del fungo e il suo silenziamento riduce di circa un terzo la dimensione della zona necrotica nel coleotile.

La riduzione del tasso di crescita del coleotile è un tipo di misurazione che Brennan *et al.* (2003) hanno considerato nello studio *in vitro* sulla patogenicità di diversi ceppi di *Fusarium*. Questo metodo rende difficoltosa la valutazione dell'aggressività in quanto il micelio, utilizzato come fonte di inoculo, va a ricoprire tutti i coleottili.

Il saggio Petri-dish sviluppato per *F. graminearum* da Purahong *et al.* (2012) ha dimostrato, invece, una buona correlazione tra la riduzione del tasso di germinazione e lunghezza del coleotile; questo è in accordo con i dati ottenuti in questo lavoro di tesi.

L'indice di aggressività, che comprende la media dei suddetti parametri, rappresenta quindi un buon indicatore del livello di aggressività di ceppi di *Fusarium*.

Il saggio Petri-dish presenta molti vantaggi, come: rapidità di esecuzione, infatti è possibile individuare i primi sintomi in circa sei giorni, a differenza di analoghe prove in serra o in campo aperto, che richiedono circa due mesi e mezzo; bassi costi per i materiali; possibilità di esecuzione della prova durante tutto l'anno e comparazione dell'aggressività di diversi isolati fungini. Tutti questi aspetti servono a contribuire alla caratterizzazione dei ceppi fungini e a poterli selezionare per esaminare meccanismi genetici di resistenza a livello molecolare e per inoculazioni artificiali in campo.

Questo è uno dei primi lavori in cui è stata messa a punto e applicata una prova di saggio *in vitro* per la valutazione dell'aggressività di ceppi *F. culmorum* nel sistema *Fc* – frumento duro.

## FIGURE E TABELLE

Tabella 3.1: Elenco dei ceppi di *F. culmorum* testate nel saggio Petri-dish.

Ceppi <i>F. culmorum</i>	Località
F 9	Grosseto, Toscana
F 10	Baricella (BO), Emilia-Romagna
F 11	Grosseto, Toscana
F 24	Grosseto, Toscana
F 25	Grosseto, Toscana
F 27	Grosseto, Toscana
F 28	Grosseto, Toscana
F 33	Grosseto, Toscana
F 35	Grosseto, Toscana
F 45	Grosseto, Toscana
F 93	Asciano (SI), Toscana
F 104	Braccagni (GR), Toscana



Figura 3.1: Colonia di *F. culmorum* cresciuta su PDA (Potato dextrose agar).



Figura 3.2: Ceppi di *F. culmorum* su substrato liquido V8 per la produzione di macroconidi, mantenuti in agitazione.



Figura 3.3: Sviluppo di micelio e sintomi su sementi di frumento cv. Simeto nel saggio “Petri-dish” (Purahong *et al.*, 2012) dopo inoculazione con un ceppo di *F. culmorum*.

Tabella 3.2: Valori medi dei parametri AUDPC standard, Clr (coleoptile length reduction), Gr (germination rate reduction) e indice di aggressività Ap index dal petri-dish test dopo inoculazione dei ceppi *F.culmorum*. Le lettere denotano che i ceppi si differenziano statisticamente ( $p < 0.05$ ) a seguito del post hoc test LSD eseguito con il software IBM SPSS Statistic.

Ceppi <i>F. culmorum</i>	AUHPC	AUDPC stand	Clr	Gr	Ap Index
F 11	55	0,99	0,92	0,43	0,78 b
F 27	61	0,97	0,83	0,26	0,68 b
F 10	64	0,96	0,85	0,33	0,72 b
F 45	58	0,98	0,87	0,32	0,72 b
F 104	67	0,95	0,53	0,34	0,61 b
F 33	72	0,94	0,81	0,43	0,73 b
F 35	61	0,97	0,87	0,32	0,72 b
F 93	67	0,95	0,84	0,36	0,71 b
F 25	63	0,96	0,83	0,28	0,69 b
F 24	63	0,96	0,88	0,35	0,73 b
F 28	72	0,94	0,83	0,40	0,72 b
F 9	76	0,92	0,79	0,38	0,70 b
Controllo Negativo	400	0,00	0,00	0,00	0,00 a

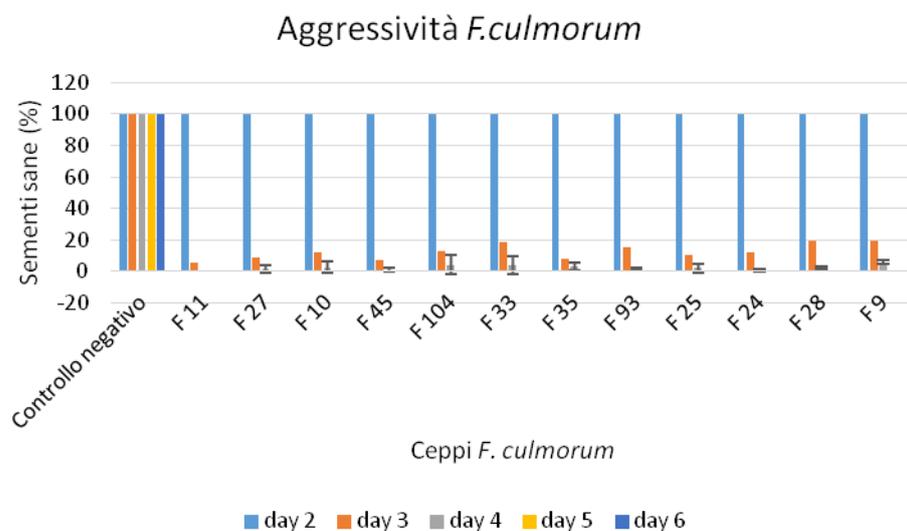


Figura 3.4: Andamento della valutazione dell'aggressività dei ceppi di *F. culmorum* testati nel saggio "Petri-dish" (Purahong *et al.*, 2012) in termini di percentuale di sementi sane, valutate dal secondo al sesto (ultimo) giorno di rilievi post inoculazione. I dati si riferiscono ai valori medi della percentuale di semi sani conteggiati per le ripetizioni di ciascun ceppo fungino.

Tabella 3.3: Correlazioni statistiche tra AUDPC standard e Clr per *F. culmorum*, analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		AUDPCstd	Clr_Fc
AUDPCstd	Correlazione di Pearson	1	0,865**
	Sign.		0,000
	N	26	26
Clr_Fc	Correlazione di Pearson	0,865**	1
	Sign.	0,000	
	N	26	26

Tabella 3.4: Correlazioni statistiche tra AUDPC standard e Gr per *F.culmorum*, analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		AUDPCstd	Gr_Fc
AUDPCstd	Correlazione di Pearson	1	0,734**
	Sign.		0,000
	N	26	26
Gr_Fc	Correlazione di Pearson	0,734**	1
	Sign.	0,000	
	N	26	26

Tabella 3.5: Correlazioni statistiche tra Clr e Gr per *F. culmorum*, analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		Clr_Fc	Gr_Fc
Clr_Fc	Correlazione di Pearson	1	0,651**
	Sign.		0,000
	N	26	26
Gr_Fc	Correlazione di Pearson	0,651**	1
	Sign.	0,000	
	N	26	26

Tabella 3.6: Correlazioni statistiche tra Ap index ed AUDPC standard per *F. culmorum*, analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		AUDPCstd	Ap_Index_Fc
AUDPCstd	Correlazione di Pearson	1	0,964**
	Sign.		0,000
	N	26	26
Ap_Index_Fc	Correlazione di Pearson	0,964**	1
	Sign.	0,000	
	N	26	26

Tabella 3.7: Correlazioni statistiche tra Ap index e Clr per *F. culmorum*, analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		Ap_Index_Fc	Clr_Fc
Ap_Index_Fc	Correlazione di Pearson	1	0,947**
	Sign.		0,000
	N	26	26
Clr_Fc	Correlazione di Pearson	0,947**	1
	Sign.	0,000	
	N	26	26

Tabella 3.8: Correlazioni statistiche tra Ap index e Gr per *F. culmorum*, analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		Ap_Index_Fc	Gr_Fc
Ap_Index_Fc	Correlazione di Pearson	1	0,810**
	Sign.		0,000
	N	26	26
Gr_Fc	Correlazione di Pearson	0,810**	1
	Sign.	0,000	
	N	26	26

## BIBLIOGRAFIA

- Andersen A. L.**, 1948. The development of *Gibberella zeae* headblight on wheat. *Phytopathology* 38: 595-611.
- Bai G.H., Desjardins A.E., Plattner R.D.**, 2001. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153: 91-98.
- Bateman G.L.**, 1993 Development of disease symptom and fungal pathogen on shoot bases in continuous winter wheat. *Plant Pathology* 42: 595-608.
- Bateman G.L.**, 2005. The contribution of ground-level inoculum of *Fusarium culmorum* to ear blight of winter wheat. *Plant Pathology* 54: 299-307.
- Beccari G., Covarelli L., Nicholson P.**, 2011. Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60: 671-684.
- Belli G., Casati P., Cortesi P., Faoro F., Iriti M., Saracchi M., Sardi P., Vercesi A.**, 2012. Elementi di Patologia Vegetale, seconda edizione. Ed. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova.
- Brennan J., Fagan B., van Maanen A., Cooke B., Doohan F.**, 2003. Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* 109: 577-587.
- Desjardin A.E.**, 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology. ASP Press, St. Paul, MN.
- D'Mello, J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C.**, 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science & Technology* 80: 183-205.
- Doohan F.M., Brennan J.M., Cooke B.M.**, 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*

109: 755-768.

- Dyer A.T., Johnston R.H., Hogg A.C., Johnston J.A.,** 2009. Comparison of pathogenicity of the *Fusarium* crown rot complex (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*) on hard red spring and durum wheat. *European Journal of Plant Pathology* 125: 387-395.
- Edwards S.G.,** 2004. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology letters* 153: 29-35.
- 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.
- Goswami R.S., Kistler H.C.,** 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 515-525.
- Hare M.C., Parry D.W., Baker M.D.,** 1999. The relationship between wheat seed weight, infection by *Fusarium culmorum* or *Microdochium nivale*, germination and seedling disease. *European Journal of Plant Pathology* 105: 859-866.
- Imathiu S.M., Ray R.V., Back M., Hare M.C., Edwards S.G.,** 2009. *Fusarium langsethiae* pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded *in vitro* detached leaf assays. *European Journal of Plant Pathology* 124: 117-126.
- Joffe A.,** 1978. *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as principal causes of alimentary toxic aleukia. In: Wyllie TD, Morehouse LG, Eds. *Handbook of mycotoxins and mycotoxicoses*, New York: Marcel Dekker, Vol. 3: 21-86.
- Kimura M., Kaneko I., Komiyama M.,** 1998. Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101. *Journal of Biological*

*Chemistry* 273 (3): 1654-1661.

- Klix M.B., Beyer B., Verreet J.A.,** 2008. Effects of cultivar, agronomic practices, geographic location, and meteorological conditions on the composition of selected *Fusarium* species on wheat heads. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30: 46-57.
- Koutnik A., Lemmens M.,** 2007. Petri-dish infection method for aggressiveness test (in German). Standard operating protocol University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna. pp. 8.
- Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Watanabe H.,** 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7: 253-259.
- Mesterhazy A.,** 1978. Comparative analysis of artificial inoculation methods with *Fusarium* spp. on winter wheat varieties. *Phytopathology Z.* 93: 12-25.
- Mesterhazy A.,** 1984. A laboratory method to predict pathogenicity of *Fusarium graminearum* in field and resistance of wheat to scab. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 19 (3-4): 205-218.
- 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.
- Minervini, F., Fornelli, F., Flynn, K.M.,** 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro* 18: 21-28.
- Osborne L.E., Stein J.M.,** 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119: 103-108.
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L.,** 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grains - a review. *Plant Pathology* 44: 207-238.

- Parry D.W., Pettitt T.R., Jenkinson P., Lees A.K.,** 1994. The cereal *Fusarium* complex. In: Blakeman P. and Williamson B. (eds) *Ecology of Plant Pathogens* CAB International, Wallingford, UK: 301-320.
- Pettitt T.R., Parry D.W.,** 1996. Effect of climate change on *Fusarium* foot rot of winter wheat in the United Kingdom. In: Frankland J.C., Mangan N. and Gadd G.M. (eds) *Fungal and Environmental Change* Cambridge University Press: 21-31.
- Pugh G.W., Johann H., Dickson J.G.,** 1933. Factors affecting infection on wheat heads of *Gibberella saubinetii*. *Journal of Agricultural Research* 46: 771-97.
- Purahong W., Alkadri D., Nipoti P., Pisi A., Lemmens M., Prodi A.,** 2012. Validation of a modified Petri dish test to quantify aggressiveness of *Fusarium graminearum* in durum wheat. *European Journal of Plant Pathology* 132: 381-391.
- Purahong W., Nipoti P., Pisi A., Lemmens M., Prodi A.,** 2014. Aggressiveness of different *Fusarium graminearum* chemotypes within a population from Northern-Central Italy. *Mycoscience* 55: 69-69.
- Rossi V., Ravanetti A., Pattor E., Giosuè 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.
- Scherm B., Balmas V., Spanu F., Pani G., Delogu G., Pasquali M., Migheli Q.,** 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology* 14 (4): 323-341.
- Snijders C.H.A.,** 1990. Systemic fungal growth of *Fusarium culmorum* in stems of winter wheat. *Journal of Phytopathology* 129: 133-140.
- Strange R.N., Smith H.,** 1971. A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiological Plant Pathology* 1:

141-50.

- Sutton J.C.**, 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195-209.
- Vesonder R.F, Ceigler A., Jensen A.H.**, 1973. Isolation of the emetic principle from *Fusarium graminearum*-infected corn. *Applied Microbiology* 26:1008-1010.
- Vogelgsang S., Sulyok M., Hecker A., Jenny E., Krska R. Schuhmacher R., Forrer H-R.**, 2008. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology* 122: 265-276.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 99: 9278-9283.
- Wu A., Li H., Zhao C., Liao Y.**, 2005. Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* from China revealed by wheat coleoptiles and floret inoculations. *Mycopathologia* 160: 75-83.
- Xu X., Monger W., Ritieni A., Nicholson P.**, 2007. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combination of, *Fusarium* species. *Plant Pathology* 56: 943-956.
- Xu X., Nicholson P.**, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* 47: 83-103.
- Zhang X.W., Jia L.J., Zhang Y., Jiang G., Li X., Zhang D., Tanga W.H.**, 2012. In planta stage-specific fungal gene profiling elucidates the molecular strategies of *Fusarium graminearum* growing inside wheat coleoptiles. *The Plant Cell* 24: 5159-5176.

## **CAPITOLO IV**

### **VALUTAZIONE DELLA PATOGENICITA' DI CEPPI DI *FUSARIUM POAE* ATTRAVERSO INOCULAZIONE ARTIFICIALE IN SERRA DI PIANTE DI FRUMENTO DURO E QUANTIFICAZIONE DELLA BIOMASSA TRAMITE REAL TIME PCR**

## ABSTRACT

*Fusarium poae* è un importante agente patogeno che causa la Fusariosi della spiga (FDS) in Italia e nel mondo; la malattia influisce negativamente sulla produzione di frumento e affini in quanto comporta riduzione della qualità e germinabilità delle sementi, che possono a loro volta essere contaminate da micotossine.

La patogenicità e l'aggressività dei ceppi di *F. poae* sono degli indici - l'uno qualitativo, l'altro quantitativo - che contribuiscono a chiarire il ruolo e soprattutto l'interazione tra patogeno e organismo ospite.

Sono stati utilizzati quattordici ceppi di *F. poae* per studiare la loro abilità nel causare sintomi su piante di frumento duro (cv. Simeto) tramite inoculazione in serra, valutando sia quali fossero le diverse fasi di crescita della pianta più vantaggiose per la colonizzazione del fungo, che le diverse concentrazioni di inoculo, per avere maggiori informazioni sulle condizioni migliori di sviluppo del fungo; tutto ciò può contribuire a chiarire il ruolo di *F. poae* nel causare la malattia.

La fase di antesi si è dimostrata essere la più critica per questo tipo di inoculazione; infatti, nonostante lo scarso livello visivo di infezione, la biomassa fungina quantificata era significativamente maggiore, per alcuni ceppi, rispetto l'inoculazione avvenuta nella fase di pre - antesi. Correlazioni significative ( $p < 0.01$ ) hanno dimostrato quanto fosse critica la concentrazione dell'inoculo in fase di antesi, infatti concentrazioni elevate ( $10^6$  conidi/mL) sono associate positivamente con i livelli di biomassa quantificata.

L'inoculazione artificiale in serra è un procedimento necessario oltre che per visualizzare i sintomi, anche per studiare il potenziale patogeno e l'aggressività di singoli ceppi fungini, dal momento che è possibile tenere controllati vari fattori (come temperatura e umidità) ed escludere la competizione con altre specie di *Fusarium*. Tutto ciò non sarebbe possibile in una situazione di inoculazione artificiale in pieno campo.

In aggiunta, per poter quantificare l'effettiva presenza del fungo, è stato sviluppato un protocollo di Real Time PCR *ad hoc* per *F. poae*, con chimica SYBR<sup>®</sup> Green I, che presenta molti vantaggi tra cui l'adattabilità per lo screening di un elevato numero di campioni, mantenendo allo stesso tempo costi di analisi contenuti. In questo lavoro la tecnica di Real time PCR è stata applicata come saggio molecolare per identificare e allo stesso tempo quantificare la biomassa fungina anche in spighe asintomatiche.

## INTRODUZIONE

La Fusariosi della spiga (FDS) è una fitopatia fungina che colpisce le colture cerealicole come frumento, orzo, segale, avena, mais, riso ed è causata da specie del genere *Fusarium*. Le spighe affette da FDS appaiono prematuramente discolorate e imbianchite, solo in parte, o l'intera spiga (Parry *et al.*, 1995; Goswami e Kistler, 2004; Stein *et al.*, 2009; Scherm *et al.*, 2013). Questo è il sintomo principale che è facilmente individuabile, ma vi sono altri sintomi "secondari" che riguardano la comparsa di lesioni necrotiche sulle glume che rivestono il seme (Doohan *et al.*, 1998; Vogelgsang *et al.*, 2008b; Alberti *et al.*, 2011). Queste ultime sono i tipici sintomi causati da *Fusarium poae* (Peck) Wollenweber. Il frequente isolamento di questo patogeno in diverse zone d'Italia e del mondo (Xu *et al.*, 2005; Vogelgsang *et al.*, 2008a; Audenaert *et al.*, 2009; Stenglein, 2009, Pancaldi *et al.*, 2010) ha contribuito ad incrementare la sua importanza nella fitopatia.

Oltre ai gravi danni per il raccolto e la produzione dei prodotti ricavati dal frumento, l'infezione causata da *Fusarium* porta alla contaminazione da una vasta gamma di micotossine (Vogelgsang *et al.*, 2008b; Audenaert *et al.*, 2009) che rappresentano una minaccia per la sicurezza alimentare dell'uomo e degli animali (Joffe, 1978; D'Mello *et al.*, 1999; Bennet e Klich 2003).

*F. poae* è in grado di produrre micotossine che rientrano nella categoria dei tricoteceni di tipo A (DAS, diacetossiscipernolo; MAS, monoacetossiscipernolo; T-2, HT-2, NEO, neosolaniolo) e B (NIV, nivalenolo e FUS-X, fusarenone X), e anche micotossine "emergenti" come beauvericina ed enniatine (Thrane *et al.*, 2004; Uligh *et al.*, 2006). La comunità scientifica anche per questo motivo sta riconoscendo l'importanza di *F. poae* quale agente patogeno della FDS (Shah *et al.*, 2005; Vogelgsang *et al.*, 2008a; Stenglein, 2009; Dinolfo *et al.*, 2010; Pancaldi *et al.*, 2010).

Spesso i rilievi visivi su spighe di frumento non bastano ad individuare la presenza di una determinata specie fungina, poichè le spighe possono apparire asintomatiche anche se in realtà hanno subito l'infezione del patogeno. L'identificazione di un patogeno fungino del genere *Fusarium* basata sulla morfologia del micelio e delle strutture quali macro e/o microconidi, richiede ottime conoscenze a livello tassonomico (Jurado *et al.*, 2005; Pancaldi *et al.*, 2010; Kuzdraliński *et al.*, 2014). Per questo motivo la tecnica molecolare PCR (Polymerase chain reaction) è una delle più utilizzate per una rapida e affidabile identificazione delle specie di *Fusarium* (Sarlin *et al.*, 2006). Più recentemente è stata sviluppata la tecnica di Real Time PCR, che permette non solo di

identificare molecularmente una specie fungina, ma allo stesso tempo di quantificarne la biomassa.

Gli obiettivi di questo lavoro sono stati: (i) studiare la patogenicità di ceppi di *F. poae* e confermarne l'aggressività precedentemente valutata dal saggio *in vitro* Petri-dish (Capitolo II), allestendo una prova di inoculazione artificiale in ambiente controllato; (ii) sviluppare un protocollo di Real Time PCR specifico per *F. poae* necessario per valutare il livello di infezione causato dal fungo, anche in spighe asintomatiche e quantificarne la biomassa.

## **MATERIALI E METODI**

### **Ceppi fungini *F. poae***

Quattordici ceppi di *F. poae* provenienti da isolamenti di cariossidi di frumento duro da diverse parti d'Italia (Emilia-Romagna, Toscana, Marche, Veneto, Puglia e Molise) e diverse cultivar, presenti nella collezione del Laboratorio di Micologia Fitopatologica del Dip.S.A. e caratterizzati sia dal punto di vista molecolare, che dal profilo tossigenico (Tabella 4.1), sono stati usati per l'analisi *in vivo* su piante di frumento duro, cultivar Simeto, in ambiente controllato. In particolare per la prova in serra sono stati presi in considerazione tutti i ceppi saggiati per aggressività con il Petri-dish test, ad esclusione del ceppo F 556, (vedi Capitolo II) in aggiunta ad altri ceppi *F. poae* (Tabella 4.1).

### **Produzione di conidi**

Ciascun ceppo di *F. poae* è stato fatto crescere su piastre Petri, contenenti come terreno di coltura PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, U.S.A.), e incubato a 25°C in termostato per una settimana con fotoperiodo 12h luce/12h buio (Figura 4.1). Il settimo giorno si è proceduto a preparare l'inoculo: 1 mL di acqua demineralizzata e sterilizzata è stato distribuito su ogni piastra Petri e di questo surnatante 0.3 mL sono stati distribuiti su una nuova piastra Petri contenente sempre PDA. Le piastre sono state incubate come precedentemente descritto. La sospensione conidica è stata ottenuta lavando ogni piastra con 15 mL di acqua demineralizzata e sterilizzata; la concentrazione conidica è stata portata a  $10^5$  e  $10^6$  conidi/mL per ciascun ceppo, diluendo il surnatante in Falcon da 50 mL sterili, sempre con acqua demineralizzata e sterile, previa misurazione con cella Thoma al microscopio ottico (Labor lux 12, Leitz Wetzlar, Germania); infine l'inoculo è

stato conservato a 4°C e prima di procedere all'inoculazione in serra su piante di frumento duro la concentrazione è stata nuovamente controllata.

### **Processo di inoculazione in serra**

Seicento semi di frumento duro della cultivar Simeto, sensibile alla FDS, sono stati trattati attraverso un processo di pre - germinazione in camera umida: i semi sono stati prima sterilizzati in una soluzione al 2% di ipoclorito di sodio (NaClO) per cinque minuti e risciacquati con acqua demineralizzata finché l'odore di ipoclorito di sodio era completamente dissolto. Successivamente, 30 semi sono stati posizionati su ciascuna piastra Petri di vetro del diametro di 15 cm contenente un doppio strato di carta da filtro imbevuta di acqua demineralizzata e sterilizzata e incubati a 4°C per due giorni e in seguito a 22°C per altri due giorni. Per mantenere un costante grado di umidità relativa e scarsa circolazione dell'aria, le piastre sono state inserite in sacchetti di plastica contenenti un batuffolo di cotone bagnato. Al termine del periodo di pre - inculo i semi non germinati sono stati scartati, mentre gli altri sono stati trapiantati in vasi a fondo circolare contenenti terreno sterilizzato e argilla, per evitare una fuoriuscita di terreno.

Dopo circa due mesi dal trapianto, quando le piante avevano raggiunto uno stadio di crescita (Zadoks' stage 59) appropriato, cioè una settimana prima della fase di antesi, è stato effettuato il primo trattamento di inoculazione (Figura 4.2): per ciascun ceppo, a ciascuna concentrazione conidica ( $10^5$  e  $10^6$  conidi/mL) sono state inoculate 8 piante tramite una spruzzata di sospensione conidica, con spruzzino manuale, per ciascuna spiga. Ogni spruzzata equivaleva ad un volume di 1 mL. Tra l'inoculazione di un ceppo e un altro, il dispositivo di spruzzo manuale veniva sterilizzato con ipoclorito di sodio (NaClO) e lavato con acqua demineralizzata sterile al fine di evitare contaminazione tra i ceppi. Al termine dell'inoculazione di ciascun ceppo, le spighe delle 8 piante corrispondenti sono state avvolte in un sacchetto in plastica per assicurare un certo grado di umidità, per 72 ore (Figura 4.3).

Lo stesso procedimento è stato eseguito sulle rimanenti spighe di frumento duro a distanza di una settimana dal precedente trattamento, ovvero quando le piante avevano raggiunto lo stadio di crescita di antesi (Zadoks 'stage 65).

Inizialmente la concentrazione per la prova di inoculazione era di  $2 \times 10^4$  conidi/mL e la fase a cui applicare il trattamento era quella di antesi, nota come il momento di massima suscettibilità della pianta. La prova però è stata eseguita dopo questa fase di crescita e

sulle piante di frumento duro non sono comparsi sintomi, per cui sia per questo motivo, che per il fatto che la concentrazione probabilmente non era adeguata, si è deciso di ripetere la prova in serra testando due diverse concentrazioni conidiche e applicandole in corrispondenza di due importanti fasi di crescita della pianta: pre - antesi e antesi.

Nonostante la mancanza di sintomi nella prima prova di inoculazione in serra, si è deciso di estrarre il DNA anche dalle spighe macinate e di quantificare, dove presente, la biomassa di *F. poae*, in quanto il ritrovamento di un possibile quantitativo di DNA avrebbe potuto comunque dare qualche indicazione sulla patogenicità dei ceppi fungini.

### **Estrazione del DNA di *Fusarium poae* con metodo CTAB**

Le spighe di frumento duro della cultivar Simeto raccolte dalla prova di inoculazione in serra sono state frantumate, macinate e ridotte in sfarinato. L'estrazione del DNA, è stata eseguita secondo la metodologia presentata nel protocollo “Upscaled CTAB-Based DNA Extraction” di Brandfass e Karlovsky (2008) lievemente modificata.

E' stato pesato 1g di sfarinato per ogni campione in tubi Falcon da 50 ml; come controllo è stata utilizzata della semola commerciale non contaminata da *Fusarium* o altre specie fungine.

Le soluzioni utilizzate per l'estrazione sono le seguenti:

#### Buffer CTAB:

EDTA	20 mM
Tris-HCl	10 mM
Sorbitolo	0.13 M
N-laurylsarcosine	0.03 M
CTAB	0.02 M
NaCl	0.8 M
Polivinilpolipirrolidone	1 %

#### Proteinasi K:

Soluzione stock 20 mg/mL diluita 1:10 in TE

#### Buffer TE:

TE 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0

Mercaptoetanololo

#### Altre soluzioni:

NaCl	5 M
EtOH	70 %
Cloroformio-isoamilalcool	24:1
PEG 6000 in acqua	30 %

L'estrazione del DNA è stata effettuata con il seguente procedimento:

Ai tubi Falcon, da 50 ml, contenenti 1g di sfarinato sono stati aggiunti 10 mL di Buffer CTAB, 20 µl di Mercaptoetanolo e 10 µl di Proteinasi K e mescolati; in seguito alcune sfere di metallo precedentemente sterilizzate in autoclave sono state inserite in ciascun tubo Falcon e agitati su vortex per omogeneizzare la soluzione; i tubi sono poi stati incubati a 42°C per 10 minuti e successivamente a 65°C per 10 minuti in un bagnetto termostatico; sono stati poi aggiunti 8 mL di una soluzione cloroformio-isoamilalcool (24:1) e mescolati accuratamente tramite agitazione manuale; sono stati quindi incubati in ghiaccio per 10 minuti e centrifugati a 4500 giri al minuto per 10 minuti. Nei tubi Eppendorf da 1.5 ml sono stati aggiunti 193.6 µl di PEG 30 %, 100 µl di NaCl e un'aliquota del surnatante (600 µl) e centrifugati a 14000 giri al minuto a temperatura ambiente per 15 minuti. Il surnatante poi è stato rimosso e 800 µl di etanolo 70 % sono stati aggiunti in ciascun tubo Eppendorf e si è proceduto alla centrifugazione alla massima velocità, per 5 minuti. E' stato eliminato l'etanolo e l'eccesso rimosso con una pompa sottovuoto. Il pellet, contenente il DNA, è stato risospeso in 200 µl di buffer TE, staccandolo gentilmente dal fondo del tubo con aggiunta di tampone; i campioni sono poi stati conservati a 4°C o/n e successivamente a -20°C. Tutto il procedimento è stato effettuato sotto cappa sterile.

### **Sviluppo di un protocollo di Real Time PCR per *Fusarium poae***

*F. poae* è uno dei principali agenti patogeni della FDS. La patogenicità e il ruolo di *F. poae* non sono stati ancora ben determinati, tuttavia l'aumento di frequenza di isolamento ritrovato fino ad oggi in Emilia Romagna, dal 9 % nel 1998 al 27 % nel 2007 (Pancaldi *et al.*, 2010), nonché la capacità di produrre micotossine, sono elementi che hanno indotto ad approfondire le conoscenze su questo patogeno.

Protocolli di Real Time PCR per la quantificazione del DNA di *Fusarium* spp. presenti in letteratura (Nicholson *et al.*, 1998 e 2003; Reischer *et al.*, 2004), si basano sulla tecnologia TaqMan, che però è costosa, e sui kit commerciali per l'estrazione del DNA.

Per tale motivo è stato sviluppato e messo a punto un nuovo protocollo di Real Time PCR, attraverso la chimica SYBR® Green I, adatto per l'analisi di un numero molto elevato di campioni e per la rilevazione e la quantificazione del DNA di *F. poae*. Con questa chimica si è eliminato il costo delle sonde per ibridazione doppiamente marcate.

Il protocollo di Real Time è stato sviluppato e ottimizzato su campioni derivati da una precedente prova di inoculazione nel campo sperimentale dell'Università di Bologna, in collaborazione con il Dipartimento di fitopatologia molecolare e unità di ricerca di micotossine dell'Università Georg-August di Göttingen, Germania. Il protocollo è stato inserito in un protocollo di multiplex qPCR applicato alle analisi descritte nell'articolo presentato in Appendice alla tesi.

SYBR® Green I è un colorante intercalante che si lega al solco minore del DNA a doppia elica in maniera aspecifica, per cui, per evitare cross-contaminazioni o falsi positivi, è estremamente importante utilizzare primer che siano specifici per una determinata specie fungina. La coppia di primer utilizzata sia nella fase di ottimizzazione che in quella di analisi è la seguente: Fp82 F ed Fp82 R (5'-CAAGCAAACAGGCTCTTCACC-3'/5'-TGTTCCACCTCAGTGACAGGTT-3') (Parry e Nicholson, 1996).

Inoltre, per verificare il segnale ottenuto, alla fine della fase di amplificazione si programma la curva di dissociazione (melting) che consiste in una rampa di temperatura che inizia al di sotto del punto di denaturazione dei prodotti di amplificazione e aumenta in maniera graduale fino ad oltrepassare la temperatura di denaturazione degli stessi. Questo viene fatto per distinguere i vari prodotti della reazione di PCR sulla base di questa temperatura di dissociazione, che dipende dalla lunghezza della sequenza amplificata e dal contenuto in C/G.

Prima di procedere alla messa a punto della metodica, il DNA di un ceppo noto di *F. poae* è stato quantificato allo spettrofotometro Nanodrop (Thermo Scientific) per poter preparare le diluizioni seriali da 500 pg a 0.5 pg di DNA nella matrice di estratto di sfarinato non contaminato, estratto come descritto nel paragrafo precedente.

Quando i risultati ottenuti dalla curva di calibrazione standard e dalla quantificazione di DNA noto di *F. poae* sono stati soddisfacenti, il protocollo di Real Time PCR è stato applicato ad altre specie di *Fusarium*, correlate e non correlate a *F. poae*, e ad altri generi fungini che possono essere presenti sulle spighe di frumento duro, per valutare l'efficienza del metodo ed escludere reazioni incrociate tra queste specie e *F. poae* (Tabella 4.2).

Nella Figura 4.4 è mostrato un esempio di un'analisi di Real Time PCR relativa alla rilevazione della curva di calibrazione generata a partire dalle diluizioni seriali di un campione di DNA di *F. poae* a concentrazione nota.

### **Quantificazione della biomassa di *Fusarium poae* attraverso la Real Time PCR con SYBR® Green I**

La valutazione dell'entità dell'infezione delle spighe di frumento duro da *Fusarium* è stata eseguita con un metodo indiretto che si basa sull'uso della tecnica molecolare di Real Time PCR (Abi Prism 7000, Applied Biosystem), utilizzando la chimica SYBR® Green I, molecola fluorescente che si intercala nella doppia elica di DNA, legandosi al solco minore di molecole di DNA a doppio filamento.

Per *F. poae* la miscela aveva la seguente composizione: 12.5 µl di Master Mix (2X), con 0.20 µM di reverse primer e 0.14 µM di forward primer e 5 µl di DNA fungino sono stati portati ad un volume finale di 25 µl con acqua sterile libera da nucleasi.

Le concentrazioni sbilanciate di primer di *F. poae* sono state ottimizzate nel corso dello sviluppo del protocollo.

La miscela è stata suddivisa in thermostrip, in cui i 5 µl di DNA di ciascun campione sono stati diluiti 1:10; i campioni sono sempre stati analizzati in doppio. Il limite di sensibilità della tecnica è di 0.5 pg di DNA fungino su g di sostanza secca, equivalente a 10 interi genomi così come definito da Brandfass e Karlovsky (2008) per la stessa chimica.

La quantificazione assoluta è stata fatta sulla base del valore di Ct (Cycle threshold, ciclo soglia) restituito dalla Real Time PCR, convertito in µg di DNA sostituendo la variabile nell'equazione della retta di calibrazione che si ottiene dalla correlazione lineare tra i valori del ciclo soglia e i valori del logaritmo naturale delle concentrazioni degli standard di DNA (Tabella 4.3). Il valore ottenuto viene moltiplicato per 6666 per riportare i valori di µg di DNA su g di sfarinato. Il Ct rappresenta il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della linea soglia, scelta arbitrariamente dall'operatore in modo tale da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale.

Per preparare le concentrazioni degli standard, il DNA di *F. poae* è stato quantificato allo spettrofotometro Nano Drop (Thermo Scientific) e diluito in maniera seriale, da 100 pg a 0.1 pg, nella matrice ottenuta dall'estratto di sfarinato di grano duro non

contaminato. Ciò viene fatto per ridurre la differenza derivante dalla matrice vegetale, che potrebbe portare a variazioni nella pendenza della retta di calibrazione (Figura 4.5). La qualità della curva di calibrazione è cruciale per la quantificazione assoluta della biomassa fungina.

Il profilo termico utilizzato è il seguente:

- 1 ciclo a 95°C per 10 minuti;
- 40 cicli a 95°C per 30 secondi, 64°C per 45 secondi;
- 1 ciclo a 55°C per 1 minuto.

Il rilevamento della fluorescenza dei prodotti di amplificazione è stato fatto nella fase di annealing.

Il controllo della specificità dell'amplificazione è avvenuto nell'analisi di dissociazione termica dei prodotti dell'amplificazione, eseguita al termine di ogni reazione, portando i prodotti a 95°C per 0.15 secondi, 60°C per 0.20 secondi e 95°C per 0.15 secondi, con letture ogni 0.3°C.

I dati ottenuti vengono esportati in fogli Excel per i successivi calcoli ed espressi come ng di DNA su g di sfarinato di frumento duro.

### **Analisi statistica**

Tutti i dati relativi alle ripetizioni della quantificazione della biomassa di *F. poae* sono stati sottoposti ad analisi statistica per verificare l'omogeneità della varianza e la distribuzione di probabilità normale; i dati non sono stati trasformati ma trattati tal quali tramite il software IBM SPSS Statistics (Versione 22). Nel caso di variabili che non si distribuiscono normalmente, è stato effettuato il test non parametrico Mann - Whitney U per verificare la significatività dei dati.

Le deviazioni standard riferite alla biomassa di *F. poae* sono state calcolate per ciascun trattamento tra i replicati tecnici, per monitorare possibili variazioni.

## **RISULTATI**

### **Rilievi e sintomi su spighe di frumento duro: inoculazione pre – antesi e antesi**

I primi rilievi dei sintomi sulle piante sono stati eseguiti dopo una settimana da ciascuna fase di inoculazione e per le settimane successive, fino a tre settimane (un rilievo ogni settimana) dalla data della prima fase di inoculazione (Tabella 4.4). Siccome *F. poae*

non causa i tipici sintomi della FDS, ovvero imbianchimento parziale o totale della spiga, ma piuttosto lesioni necrotiche più o meno ampie, non è stato possibile suddividere le spighe secondo una scala di gravità della malattia, come succede per altre specie di *Fusarium*, tra cui *F. graminearum* e *F. culmorum*, perciò i rilievi sulla spiga si riferiscono alla presenza o meno di lesioni necrotiche causate da *F. poae*.

Nel gruppo di piante della prima fase di inoculazione, cioè una settimana prima dello stadio di antesi, durante il primo rilievo, così anche nel rilievo effettuato la settimana successiva, solo il ceppo F 630 con concentrazione  $10^5$  conidi/mL ha mostrato i tipici sintomi di *F. poae* di lesioni necrotiche a livello della gluma (Figura 4.6). Solamente dopo 3 settimane dall'inoculazione i sintomi sono emersi anche su altre piante (Tabella 4.4).

I sintomi sono apparsi su piante inoculate dallo stesso ceppo, piuttosto che solo nei ceppi a concentrazione più alta, però non tutti i ceppi hanno provocato l'insorgenza di sintomi.

Nel gruppo di piante della seconda fase di inoculazione, cioè in corrispondenza dell'antesi, i sintomi sono iniziati a comparire solo dopo due settimane dall'inoculazione e solo nelle piante inoculate da tre ceppi (F 448, F 481 e E 578), a concentrazione più alta (Tabella 4.4).

Nessun sintomo è stato rilevato nel controllo negativo, inoculato solo con acqua demineralizzata e sterilizzata.

Un'analisi prettamente visiva della presenza di *F. poae* sulle spighe di frumento duro ha evidenziato che nel periodo di inoculazione pre - antesi la sintomatologia è molto più evidente rispetto il periodo di inoculazione avvenuto all'antesi, in quanto molti più ceppi hanno causato le tipiche lesioni necrotiche, indipendentemente dalla concentrazione inoculata; nella prova di inoculazione in fase di antesi solo tre ceppi a concentrazione  $10^6$  conidi/mL hanno prodotto sintomi sulle spighe.

### **Biomassa *F. poae***

Il protocollo di Real Time PCR sviluppato appositamente per *F. poae*, ha permesso di quantificare la biomassa da materiale vegetale contaminato.

Nella prova di inoculazione effettuata in fase di pre - antesi la biomassa media è stata rilevata e quantificata, nella maggior parte dei ceppi utilizzati, in quantità variabile tra 0.04 e 81.4 ng/g, mentre nella prova di inoculazione in fase di antesi i valori sono più

elevati e sono stati quantificati tra 0.01 e 356 ng/g di DNA. I risultati delle due prove sono presentati in tabella 4.5. In entrambe le prove il ceppo F 448 a concentrazione  $10^6$  conidi/mL ha dimostrato di avere la biomassa più abbondante.

Un esempio di curva di calibrazione standard, usata per la quantificazione del DNA di *F. poae*, è mostrata in figura 4.5.

Il protocollo di Real Time PCR è stato applicato a tutti i campioni di DNA di *F. poae* provenienti dalle prove di inoculazione artificiale in serra, generando risultati soddisfacenti, in un range di linearità tra 0.1 e 100 pg.

Nella prova in serra effettuata in una fase successiva all'antesi, nonostante le spighe fossero asintomatiche, si è ritrovato un contenuto di DNA di *F. poae* variabile tra 0.19 e 1.86 ng/g; il controllo negativo è risultato essere privo di DNA fungino (Tabella 4.6).

Comparando i dati ottenuti dai rilievi visivi dei sintomi sulle spighe di frumento duro e il quantitativo di biomassa di *F. poae* ottenuto dall'analisi di Real Time PCR, è emerso che non sempre dai sintomi è possibile avere un'indicazione della presenza effettiva del patogeno, indipendentemente dal momento in cui è avvenuta l'infezione, poichè una parte di ceppi che hanno generato un quantitativo elevato di biomassa, non ha prodotto alcun tipo di sintomo sulla spiga (esempi: F 547  $10^5$ , F 615  $10^6$ , E 578  $10^5$  per l'inoculo pre - antesi; F 547  $10^6$ , F 630  $10^6$  per l'inoculo all'antesi).

Il controllo negativo, ovvero le piante inoculate con acqua demineralizzata sterilizzata, sono risultate non contaminate da *F. poae*.

## **Correlazioni statistiche:**

### **Biomassa – sintomi e biomassa – concentrazione**

La quantificazione della biomassa di *F. poae* è un dato importante che si combina con la rilevazione della presenza/assenza di sintomi su spighe di frumento duro artificialmente contaminate. Nella fase di inoculazione pre - antesi, molti più ceppi hanno causato sintomatologia evidente rispetto l'inoculo all'antesi, ma non è risultata correlata con il DNA quantificato, mentre una correlazione significativa è emersa tra sintomi e biomassa di *F. poae* per la prova di inoculazione in corrispondenza dell'antesi ( $r = 0.72$ ;  $p < 0.05$ ).

Dal momento che non sempre la biomassa fungina è confermata dalla presenza di sintomi, è più rilevante considerare la possibile relazione tra biomassa fungina, ritrovata dalla Real Time, e concentrazione di inoculo applicata.

Per quanto riguarda gli effetti delle due diverse concentrazioni testate nella prova in serra, l'analisi statistica ha permesso di individuare una relazione significativa tra concentrazione e biomassa di *F. poae* quantificata, solo per la prova di inoculazione in periodo di antesi ( $p < 0.05$ ), quindi la concentrazione maggiore ha generato un maggior quantitativo di DNA rilevato dalla Real Time PCR. Ciò non è stato evidente, invece, per la prova di inoculazione pre - antesi, in cui si evince che non è la concentrazione che determina un corrispondente quantitativo di biomassa fungina, ma piuttosto sono i diversi ceppi, più o meno aggressivi, che influiscono sull'ammontare di DNA quantificato.

Se consideriamo singolarmente l'effetto della concentrazione applicata ( $10^5$  e  $10^6$  conidi/mL) sulla biomassa fungina quantificata, tra la prova di inoculazione pre - antesi ed antesi, si ritrova una correlazione statisticamente significativa solo per quanto riguarda la concentrazione più alta ( $r = 0.70$ ;  $p < 0.01$ ) (Tabella 4.7), mentre non c'è correlazione significativa tra le biomasse quantificate per la concentrazione  $10^5$  conidi/mL ( $r = -0.08$ ;  $p > 0.05$ ).

## DISCUSSIONE

Per la prova di inoculazione in ambiente controllato, sono stati utilizzati 14 ceppi di *F. poae* di cui una parte saggiati nel test *in vitro* Petri-dish (Capitolo II). Sono state considerate due diverse fasi di crescita della pianta: prima dell'antesi e all'antesi, che rappresenta in generale il momento di massima suscettibilità della pianta per i principali agenti patogeni della FDS. Lo scopo della prova era valutare se, anche per *F. poae*, la fase dell'antesi rappresentasse un momento ideale per la colonizzazione o se un'infezione più precoce potesse comunque favorirne la colonizzazione, vista la diversa distribuzione dei sintomi sulla pianta rispetto le altre specie di *Fusarium*. *F. poae*, infatti, viene isolato prevalentemente nelle glume, piuttosto che nella granella (Doohan *et al.*, 1998), dove causa le tipiche lesioni necrotiche (Vogelgsang *et al.*, 2008a; Alberti *et al.*, 2011).

La scelta di utilizzare due diverse concentrazioni conidiche,  $10^5$  e  $10^6$ , per piante a due diverse fasi di crescita, è stata decisa a seguito della prima prova di inoculazione artificiale in serra, dove le piante di frumento duro, in fase fenologica di fine fioritura, erano state trattate con un inoculo la cui concentrazione non era probabilmente adeguata ( $2 \times 10^4$  conidi/mL), dal momento che non fu possibile rilevare nessun tipo di sintomo

sulle piante. Le analisi di estrazione del DNA fungino dalle spighe macinate e di quantificazione della biomassa di *F. poae* sono state eseguite per tutte e tre le prove, per avere dati che potessero spiegare il ruolo di patogenicità dei ceppi fungini.

La quantificazione della biomassa fungina è stata possibile grazie allo sviluppo di un protocollo di Real Time PCR specifico per *F. poae*, con primer specie - specifici sviluppati da Parry e Nicholson (1996). L'analisi di Real Time PCR ha dimostrato che il metodo è specifico per *F. poae* e che non è stato amplificato nessun altro DNA, escludendo quindi possibili reazioni incrociate.

Dai dati ottenuti in questo lavoro è emerso che non sempre il riconoscimento visivo della malattia sulle spighe sia un buon indicatore del reale livello di infezione e questo in parte si spiega considerando il caratteristico sviluppo del fungo sulle glume, piuttosto che nei semi. La scarsa presenza di sintomi riscontrata sulle piante esaminate in questa sperimentazione trova conferma nel lavoro di Stenglein *et al.* (2012), in cui si afferma che il livello di contaminazione da *F. poae* nella granella, se basato soltanto sull'analisi visiva dei sintomi, è largamente sottostimato. Inoltre il nostro lavoro è in parte in accordo con lo studio di Siou *et al.* (2013), che riporta la difficoltà della valutazione visiva dei sintomi nelle infezioni precoci e tardive, e conferma che l'antesi è la fase più critica per infezioni di *Fusarium* su frumento duro. Ciò è stato affermato anche da altri autori (Sutton, 1982; Parry *et al.*, 1995; Xu, 2003) ed è confermato anche in questo lavoro di tesi. In particolare, per *F. poae* si è osservato che la finestra di infezione è molto ristretta, attorno alla fase di antesi, e che quando le piante hanno già virato da questa fase, il livello di infezione è ridotto.

La non correlazione diretta tra sintomi rilevati visivamente e biomassa fungina, quantificata molecolarmente, ribadisce l'importanza di questo strumento per monitorare la colonizzazione da *Fusarium* in piante di frumento duro, anche in assenza di sintomi. Studi su frumento asintomatico sono stati condotti anche da Kulik e Jestoi (2009), in cui cariossidi di frumento provenienti da campi sperimentali sono state analizzate per valutare il livello di contaminazione, in termini di biomassa fungina e micotossine prodotte. L'unica specie identificata è stata *F. poae*, questo conferma ulteriormente l'importanza dell'uso di tecniche molecolari e il ruolo sempre più di rilievo che *F. poae* riveste nella FDS.

Concentrazioni maggiori applicate alle piante di frumento duro sono in linea con quantitativi maggiori di biomassa calcolata ( $p < 0.01$ ), ma ciò è stato riscontrato solo nel caso di inoculazione all'antesi. Dal momento che manca una generale correlazione tra

concentrazione applicata e biomassa fungina quantificata, è probabile che la fase di crescita della pianta rappresenti una condizione critica per lo sviluppo del patogeno.

Il processo di inoculazione in ambiente controllato semplifica la situazione che si avrebbe in condizioni di campo, e allo stesso tempo permette di eliminare tutte quelle variabili causate da un background di infezioni, dovute alle molteplici interazioni tra diverse specie di *Fusarium* che competono per la colonizzazione delle spighe (Mesterhazy *et al.*, 2005; Pancaldi *et al.*, 2010). Spesso si è osservato che l'insorgenza della malattia in campo non è causata da una singola specie di *Fusarium*, ma piuttosto da un'interazione di diverse specie che possono essere presenti contemporaneamente o successivamente sulla pianta, rendendo quindi più difficoltosa l'identificazione delle specie fungine.

Inoltre, il metodo "spray" per l'inoculazione di piante di frumento duro con sospensione conidica, che avviene senza creare ferite, è paragonabile a ciò che succede *in vivo* durante la naturale infezione (Bai *et al.*, 2001), quindi meno invasivo, e da origine a più siti di infezione contemporaneamente che possono causare a loro volta un maggiore grado di contaminazione fungina.

Il protocollo di estrazione del DNA, si basa su un campione di dimensioni maggiori rispetto alla maggior parte delle analisi di DNA, comportando una diminuzione dell'errore di campionamento (Brandfass e Karlovsky, 2008). Inoltre la tecnica di Real Time PCR ottimizzata per *F. poae* ha permesso l'utilizzo di una chimica aspecifica come SYBR<sup>®</sup> Green I consentendo di analizzare e quantificare la biomassa di un numero elevato di campioni contemporaneamente, con costi complessivi di analisi ridotti.

In conclusione, questo lavoro di tesi sostiene l'importanza dell'utilizzo di una tecnica molecolare come la Real Time PCR, per rilevare una possibile infezione da parte di *Fusarium* su frumento duro anche in campioni asintomatici.

## FIGURE E TABELLE

Tabella 4.1: Elenco dei ceppi *F. poae* utilizzati per la prova di inoculazione artificiale in serra

Ceppi <i>F. poae</i>	Concentrazione inoculo (conidi/mL)
F 414	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 448	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 481	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 541	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 547	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 596	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 615	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 630	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 703	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 707	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
F 708	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
E 575	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
E 578	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
E 589	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup>
Controllo negativo	-

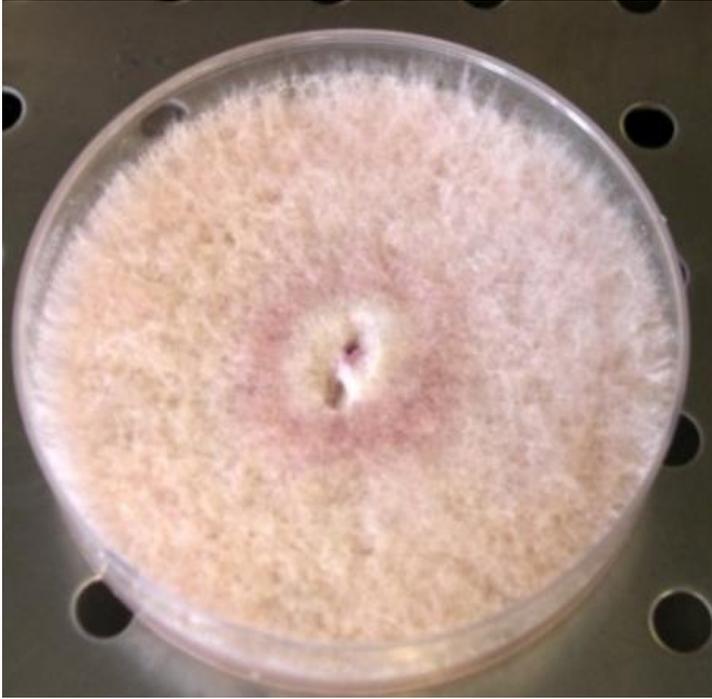


Figura 4.1: Ceppo fungino di *F. poae* cresciuto su PDA, dopo 7 giorni di incubazione.

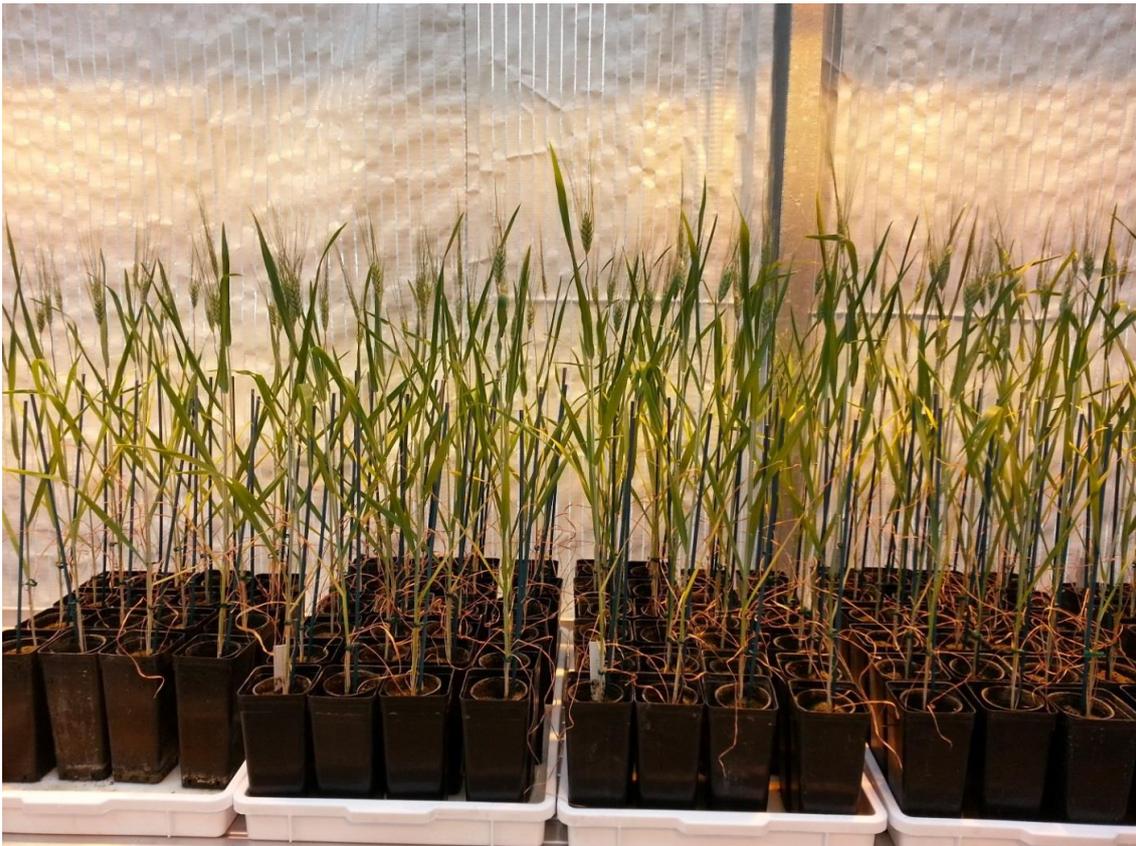


Figura 4.2: Allestimento della prova di inoculazione artificiale di ceppi di *F. poae* su piante di frumento duro (cv. Simeto) in serra.

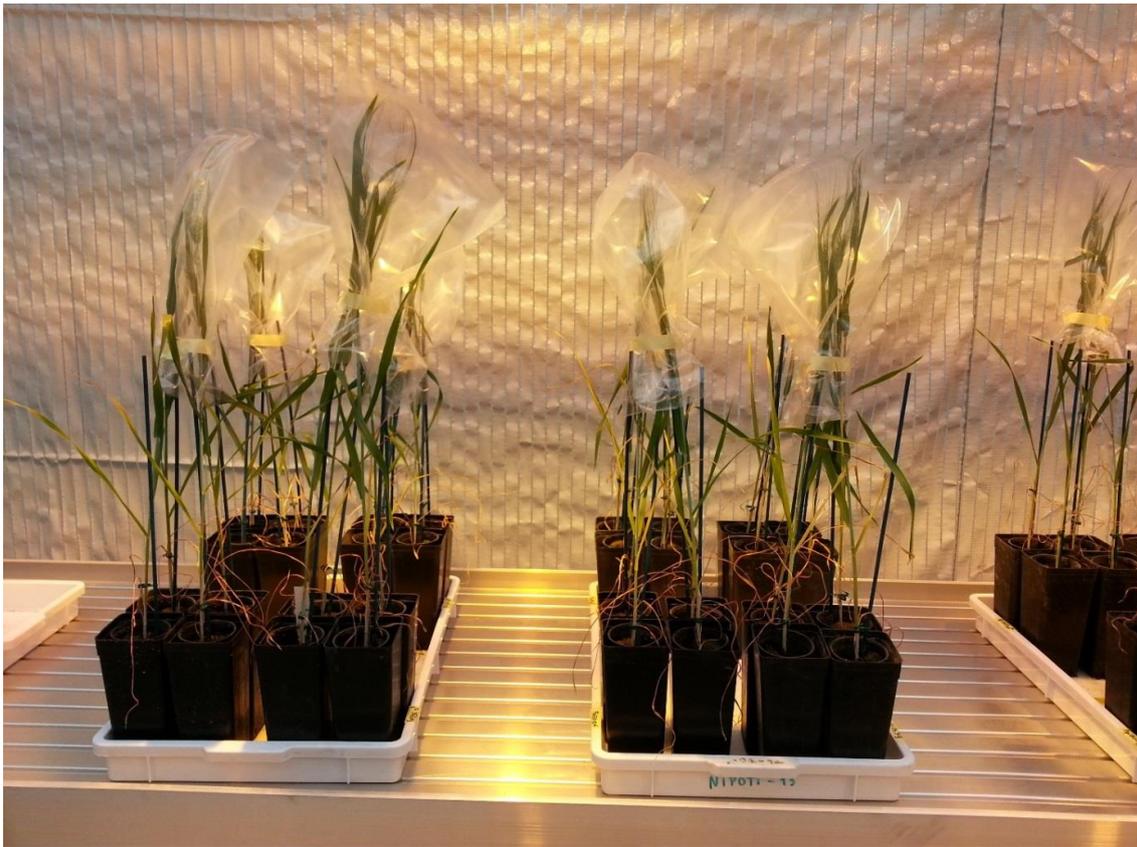


Figura 4.3: Le spighe dopo trattamento di inoculazione sono avvolte in sacchetti di plastica per 72 ore per favorire l'infezione.

Tabella 4.2: Elenco di specie di *Fusarium* e altri generi fungini testati per la specificità del protocollo di Real Time PCR per *F. poae*.

<b>SPECIE DI <i>FUSARIUM</i></b>	<b>N. CEPPI</b>	<b>ALTRI GENERI</b>	<b>N. CEPPI</b>
<i>F. acuminatum</i>	3	<i>Acremonium crysogenum</i>	1
<i>F. avenaceum</i>	5	<i>Acremonium longisporum</i>	1
<i>F. compactum</i>	1	<i>Acremonium ochraceum</i>	1
<i>F. crockwellense</i>	6	<i>Acremonium polycromum</i>	1
<i>F. culmorum</i>	5	<i>Alternaria alternaria</i>	1
<i>F. equiseti</i>	4	<i>Cladosporium erbarum</i>	2
<i>F. graminearum</i>	15	<i>Drechslera sorokiniana</i>	2
<i>F. langsethiae</i>	2	<i>Gibberella fujikuroi</i>	4
<i>F. oxysporum</i>	10	<i>Microdochium nivale var. majus</i>	3
<i>F. poae</i>	45	<i>Microdochium nivale</i>	1
<i>F. proliferatum</i>	5	<i>Pseudocercospora herpotrichioides</i>	1
<i>F. solani</i>	4	<i>Pseudocercospora herpotrichioides var. aciformis</i>	2
<i>F. sporotrichioides</i>	5	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	4
<i>F. subglutinans</i>	3	<i>Septoria nodorum</i>	1
<i>F. tricinctum</i>	3	<i>Ustilago maydis</i>	2
<i>F. verticilloides</i>	10		

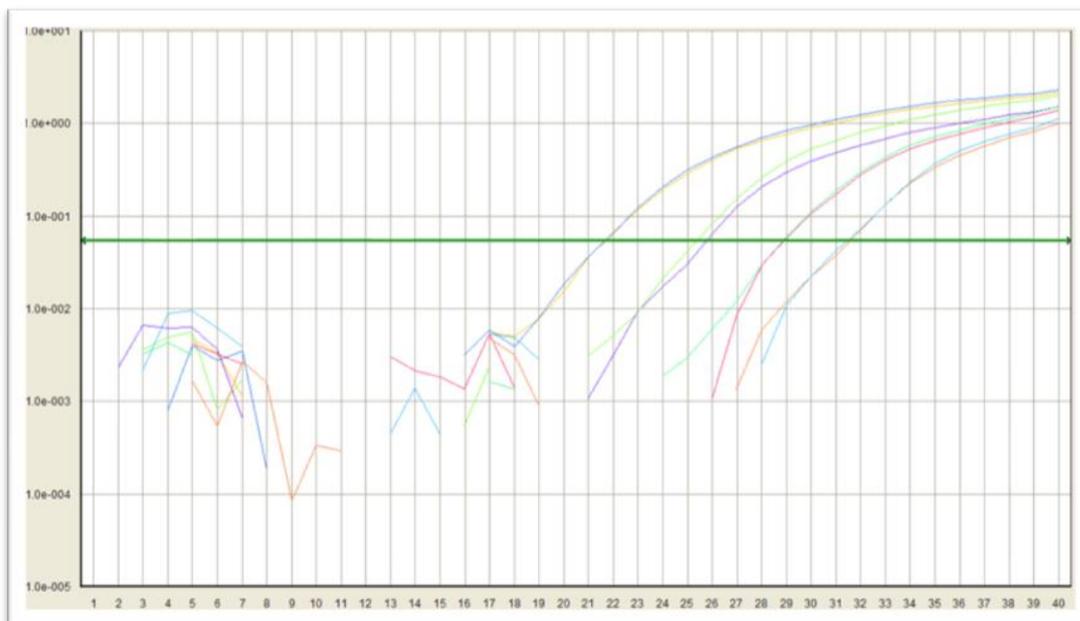


Figura 4.4: Esempio di segnale di fluorescenza relativo a diverse concentrazioni di DNA di *F. poae* (500 – 50 – 5 – 0.5 pg) eseguito tramite Real time PCR. Asse X rappresenta il ciclo-soglia; asse Y rappresenta  $\Delta R_n$ , incremento di fluorescenza.

Tabella 4.3: Standard di calibrazione di *F. poae* (in matrice diluita 1:10) per la quantificazione della biomassa tramite Real Time PCR.

<b>Controllo positivo</b>	DNA estratto da micelio fungino di <i>F. poae</i> (1:10)
<b>Controllo negativo</b>	Sfarinato di grano duro non contaminato acqua libera da nucleasi
<b>Standard di calibrazione</b>	100 pg di DNA di <i>F. poae</i> + estratto sfarinato diluito 1:10
	10 pg di DNA di <i>F. poae</i> + estratto sfarinato diluito 1:10
	1 pg di DNA di <i>F. poae</i> + estratto sfarinato diluito 1:10
	0.1 pg di DNA di <i>F. poae</i> + estratto sfarinato diluito 1:10

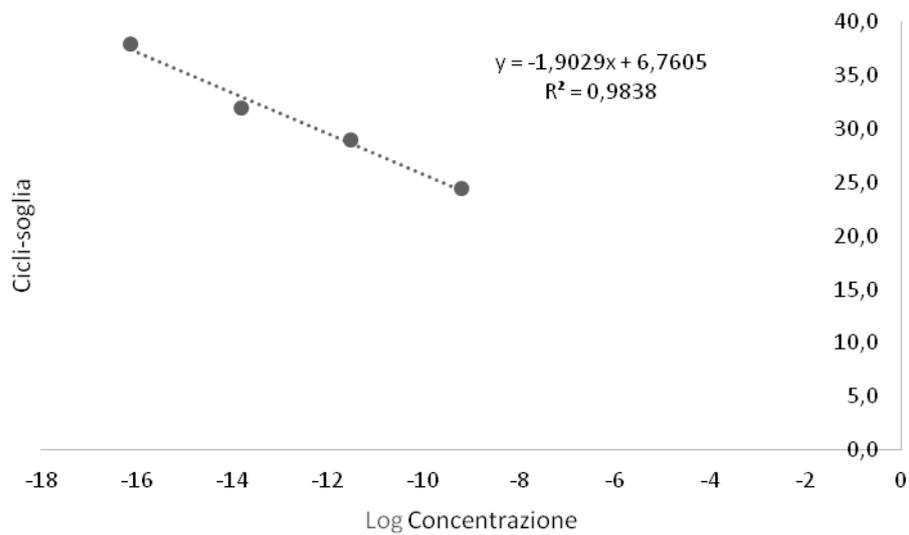


Figura 4.5: Esempio di curva di calibrazione con standard a concentrazione nota di *F. poae* e relativi cicli-soglia ricavati dall'analisi di Real time PCR.

Tabella 4.4: Rilievi visivi dei sintomi causati da *F. poae* su spighe di frumento duro (cv. Simeto) inoculate artificialmente in serra; + indica presenza di sintomi, - indica assenza di sintomi; rilievo effettuato 21 giorni dopo il primo trattamento di inoculazione.

<b>Ceppi <i>F. poae</i></b>	<b>Inoculazione pre-antesi</b>	<b>Inoculazione antesi</b>
F 414 10 <sup>5</sup>	-	-
F 414 10 <sup>6</sup>	-	-
F 448 10 <sup>5</sup>	-	-
F 448 10 <sup>6</sup>	+	+
F 481 10 <sup>5</sup>	+	-
F 481 10 <sup>6</sup>	+	+
F 541 10 <sup>5</sup>	-	-
F 541 10 <sup>6</sup>	+	-
F 547 10 <sup>5</sup>	-	-
F 547 10 <sup>6</sup>	-	-
F 596 10 <sup>5</sup>	+	-
F 596 10 <sup>6</sup>	+	-
F 615 10 <sup>5</sup>	-	-
F 615 10 <sup>6</sup>	-	-
F 630 10 <sup>5</sup>	+	-
F 630 10 <sup>6</sup>	+	-
F 703 10 <sup>5</sup>	-	-
F 703 10 <sup>6</sup>	-	-
F 707 10 <sup>5</sup>	-	-
F 707 10 <sup>6</sup>	-	-
F 708 10 <sup>5</sup>	-	-
F 708 10 <sup>6</sup>	-	-
E 575 10 <sup>5</sup>	-	-
E 575 10 <sup>6</sup>	+	-
E 578 10 <sup>5</sup>	-	-
E 578 10 <sup>6</sup>	-	+
E 589 10 <sup>5</sup>	-	-
E 589 10 <sup>6</sup>	+	-
Controllo negativo	-	-



Figura 4.6: Sintomo di lesione necrotica causata da *F. poae* su piante di frumento duro a seguito di inoculazione artificiale (ceppo F 448, concentrazione  $10^6$  conidi/mL).

Tabella 4.5: Ceppi di *F. poae* utilizzati per la prova di inoculazione artificiale in serra in due diverse fasi di crescita di piante di frumento duro (cv. Simeto) e relativo quantitativo di biomassa ottenuto tramite Real Time PCR, con deviazione standard (calcolata da Excel).

<b>Ceppi <i>F. poae</i></b>	<b>Biomassa <i>F. poae</i> (inoculo pre- antesi) (ng/g)</b>	<b>Deviazione standard</b>	<b>Biomassa <i>F. poae</i> (inoculo antesi) (ng/g)</b>	<b>Deviazione standard</b>
F 414 10 <sup>5</sup>	-	-	0,05	0,00
F 414 10 <sup>6</sup>	-	-	0,05	0,01
F 448 10 <sup>5</sup>	-	-	0,04	0,01
F 448 10 <sup>6</sup>	81,43	5,65	355,78	18,71
F 481 10 <sup>5</sup>	13,13	4,47	3,66	1,43
F 481 10 <sup>6</sup>	4,23	1,36	14,53	1,32
F 541 10 <sup>5</sup>	-	-	10,66	-
F 541 10 <sup>6</sup>	24,07	6,37	0,04	0,01
F 547 10 <sup>5</sup>	72,23	29,27	0,29	0,27
F 547 10 <sup>6</sup>	-	-	48,42	10,57
F 596 10 <sup>5</sup>	30,87	-	0,13	0,14
F 596 10 <sup>6</sup>	-	-	0,28	0,37
F 615 10 <sup>5</sup>	0,65	0,68	0,25	0,34
F 615 10 <sup>6</sup>	36,99	3,12	3,61	2,20
F 630 10 <sup>5</sup>	1,00	-	0,04	0,03
F 630 10 <sup>6</sup>	-	-	54,49	1,72
F 703 10 <sup>5</sup>	-	-	0,02	0,00
F 703 10 <sup>6</sup>	-	-	0,08	0,06
F 707 10 <sup>5</sup>	0,09	0,07	6,52	0,25
F 707 10 <sup>6</sup>	0,24	0,21	3,05	1,33
F 708 10 <sup>5</sup>	2,30	0,03	0,01	0,00
F 708 10 <sup>6</sup>	9,66	3,13	0,02	0,01
E 575 10 <sup>5</sup>	0,04	-	0,03	0,02
E 575 10 <sup>6</sup>	21,77	2,70	31,93	11,45
E 578 10 <sup>5</sup>	7,28	0,38	1,53	1,61
E 578 10 <sup>6</sup>	0,05	0,00	139,62	14,97
E 589 10 <sup>5</sup>	0,06	0,04	0,01	0,00
E 589 10 <sup>6</sup>	28,53	3,54	12,28	12,11
Controllo negativo	-	-	-	-

Tabella 4.6: Ceppi di *F. poae* utilizzati per la prova di inoculazione artificiale in serra (concentrazione  $2 \times 10^4$  conidi/mL) in fase di crescita post-antesi di piante di frumento duro (cv. Simeto) e relativo quantitativo di biomassa ottenuto tramite Real Time PCR, con deviazione standard (calcolata da Excel) tra i replicati tecnici.

<b>Ceppi <i>F. poae</i></b>	<b>Biomassa <i>F. poae</i> (inoculo post-antesi) (ng/g)</b>	<b>Deviazione standard</b>
348	0,19	0,001
405	0,21	0,021
414	0,19	0,011
448	0,29	-
547	0,29	-
702	0,46	0,003
703	1,86	-
708	0,22	-
Controllo negativo	-	-

Tabella 4.7: Correlazioni statistiche relative alla biomassa di *F. poae* alla concentrazione  $10^6$  conidi/mL tra la prova di inoculazione pre – antesi e la prova di inoculazione all'antesi. Analisi eseguita con il software IBM SPSS Statistics (Versione 22);  $p < 0.01$ .

		DNA_pre_10_6	DNA_anth_10_6
DNA_pre_10_6	Correlazione di Pearson	1	,699**
	Sign.		,000
	N	28	28
DNA_anth_10_6	Correlazione di Pearson	,699**	1
	Sign.	,000	
	N	28	28

## BIBLIOGRAFIA

**Alberti I., Dal Prà M., Tonti S., Montanari M., Prodi A., Pancaldi D., 2011.**

Biomolecular characterization of *Fusarium poae* strains isolated from durum wheat in central Italy. *Plant breeding and seed science* 64: 154-161.

**Audernaert K., Van Broeck R., Bekaert B., De Witte F., Heremans B., Messens K.,**

**Hoefte M., Haesaert G., 2009.** *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology* 125: 445-458.

**Bai G.-H., Desjardins A.E., Plattner R.D., 2001.** Deoxynivalenol-nonproducing

*Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153: 91-98.

**Bennett W., Klich M., 2003.** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516.

**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. *International Journal of Molecular Science* 9: 2306-2321.

**Dinolfo M.I., Stenglein S.A., Moreno M.V., Nicholson P., Jennings P., Salerno**

**G.L., 2010.** ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *European Journal of Plant Pathology* 127: 483-491.

**D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C., 1999.** *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity.

*Animal Feed Science & Technology* 80: 183-205.

**Doohan F.M., Parry D.W., Jenkinson P., Nicholson P., 1998.** The use of species-

- specific PCR-based assay to analyze *Fusarium* ear blight on wheat. *Plant Pathology* 47: 197-205.
- Goswami R.S., Kistler H.C.**, 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 515-525.
- Joffe A.**, 1978. *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as principal causes of alimentary toxic aleukia. In: Wyllie TD, Morehouse LG, Eds. *Handbook of mycotoxins and mycotoxicoses*, Vol. 3. New York: Marcel Dekker, 21-86.
- Jurado M., Vasquez C., Patiño B., González-Jaén M.T.**, 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 562-568.
- Kulik T., Jestoi M.**, 2009. Quantification of *Fusarium poae* DNA and associated mycotoxins in asymptotically contaminated wheat. *International Journal of Food Microbiology* 130: 233-237.
- Kuzdraliński A., Szczerba H., Tofil K., Filipiak A., Garbarczyk E., Dziadko P., Muszyńska M., Solarska E.**, 2014. Early PCR-based detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. poae* on stem bases of winter wheat throughout Poland. *European Journal of Plant Pathology* 140: 491-502.
- Mesterhazy A., Bartok T., Kaszonyi G., Varga M., Toth B., Varga J.**, 2005. Common resistance to different *Fusarium* spp. causing *Fusarium* head blight in wheat. *European Journal of Plant Pathology* 112: 267-281.
- Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., 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.

**Nicholson P., Chandler E., Draeger R.C., Gosman N.E. Simpson D.R., Thomsett M., Wilson A.H.,** 2003. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 691-703.

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

**Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L.,** 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grains - a review. *Plant Pathology* 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.

**Reischer G.H., Lemmens M., Farnleitner A., Adler A., Mach R.L.,** 2004. Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe. *Journal of Microbiological Methods* 59: 141-146.

**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 barely and malt. *European Journal of Plant Pathology* 114: 371-380.

**Scherm B., Balmas V., Spanu F., Pani G., Delogu G., Pasquali M., Migheli Q.,** 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology* 14 (4): 323-341.

**Shah 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. *European Journal of Plant Pathology* 112: 13-21.
- Siou D., Gélisse S., Laval V., Repinçay C., Canalès R., Suffert F., Lannou C., 2013.**  
Effect of wheat spike infection timing on *Fusarium* head blight development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology* 63 (2): 390-399.
- Stein J.M., Osborne L.E., Bondalapati K.D., Glover K.D., Nelson C.A., 2009.**  
*Fusarium* head blight severity and deoxynivalenol concentration in wheat in response to *Gibberella zeae* inoculum concentration. *The American Phytopathological Society* 99 (6): 759-764.
- Stenglein S.A., 2009.** *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology* 91 (1): 25-36.
- Stenglein S.A., Dinolfo M.I., Bongiorno F., Moreno M.V., 2012.** Response of wheat (*Triticum* spp.) and barley (*Hordeum vulgare*) to *Fusarium poae*. *Agrociencia* 46: 299-306.
- Sutton, J.C., 1982.** Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195-209.
- Thrane U., Adler A., Clasen P-E., Galvano F., Langseth W., Lew H., Logriego A., Nielsen K.F., Ritieni A., 2004.** Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology* 95: 257-266.
- Uhlig S., Torp M., Heier B., 2006.** Beauvericin and enniatins A, A1, B and B1 in Norwegian grain: a survey. *Food Chemistry* 94: 193-201.
- Vogelgsang S., Sulyok M., Bänzinger I., Jenny E., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H-R., 2008a.** Effect of fungal strain and cereal substrate on *in vitro* mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. *Food additives and contaminants* 25 (6): 745-757.

- Vogelgsang S., Sulyok M., Hecker A., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H-R.,**  
2008b. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 122: 265-276.
- Xu X., Parry D., Nicholson P., Thomsett M., Simpson D., Edwards S., Cooke B.,  
Doohan F., Brennan J., Moretti A., Tocco G., Mulè 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.
- Xu X.M.,** 2003. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium*  
ear blight. *European Journal of Plant Pathology* 109: 683-689.
- Zadoks J., Chang T., Konzak C.,** 1974. A decimal code for the growth stages of  
cereals. *Weed Research* 14: 415-421.

## **DISCUSSIONE GENERALE**

La fusariosi della spiga (FDS), malattia, a eziologia complessa, è spesso evidente sulle spighe dei cereali, con granella che assume una colorazione rosa o biancastra. Tuttavia, anche la granella che appare sana può avere comunque contratto l'infezione da parte di *Fusarium* e accumulato sostanze tossiche. Tali molecole possono provocare patologie acute o croniche per l'uomo e per gli animali, per via delle loro attività neurotossiche, citotossiche e cancerogene (Gutleb *et al.*, 2002; Meca *et al.*, 2010). Nell'uomo, in particolare, il consumo di alimenti contaminati da *Fusarium* provoca disturbi quali diarrea, nausea, dolore addominale, vertigini e febbre (Desjardins, 2006; Pestka, 2007).

La capacità di produrre micotossine da parte di specie di *Fusarium* è stata discussa da diversi autori e sembra influenzata dai fattori ambientali (Doohan *et al.*, 2003; Brennan *et al.*, 2003 e 2005; Xu *et al.*, 2007a e 2008).

Infatti elementi quali temperatura, umidità relativa, disponibilità d'acqua, presenza di altri microorganismi, composizione quali-quantitativa dell'inoculo, possono essere determinanti per l'accumulo di micotossine nei tessuti delle piante ospiti (Doohan *et al.*, 2003).

Anche il genoma della pianta e del patogeno sono determinanti per l'infezione, soprattutto per quanto riguarda lo studio dei geni coinvolti nei meccanismi di resistenza; infatti, in accordo con la comunità scientifica, l'utilizzo di cultivar resistenti rappresenta il metodo più efficace per una buona gestione della patologia (Bai e Shaner 2004). Ad oggi però non esistono cultivar di frumento commerciali resistenti a FDS, in particolare per il frumento duro che risulta più suscettibile alla malattia rispetto al frumento tenero. Perciò è molto importante studiare l'interazione tra la pianta - ospite e l'organismo patogeno anche a livello molecolare per comprendere i meccanismi coinvolti nello sviluppo della malattia (Stenglein, 2009) e attuare strategie di controllo efficaci.

Lo studio delle specie di *Fusarium* è importante per caratterizzare in maniera precisa l'apporto di ciascuna specie alla Fusariosi. L'aggressività di un ceppo fungino è conferita da molti fattori legati alle caratteristiche delle cellule del micete, come ad esempio la capacità di produrre enzimi in grado di degradare la parete cellulare della pianta (Gang *et al.*, 1998) e causare quindi danni nei tessuti. Cooper *et al.* (1988) dimostrarono che isolati fungini di *F. culmorum* cresciuti su cariossidi di frumento producevano all'inizio dell'infezione le xilanasi, enzimi che degradano lo xilano, uno dei componenti della parete cellulare della cellula vegetale.

In questo lavoro di tesi è stata valutata l'aggressività di ceppi fungini di *F. poae* e *F.*

*culmorum* tramite l'applicazione di un saggio *in vitro* Petri-dish, precedentemente sviluppato da Purahong *et al.* (2012) per *F. graminearum* e adattato al sistema *Fusarium* – frumento duro.

In letteratura sono descritti diversi metodi *in vitro* per valutare l'aggressività di ceppi fungini: ad esempio Brennan *et al.* (2003) hanno sviluppato un saggio di rallentamento del tasso di crescita del coleotile che si basa sull'inoculazione di sementi di frumento con micelio, ma la valutazione dell'aggressività è risultata difficoltosa, poiché il micelio crescendo può coprire le sementi; Wu *et al.* (2005) hanno valutato l'aggressività di isolati fungini di *F. graminearum* tramite inoculazione di una sospensione conidica a livello del coleotile, in seguito alla rimozione dell'estremità apicale e il saggio si è dimostrato affidabile e correlato con inoculazione in campo, ma è comunque dipendente dalla varietà di pianta - ospite.

Questi metodi si basano prevalentemente sulla gravità di malattia, a differenza del Petri-dish, che, invece, considera anche la riduzione del tasso di germinazione delle cariossidi e di lunghezza del coleotile. Questi parametri, se considerati singolarmente, non sono rappresentativi del reale livello di aggressività, ma lo diventano se combinati insieme, permettendo di individuare un indice di aggressività distintivo per ciascun isolato di ciascuna specie fungina.

Il saggio Petri-dish utilizzato ha evidenziato dei vantaggi, tra cui rapidità, facilità di esecuzione e affidabilità. Inoltre la sua applicazione può essere estesa anche ad altre specie di *Fusarium*, poiché facilmente adattabile alle condizioni di crescita di ciascun patogeno.

La conoscenza del livello di aggressività di un isolato fungino è un dato fondamentale da utilizzare in programmi di sperimentazione genetica per testare la resistenza alla FDS in selezioni di cultivar di frumento duro. Infatti, se si utilizza un inoculo (o un mix di isolati fungini appartenenti ad una stessa specie) altamente aggressivo, si può saggiare la resistenza di una determinata cultivar di frumento alla FDS e valutare quindi se e quanto si differenziano diverse cultivar di frumento in termini di resistenza alla FDS. Se invece l'isolato fungino patogeno avesse un basso livello di aggressività, probabilmente non sarebbe possibile differenziare i meccanismi di resistenza tra diverse cultivar di frumento.

Il livello di aggressività di ciascun isolato di un ceppo fungino contribuisce a stimare la gravità della FDS su frumento duro e a caratterizzare in modo più approfondito gli agenti causali.

I saggi di inoculazione *in vitro* presentano molteplici aspetti positivi rispetto alle sperimentazioni in campo: le condizioni ambientali di temperatura e umidità sono controllate e ottimizzate per ottenere le migliori condizioni di crescita fungina; l'incidenza e la gravità di malattia dipendono solo dalla composizione dell'inoculo utilizzato per le prove di inoculazione artificiale. Un altro aspetto positivo è la possibilità di evitare l'interazione con altre specie o generi fungini, dovuta alla presenza di microrganismi antagonisti, che può rappresentare o un aumento della gravità di malattia oppure una competizione tra le specie per i nutrienti (Xu *et al.*, 2007b; Vogelgsang *et al.*, 2008; Xu e Nicholson 2009). Infine, le pratiche agronomiche (Vogelgsang e Forrer, 2006) l'uso di fungicidi (Simpson *et al.*, 2001), l'uso di varietà suscettibili o resistenti alla malattia (Snijders, 2004) e la risposta delle piante all'infezione condizionano lo sviluppo dei patogeni e la conseguente produzione di micotossine.

L'analisi *in vitro* dell'aggressività di ceppi di *F. poae* è in parte correlata alla prova di inoculazione artificiale in serra, in quanto è emersa una correlazione significativa ( $p < 0.05$ ) tra la sintomatologia misurata nell'inoculazione all'antesi alla concentrazione di  $10^6$  conidi/mL con AUDPC standard. Questo è in linea con il lavoro di Purahong (2014) dove l'aggressività dei ceppi fungini di *F. graminearum* è stata valutata con due saggi (Petri-dish test e inoculazione in serra) e l'AUDPC standard e la gravità di malattia sono risultati essere altamente correlati.

Grazie all'applicazione di questo saggio *in vitro*, è stato possibile caratterizzare ceppi di *Fusarium* e determinare il grado di aggressività nel causare la FDS. Questo permetterebbe di selezionare gli isolati fungini per esperimenti volti all'approfondimento dei meccanismi di resistenza, che ad oggi rappresenta la tecnica migliore di controllo della FDS.

La valutazione della contaminazione di cariocidi di frumento affette da FDS rappresenta una componente essenziale per lo studio della dinamica di popolazione di *Fusarium* e dell'epidemiologia della malattia. La misura del livello di contaminazione, in prove di inoculazione artificiale in campo o in serra, non può essere fatta solo misurando l'incidenza e la gravità di malattia, ma anche con isolamento di ceppi fungini da tessuti vegetali contaminati, per garantire una stima del reale livello di infezione. (Jurado *et al.*, 2005; Nicholaisen *et al.*, 2009; Pancaldi *et al.*, 2010). Considerando i tempi molto lunghi per la realizzazione di queste metodologie, sono stati sviluppati

diversi protocolli di PCR per consentire un'identificazione univoca delle specie fungine. Questi metodi si basano sull'utilizzo di coppie di primer specie - specifici che amplificano una determinata porzione di DNA (Parry e Nicholson 1996; Nicholson *et al.*, 1998; Yli-Mattila *et al.*, 2008); in aggiunta, sono stati sviluppati protocolli di PCR quantitativa (Real Time PCR) che allo stesso tempo dovrebbero identificare e quantificare la biomassa di un determinato patogeno.

L'importanza dell'applicazione di queste tecniche molecolari per stimare il livello di infezione, monitorando la presenza effettiva di un patogeno, è ampiamente descritta in letteratura (Sarlin *et al.*, 2006; Burlakoti *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2008; Niessen, 2008; Nicholaisen *et al.*, 2009; Kulik e Jestoi 2009; Edwards *et al.*, 2012) e si rivela particolarmente utile quando si vuole stimare il livello di infezione anche in assenza di sintomatologia (Kuzdralinski *et al.*, 2014).

Il monitoraggio a livello di biomassa fungina di una vasta gamma di agenti patogeni può dare informazioni utili sia per studi di interazione tra le specie, sia per la valutazione dell'efficienza di misure preventive e/o curative per la malattia (Nicholaisen *et al.*, 2009).

Lo sviluppo di un protocollo di Real Time PCR specifico per *F. poae* ha permesso di ottenere un valore reale del livello di contaminazione ed evitare di sottostimare il potenziale di rischio causato da *F. poae*, dato dalla discrepanza, ritrovata in questo lavoro, tra sintomi visibili e granella contaminata.

Come già riportato, le condizioni climatiche di temperatura, umidità relativa e piogge costituiscono elementi importanti nel favorire l'insorgenza della FDS, determinando quindi annate caratterizzate da un'alta pressione di inoculo naturale. In queste condizioni è frequente ritrovare nei cereali contaminati elevati quantitativi di deossinivalenolo (DON), nivalenolo (NIV) e altri tricoteceni. Se, al contrario, le condizioni climatiche portano ad una bassa pressione di inoculo naturale, è plausibile che specie considerate di minor importanza eziologica o meno frequentemente isolate dai cereali contaminati, possano contribuire in maniera significativa all'accumulo delle cosiddette micotossine emergenti, che però non sono soggette ad alcun tipo di regolamentazione (Covarelli *et al.*, 2015). Tutto questo pone l'accento sull'elevato potenziale di rischio di contaminazione "nascosta" nei cereali.

Infatti, le specie di *Fusarium* hanno la capacità di produrre una vasta gamma di micotossine che sono classificate in due categorie principali: le micotossine

“tradizionali”, a cui appartengono in particolare i tricoteceni di tipo A e B e le micotossine “emergenti”, rappresentate da beauvericina (BEA) ed enniatine (ENs) (Covarelli *et al.*, 2015). Le specie maggiormente associate alla produzione di questa seconda classe di micotossine sono *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* (Monti *et al.*, 2000; Jestoi, 2008; Stenglein, 2009).

Nell’articolo in Appendice è riportato lo studio di specie di *Fusarium* che si ritrovano abitualmente oppure occasionalmente su cariossidi di frumento duro, e delle rispettive micotossine prodotte.

Il frumento duro ospita prevalentemente specie fungine quali *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. poae*, tuttavia in casi rari ma documentati, anche *F. proliferatum* e *F. verticillioides* (Shepard *et al.*, 2005; Desjardins *et al.*, 2007; Palacios *et al.*, 2011), che contribuiscono alla contaminazione delle cariossidi da fumonisine. Queste ultime due specie si isolano abitualmente da colture di mais e sono responsabili di marciumi della spiga (maize ear rot).

Per avere un’indicazione precisa del reale livello di contaminazione delle cariossidi di frumento duro, è stata effettuata la caratterizzazione dei ceppi di *Fusarium* sopracitati mediante analisi micologiche di isolamento e molecolari di Real Time PCR per la quantificazione della biomassa fungina e con la tecnica HPLC-MS/MS per identificare e quantificare le micotossine prodotte.

La contaminazione del frumento duro da fumonisine, oltre che dai più noti tricoteceni, rappresenta un campanello d’allarme per la sicurezza alimentare, che non deve essere sottostimato. Questi dati preliminari mostrano che la presenza di *F. proliferatum* è strettamente legata alla potenziale contaminazione da fumonisine.

Tutti questi aspetti rendono necessaria quindi una valutazione a 360° delle specie di *Fusarium* responsabili della FDS.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Bai G.H., Shaner G.E.,** 2004. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* Head Blight. *Annual Review of Phytopathology* 42: 135-161.
- Brennan J., Fagan B., van Maanen A., Cooke B., Doohan F.,** 2003. Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* 109: 577-587.
- Brennan J.M., Egan D., Cooke B.M., Doohan F.M.,** 2005. Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *Plant Pathology* 54: 156-160.
- Burlakoti R.R., Estrada R., Rivera V.V., Boddeda A., Secor G.A., Adhikari T.B.,** 2007. Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet and wheat. *The American Phytopathological Society* 97 (7): 835-841.
- Cooper, R. M., Longman, D., Campbell, A., Henry, M., and Lees, P. E.,** 1988. Enzymatic adaptation of cereal pathogens to the monocotyledonous primary wall. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 33-47.
- Covarelli L., Beccari G., Prodi A., Generotti S., Etruschi F., Meca G., Juan C., Manes J.,** 2015. Biosynthesis of beauvericin and enniatins *in vitro* by wheat *Fusarium* species and natural grain contamination in an area of central Italy. *Food Microbiology* 46: 618-626.
- Desjardin A.E.,** 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology. ASP Press, St. Paul, MN.
- Desjardins A.E., Busman M., Proctor R.H. Stessman R.,** 2007: Wheat kernel black point and fumonisin contamination by *Fusarium proliferatum*. *Food Additives and Contaminants* 24: 1131-1137.

- Doohan F. M., Brennan J.M, Cooke B.M.,** 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 755-768.
- Edwards S. G., Imathiu S. M., Ray R. V., Back M., Hare M. C.,** 2012. Molecular studies to identify the *Fusarium* species responsible for HT-2 and T-2 mycotoxins in UK oats. *International Journal of Food Microbiology* 165: 168-175.
- Gang G., Miedaner T., Schuhmacher U., Schollenberger M., Geiger H.H.,** 1998. Deoxynivalenol and Nivalenol Production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *The American Phytopathological Society* 88 (9): 1998-879.
- Gutleb A.C., Morrison E., Murk A.J.,** 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11: 309-320.
- Jestoi M.,** 2008. Emerging *Fusarium* mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins and moniliformin – a review. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 48 (1): 21-49.
- Jurado M., Vasquez C., Patiño B., Gonzàlez-Jaén M.T.,** 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 562-568.
- Kulik T., Jestoi M.,** 2009. Quantification of *Fusarium poae* DNA and associated mycotoxins in asymptotically contaminated wheat. *International Journal of Food Microbiology* 130: 233-237.
- Kuzdraliński A., Szczerba H., Tofil K., Filipiak A., Garbarczyk E., Dziadko P.,**

- Muszyńska M., Solarska E.,** 2014. Early PCR-based detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. poae* on stem bases of winter wheat throughout Poland. *European Journal of Plant Pathology* 140: 491-502.
- Meca G., Soriano J., Gaspari M, A., Ritieni A., Moretti A., Mañes J.,** 2010. Antifungal effects of the bioactive compounds enniatins A, A1, B, B1. *Toxicon* 56: 480-485.
- Monti S.M., Fogliano V., Logriego A., Ferracane R., Ritieni A.,** 2000. Simultaneous determination of beauvericin, enniatins and fusaproliferin by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48 (8): 3317-3320.
- Nicholaisen M., Suproniene S., Niessen L.K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justesen A.F.,** 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological methods* 76: 234-240.
- Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., 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.
- Niessen L.K., Cook D.J., Edwards S.G., Ray R.V.,** 2008. The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *International Journal of Food Microbiology* 179: 38-49.
- Palacios S.A., Ramirez M.L., Cabrera Zalazar M., Farnochi M.C., Zappacosta D., Chiacchiera S.M., Reynoso M.M., Chulze S.N., Torres A.M.,** 2011: Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 12264-12269.

- Pancaldi D., Tonti S., Prodi A., Salomoni D., Dal Pra M., Nipoti P., Alberti I., Pisi A.,** 2010. Survey of the main causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 258-266.
- Parry D.W., Nicholson P.,** 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology* 45: 383-39.
- Pestka J.J.,** 2007. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137: 283-298.
- Purahong W., Nipoti P., Pisi A., Lemmens M., Prodi A.,** 2014. Aggressiveness of different *Fusarium graminearum* chemotypes within a population from Northern-Central Italy. *Mycoscience* 55: 63-69.
- 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. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 371-380.
- Shephard G.S., Westhuizen L. van der, Gatyeni P.M., Katerere D.R., Marasas W.F.O.,** 2005: Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 293-9296.
- 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.
- Snijders C.H.A.,** 2004. Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. *Toxicology Letters* 153: 37-46.
- Stenglein S.A.,** 2009. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology* 91 (1): 25-36.

- Vogelgsang S., Forrer H-R.,** 2006. *Fusarium* head blight and mycotoxins in cereals – potential strategies to control contamination under conservation tillage. *Canadian Journal of Plant Pathology – Revue Canadienne de Phytopathologie* 28: 382-383.
- Vogelgsang S., Sulyok M., Baezinger I., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H-R.,** 2008. Effect of fungal strain and cereal substrate on *in vitro* mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. *Food Additives and Contaminants* 25 (6): 745-757.
- Wu A., Li H., Zhao C., Liao Y.,** 2005. Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* from China revealed by wheat coleoptiles and floret inoculations. *Mycopathologia* 160: 75-83.
- Xu X., Nicholson P., Ritieni A.,** 2007a. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* 119: 67-71.
- Xu X., Monger W., Ritieni A., Nicholson P.,** 2007b. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combination of, *Fusarium* species. *Plant Pathology* 56: 943-956.
- Xu X., Nicholson P.,** 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* 47: 83-103.
- Xu X., Nicholson P., Thomsett M.A., Simpson D., Cooke B.M., Doohan F.M., Brennan J., Monaghan S., Moretti A., Mule G., Hornok L., Beki E., Tatnell J., Ritieni A., Edwards S.G.,** 2008. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* Head Blight of wheat and environmental conditions. *The American Phytopathological Society* 98: 69-78.

**Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Jestoi M., Parikka P., Hietaniemi V., Gagkaeva T., Sarlin T. Haikara A., Laaksonen S., Rizzo A., 2008.** Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41 (4): 243-260.

## **APPENDICE**

Department of Agricultural Sciences, Alma Mater Studiorum University of Bologna,  
Viale Fanin 40, 40127 Bologna, Italy

***Fusarium proliferatum* and fumonisin B1 co-occur with *Fusarium* species causing  
*Fusarium* Head Blight in durum wheat in Italy**

Barbara Amato, Katharina Pfohl, Stefano Tonti, Paola Nipoti, Raana Dastjerdi,  
Annamaria Pisi, Petr Karlovsky and Antonio Prodi

**ABSTRACT**

*Fusarium* Head Blight caused by phytopathogenic *Fusarium* spp. with *Fusarium graminearum* as main causal agent is a major disease of durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Mycotoxins in wheat are dominated by trichothecenes B. Fumonisin B1 has only occasionally been reported from wheat; their occurrence was attributed to *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides*.

We investigated kernels of durum wheat grown in Italy in 2008 - 2010 for colonization with *Fusarium* spp. and for the content of *Fusarium* mycotoxins. Fungal biomass was determined using species-specific qPCR and mycotoxins were quantified by HPLC-MS/MS. *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* were dominating *Fusarium* species, followed by *Fusarium poae*, *Fusarium tricinctum*, and *Fusarium proliferatum*. No *Fusarium verticillioides* DNA was found. Toxicologically relevant levels of deoxynivalenol and nivalenol but no trichothecenes A were detected. Enniatins, fumonisin B1 and beauvericin were present in grain in all three years. Based on these results and on the evaluation of previous published reports, we hypothesize that low levels of fumonisins commonly occur in wheat grains produced in warm climate; they may remain undetected as long as mycotoxin monitoring programs for wheat do not include fumonisins. The only relevant source of fumonisins in wheat grain appears to be *Fusarium proliferatum*.

**Keywords:** *Fusarium* head blight (FHB), *Fusarium proliferatum*, fumonisins in wheat

## INTRODUCTION

*Fusarium* head blight (FHB) is a worldwide-occurring cereal disease complex caused by several species of the fungal genus *Fusarium* that often cause indistinguishable symptoms. The disease leads to the reduction in grain yield, which can reach up to 70% (PARRY et al., 1995). FHB also affects quality parameters such as the size of kernels, protein content, baking quality of flour and mycotoxin content, making them unsuitable and unsafe for human and animal consumption. The prevailing species in FHB in Italy are *F. graminearum* Schwabe, *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. and recently *F. poae* (Peck) Wollenweb. (SHAH et al., 2005; PANCALDI et al., 2010). INFANTINO et al. (2012) reported that *F. poae* was the most prevalent species found in organic bread and durum wheat in Italy.

*F. graminearum* Schwabe [*Gibberella zeae* (Schwein) Petch] is the predominant FHB pathogen worldwide (XU and NICHOLSON, 2009), producing a range of mycotoxins including type B trichothecenes nivalenol (NIV) and deoxynivalenol (DON). These mycotoxins disrupt cell functions by inhibiting protein synthesis via binding to the ribosome. For this reason, maximum levels of DON as major trichothecene contaminating FHB-afflicted kernels are regulated in food and feed by European directives EC n. 1881/2006, 126/2007. *F. graminearum* populations comprise chemotypes that synthesizes either DON or NIV and their acetylated derivatives.

*F. poae* is a pathogen of *increasingly importance as a cause of FHB* in countries such as Argentina, Canada, Finland, Belgium, Germany, Switzerland, Hungary, Slovakia, Italy, Ireland and the United Kingdom (AUDENAERT et al., 2009; VOGELGSANG et al. 2008; STENGLEIN, 2009, PANCALDI et al., 2010). The prevalence of *F. poae* in wheat reported in the last years is surprising because the species was believed to be less aggressive than other FHB pathogens (AUDENAERT et al., 2009; XU and NICHOLSON, 2009). Symptoms induced by *F. poae* are different from those caused by *F. graminearum*, characterized by small necrotic lesions on the wheat glume (VOGELGSANG et al., 2008).

PANCALDI and colleagues (2010) emphasized the importance of *F. poae* in the disease, showing that the isolation frequency of the species in North Italy increased from 9 % to 23 % from 1998 to 2007. Moreover, in the years where the isolation frequency of *F.*

*poae* was high, *F. graminearum* was less often isolated; these observations are consistent with the research by PARRY et al. (1995).

Fumonisin are mycotoxins occurring in maize; fumonisin levels in corn are particularly high in Italy due to infection with thermophilic *F. verticillioides*. In wheat fumonisins have only occasionally been reported. In wheat plants artificially inoculated with *F. proliferatum* kernel black point symptoms were observed and fumonisin B1 was detected (DESJARDINS, 2007), indicating the potential of the fungus as natural contaminant in wheat fields. SHEPHARD et al. (2005) challenged the reports on fumonisins in wheat due to the occurrence of false positive signals when immunoaffinity cleanup, derivatization and fluorescence detection was used in fumonisin detection. More recent work, however, identified fumonisins in wheat unequivocally (e.g. PALACIOS et al., 2011; BUSMAN et al., 2012).

The aim of this work was to investigate the occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in durum wheat grain in Italy.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Experimental design

A three years field trial was established in the experimental station of the University of Bologna (Cadriano, 44°33'4.15"N; 11°24'39.02"E), using the durum wheat cultivar Simeto, which is susceptible to FHB. The plot was used for artificial inoculation with *F. graminearum* and *F. culmorum* for several years before the sampling. The field was divided in 4 plots (each plot was 3x3 m<sup>2</sup>) for 2008 till 2010, which served as replicates.

The first evaluation of FHB symptoms - typical bleaching in the spike - was made three weeks after anthesis on a representative sample of 100 spikes/plot.

Disease incidence was determined by counting the number of infected spikes divided by the total number (n=100) of evaluated spikes.

$$\text{Incidence(DI)} = \frac{\text{number of infected spikes}}{\text{total number of evaluated spikes}} \times 100$$

Disease severity of every spike was determined by using a classification methods modified by PURAHONG et al. (2011) that categorizes the bleached spikelet area per spike in percent in eight severity classes (0 - 2 - 5 - 10 - 25 - 50 - 75 - 90%). Disease severity per plot (DS) was seen as the sum of infected spikes times the disease class

divided by the total number of evaluated spikes in percent (including non-diseased spikes).

$$\text{Severity(DS)} = \frac{\sum_0^{90} \text{numberofinfectedspikes} \times \text{diseaseclass}}{\text{totalnumberofevaluatedspikes}} \times 100$$

Kernels of every plot were harvested at maturity with a combined harvester.

## 2.2 Mycological analysis and species identification

Mycological analyses were performed on 25 kernels per plot in 2008 and 2009 and 50 kernels per plot in 2010. Petri dishes, containing PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, USA) were set up with 10 kernels each, previously washed in water for 5 minutes, sterilized in 2% sodium hypochlorite for 5 minutes and rinsed in sterile water. Agar media with kernels were incubated at 25°C for five days in dark. All *Fusarium*-like colonies were analyzed for their micro- and macroscopical features by optical microscopy (Labor lux 12, Leitz Wetzlar, Germany). Species identification was performed using the synoptic keys by TOUSSOUN and NELSON (1976) and LESLIE and SUMMERELL (2006). To confirm the belonging of a fungus to the species morphologically identified, DNA extraction from mycelium was performed using a CTAB (exadecyl-trimethyl-ammonium bromide) method (PRODI et al., 2011).

PCR specific for *F. graminearum* and *F. poae* was carried out using primer pairs Fg16 F/R (NICHOLSON et al., 1998) and Fp82 F/R (PARRY and NICHOLSON, 1996), respectively. Amplification was done in a T3 thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) under conditions described in the literature cited above.

## 2.3 DNA extraction from wheat flour and real-time PCR analysis

The kernels from each plot (2 to 5 kg) were well mixed, 500 g aliquots were removed and ground. DNA extraction from 1 g of wheat flour was carried out following the upscaled protocol by BRANDFASS and KARLOVSKY (2008). The DNA was dissolved in 200 µl of buffer TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, adjusted to pH 8.0) and diluted 50 times, 1 µl of the dilutions was used as template for real-time PCR.

Real-time PCR based on SYBR Green I chemistry was used to evaluate the level of kernel infection with *Fusarium* spp. PCR specific for *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. poae*, *F. verticillioides* and *F. tricinctum* (Table 1).

Table 1. Primers used for species-specific quantification of *Fusarium* DNA

Fungal species	Primer name	Reference
<i>F. culmorum</i>	OPT18F /OPT18 R	SCHILLING et al., 1996
<i>F. graminearum</i>	Fg16 F/R	NICHOLSON et al., 1998
<i>F. poae</i>	Fp82 F/R	PARRY and NICHOLSON, 1996
<i>F. tricinctum</i>	Tri1/Tri2	KULIK, 2008
<i>F. proliferatum</i>	Fp3-F/Fp4-R	JURADO et al., 2006
<i>F. verticillioides</i>	VER 1/2	MULE et al., 2004

Serial dilutions of pure fungal DNA as standards were used, whereasthe lowest standards were used as limits of quantification, which was 28 ng/g for all *Fusarium* species. Amplification was done under conditions based on the protocols described by the authors of the primers (Table 3) optimized for thermocycler CFX 384 (Biorad, Herkules, CVA, USA) with 384-well plates. DNA standards were quantified by comparative densitometry using known amounts of lambda phage DNA (Biorad Multi-Analyst, Hercules CA, USA). Samples containing DNA below LOQ but with specific melting curve were allocated a value of ½ LOQ. Samples with unspecific melting curves were allocated a value of zero.

## 2.4 Mycotoxin analysis

Wheat meal was processed, extracted and defatted as described by ADEJUMO et al. (2007). HPLC-MS/MS for the content of DON and NIV was carried out as described below. Non-defatted acetonitrile extracts was kept at -20°C as counter samples. PCR analysis of DNA extracted from the flour carried out four to six years later indicated that kernels could also be contaminated with fumonisins and depsipeptides. Therefore, the counter-samples were re-analyzed for the presence of fumonisin B1, enniatins and beauvericin; because stability of these toxins in acetonitrile extracts over extended periods of time is unknown, the purpose of the analysis was to obtain a lower boundary for their concentration in kernels. Samples for the analysis of beauvericin and enniatins were processed by separating acetonitrile-water supernatants from flour by centrifugation, followed by drying supernatants in vacuum and redissolving the residues in methanol/water (1:1) without defatting. Samples for the analysis of fumonisin B1 were dried in vacuum, re-extracted with methanol/water (3:1) and cleaned up by SPE on

strong anion exchanger columns (SAX, Agilent, Waldbronn, Germany) according to SHEPHARD et al. (1990).

Standards for the quantification of DON and NIV were prepared by spiking uncontaminated wheat flour with pure mycotoxins and processing the spiked samples in the same way as unknown samples (matrix-matched standards). Chromatographic separation on a reverse-phase column, ionization and quantification in multiple reaction monitoring mode of a triple quadrupole detector (trichothecenes) and an ion trap detector (the other mycotoxins) was carried out on a system described by RATZINGER et al. (2009), using published mass transitions (RASMUSSEN et al., 2012; ADEJUMO et al., 2007). The limit of quantification (LOQ) was 10 µg/kg for DON, 30 µg/kg for NIV, 10 µg/kg for HT-2 and T-2, 5 µg/kg for DAS, 50 µg/kg for NEO, 3 µg/kg for fumonisin B1, and 14 µg/kg for beauvericin and enniatins. Limits of detection (LOD) values were 3 µg/kg for DON, 10 µg/kg for NIV, 5 µg/kg for HT-2 and T-2, 3 µg/kg for DAS, 20 µg/kg for NEO, 1 µg/kg for fumonisin B1, and 5 µg/kg for beauvericin and enniatins.

### 3. RESULTS

#### 3.3 Fungal colonization and mycotoxin content of kernels

In the years 2008 and 2010 the infection pressure was rather high while in 2009 only a limited incidence of FHB was observed (Figure 1). Disease severity was highest in 2010 and very low in 2009; in spite of the relatively high incidence of FHB in 2008, on the average only 5% of the spikes were bleached (Figure 1).

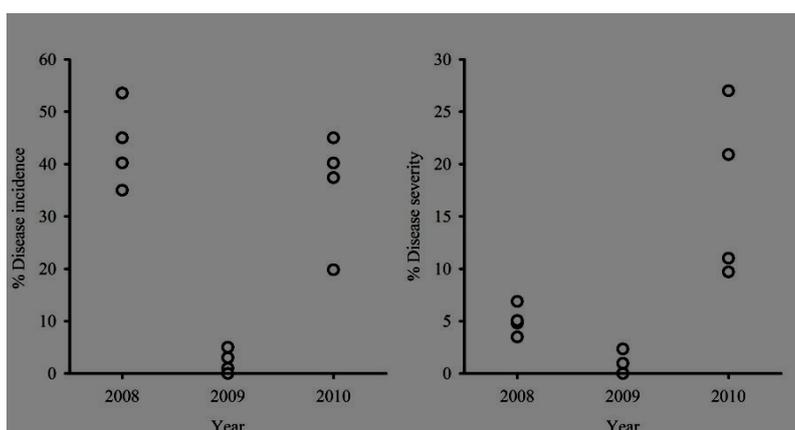


Figure 1. Incidence and severity of *Fusarium* head blight on Durum wheat cultivar Simeto grown in a field near Bologna, Italy.

Colonization of wheat kernels with *F. graminearum* as the major causal agent of FHB was investigated by placing 100 to 200 surface-sterilized kernels from each year's harvest on agar media and counting kernels from which *F. graminearum* isolates were obtained. The isolation frequencies (Table 2) matched the ranking of disease severity among years.

Table 2. Isolation frequency of *F. graminearum* from naturally infected wheat kernels

	2008	2009	2010
<i>F. graminearum</i>	18 (n=100)	2 (n=100)	51 (n=200)

The biomass of *Fusarium* spp. in wheat kernels was estimated by species-specific real-time PCR analysis of DNA extracted from representative samples of kernels. The analysis was carried out for the major pathogen of FHB *F. graminearum* and for the following species: *F. culmorum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* and *F. tricinctum* (Figure 2). *F. graminearum* and *F. culmorum* were found in high amounts in all three years (except for *F. culmorum* in 2009). *F. poae*, *F. proliferatum* and *F. tricinctum* occurred in 10 to 100 times lower amounts; no *F. verticillioides* was found in any sample.

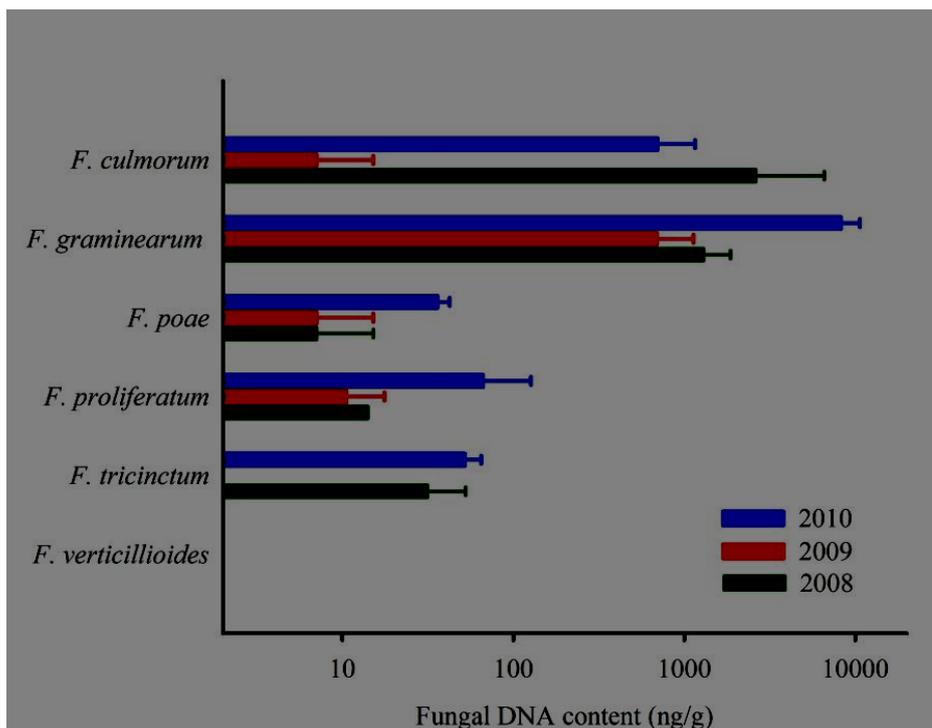


Figure 2. *Fusarium* DNA in naturally infected durum wheat kernels

Mycotoxins DON and NIV were found in all three years in amounts raising toxicological concerns (Figure 3); it has to be pointed out, however, that a strong inoculum of trichothecene B producers is likely to be established at the location due to long-year inoculation experiments (see also Discussion). Because PCR analysis revealed the presence of fumonisin and beauvericin producer *F. proliferatum* and enniatin producer *F. tricinctum*, the counter samples kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  were used to determine lower boundaries for concentrations of these toxins in kernels. Fumonisin B1 was found in all samples; four daughter ions generated from the molecular ion possessed the same m/z ratios and occurred in similar relative abundances as daughter ions of authentic fumonisin B1 standard (Figure 4). Together with the retention time and m/z value of the molecular ion, these results proved convincingly that fumonisin B1 was present in durum wheat kernels. The presence of beauvericin and enniatins A1, B and B1 was supported by their retention times, the molecular ions and three daughter ions for each analyte.

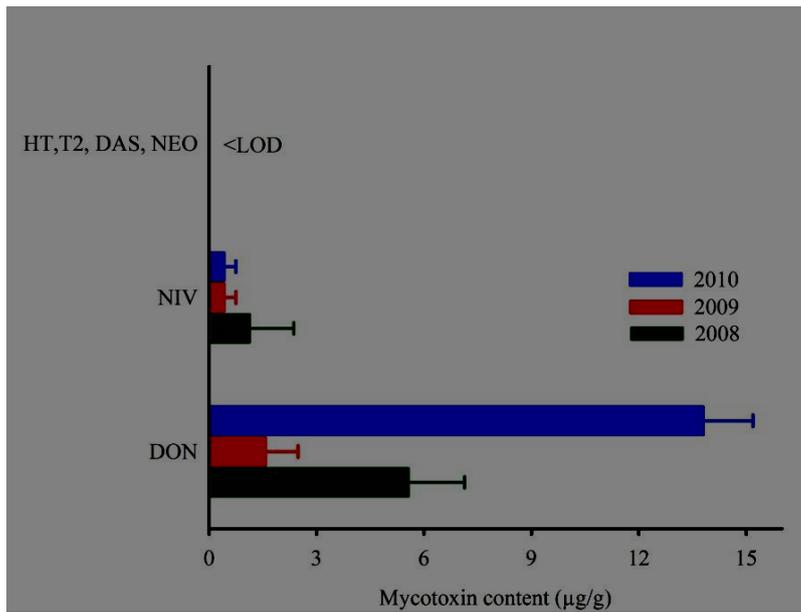


Figure 3. Deoxynivalenol and nivalenol in naturally infected durum wheat kernels

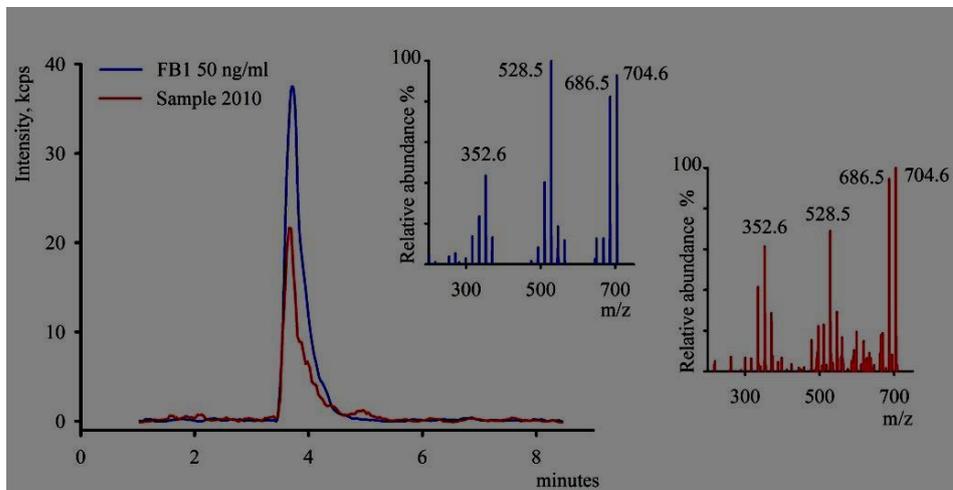


Figure 4. Fumonisin B1 in naturally infected durum wheat kernels

Identity of fumonisin B1 was confirmed by comparing authentic standard (blue) with sample extract (red) regarding retention time, m/z of the mother ion and fragmentation spectra

**Table 3: Lower boundary for the content of fumonisin B1, beauvericin and enniatins**

The content of fumonisins and depsipeptides was determined in samples that were stored for 4 to 6 years in acetonitrile-water at -20°C. Because stability of mycotoxins under these conditions is unknown, we regard the values as lower boundaries for mycotoxin content in freshly harvested kernels. Mean of four plots per year  $\pm$  standard deviation is shown except for enniatin B, for which all four values are listed. Limit of detection (LOQ) was 3 ng/g for fumonisin B1 and 14 ng/g for the other mycotoxins. "n.d.": signal not detectable; "<LOQ"; positive signals too low to be quantified.

	2008	2009	2010
Beauvericin [ng/g]	<LOQ	<LOQ	48 $\pm$ 19
Enniatin A [ng/g]	n.d.	n.d.	<LOQ
Enniatin A1 [ng/g]	62 $\pm$ 9	88 $\pm$ 14	46 $\pm$ 30
Enniatin B [ng/g]	3200, 3100, 73, 1900	3000, 3500, 5200, 2400	1030, 5200, 1100, 490
Enniatin B1 [ng/g]	390 $\pm$ 80	510 $\pm$ 140	140 $\pm$ 110
Fumonisin B1 [ng/g]	6.2 $\pm$ 3.4	5.3 $\pm$ 2.6	33 $\pm$ 18

## DISCUSSION

The original goal of our investigation of FHB of durum wheat in Italy was to obtain a deeper insight into the role of *F. poae*, which attracts increasing attention as a component of FHB complex and a source of highly toxic trichothecenes type A in general (STENGLEIN 2009) and in Italy in particular (PANCALDI et al. 2010, INFANTINO et al. 2012). Because the area sampled for our analysis was used for inoculation experiments with *F. graminearum* and *F. culmorum* in the last years, we expected a strong infection pressure of these pathogens due to inoculum originating from crop residues. Real-time PCR showed that *F. graminearum* was the dominant *Fusarium* species in wheat kernels (Figure 2). The presence of *F. culmorum* in itself was not surprising. The DNA levels appeared rather high, concerning the climate in Emilia Romagna and the displacement of *F. culmorum* by *F. graminearum* in the last decade (YLI-MATTILA 2010). We speculate that high levels of *F. culmorum* DNA can be accounted for by the inoculum built after years of inoculation experiments. *F. culmorum*, however, did not seem to contribute to the accumulation of trichothecenes in kernels (see below).

Colonization of kernels with *F. poae* was negligible: we found *F. poae* in very few kernels by agar plating (data not shown) and the content of *F. poae* DNA in kernels was much lower than the content of *F. graminearum* DNA (Figure 2). In line with these results, we have not found any of trichothecenes A typically produced by *F. poae* (Figure 3). The presence of *F. poae* in durum wheat might fluctuate, as shown by COVARELLI et al. (2015) who reported that over 20% of *Fusarium* isolates from durum wheat ears belonged to *F. poae* in 2009 but rarely any *F. poae* was found in the following year.

*F. tricinctum* DNA at moderate levels was found in wheat kernels in two years. Although the species is rarely monitored in FHB, according to published reports it dominated *Fusarium* microflora of wheat in Syria (ALKADRI et al., 2013) and was one of the dominant species in barley in UK NIELSEN et al., 2014).

qPCR analysis revealed the presence of DNA of *F. proliferatum* in all years. In year 2009, colonization of wheat kernels with *F. proliferatum* was comparable to the colonization with *F. culmorum* (Figure 2). *F. proliferatum* produces fumonisins, which are proven carcinogens in rodents and suspected carcinogens in humans. Contamination of wheat with fumonisins is therefore highly relevant for food safety. Fumonisins regularly occur in maize grown in warm climate; major fumonisin producer in maize are *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (FANDOHAN et al., 2003) with *F. verticillioides* often reported to dominate (REYES-VELAZQUEZ et al., 2011). While trichothecene content in wheat has been documented in hundreds of publications, fumonisins were only occasionally detected in wheat (DESJARDINS et al. 2007; PALACIOS et al., 2011; BUSMAN et al., 2012). Finding DNA of *F. proliferatum* in the total DNA extracted from wheat kernels motivated us to extend the analysis of mycotoxin content to fumonisins and beauvericin, which are both produced by *F. proliferatum*. We also analyzed the content of enniatins, which are produced by many *Fusarium* spp. including *F. tricinctum*, which we detected in wheat kernels in two years (Figure 2). Fumonisins were detectable in wheat kernels in all three years, though the biomass of *F. proliferatum* was hundred times lower than the biomass of *F. graminearum*.

In analogy to maize, the origin of fumonisins in wheat is generally attributed to *F. proliferatum* and *F. verticillioides*; the results reported by INFANTINO et al. (2012) indicated that *F. verticillioides* could be the major source of fumonisins in wheat in Italy. Our durum wheat samples were consistently contaminated with fumonisins but we

have not found any DNA of *F. verticillioides*. *F. proliferatum*, which was found in the kernels consistently in all three years, appeared to be the only source of fumonisin B1. *F. verticillioides* is ubiquitous in Italian maize fields; inoculum in form of airborne conidia likely reached wheat fields, too. We are confident that our qPCR analysis reliably distinguished between *F. proliferatum* and *F. verticillioides*. The primers targeted intergenic spacers of rRNA genes, which were shown to be taxonomically informative for the differentiation between the two species (VISENTIN et al., 2009), and they have been extensively tested before (NUTZ et al., 2011). Even if *F. verticillioides* can infect wheat seeds, as reported by INFANTINO et al (2012), fumonisins in wheat do not seem to originate from *F. verticillioides* because DESJARDINS et al. (2007) and BUSMAN et al. (2012) reported that *F. verticillioides* artificially inoculated into wheat did not produce any fumonisins, even though the isolates produced large amounts of fumonisins *in vitro* and in inoculated maize plants.

The DON and NIV levels in kernels reached toxicologically relevant levels in all three years. In 2008 and 2010 the amount of DON exceeded by a large margin the legal limit of 1,750 µg/kg for unprocessed durum wheat established by European Regulations EC n. 1881/2006 and EC n. 1126/2007. The high levels of DON can likely be accounted for by inoculation experiments carried out in the field with *F. graminearum* in last years, which cause build-up of inoculum on crop residues. Which Fusarium species was the source of DON and NIV in our samples? We found a significant positive correlation between the concentration of NIV and the amount of DNA of *F. graminearum* in kernels. DON concentration and *F. graminearum* DNA positively correlated, too, but the significance of the correlation was not statistically supported (data not shown). The amount of *F. culmorum* DNA in kernels has not correlated with NIV nor DON. We therefore assume that the source of trichothecenes in kernels was *F. graminearum*, which is in line with the view that *F. graminearum* is the major causal agent of FHB in Europe (YLI-MATTILA, 2010). The amount of DON in grain exceeded the amount of NIV by a factor of 4 to 10, which is in line with the observation that *F. graminearum* chemotypes producing DON and its derivatives dominate over NIV producers in wheat in North Italy (PRODI et al., 2009; PRODI et al., 2011).

High competitiveness of *F. graminearum* was reported by XU and NICHOLSON (2009) in co-inoculations *in vitro* trials in controlled environmental conditions. Wheat kernels in our samples were consistently colonized with *F. proliferatum* though they contained

high levels of *F. graminearum* DNA. Co-inoculation experiments with *F. proliferatum* have not been conducted in wheat so far. To elucidate the interaction of *F. proliferatum* and other minor members of the *Fusarium* complex on wheat kernels with *F. graminearum*, we intend to investigate individual ears and kernels for the presence of *Fusarium* species.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Stefano Borsari for his help in the preparation of the materials for the field experiments and Dr. Davide Pancaldi for his suggestions and comments as well as Heike Rollwage for technical assistance.

## REFERENCES

- ADEJUMO, T.O., HETTWER, U. & KARLOVSKY, P. 2007: Survey of maize from southwestern Nigeria for zearalenone, alpha- and beta-zearalenols, fumonisin B1 and enniatins produced by *Fusarium* species. *Food Addit. Contam.* 24, 993-1000.
- ALKADRI, D., NIPOTI, P., DOELL, K., KARLOVSKY, P., PRODI, A. & PISI, A. 2013: Study of fungal colonization of wheat kernels in Syria with a focus on *Fusarium* Species. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 5938-5951.
- AUDENAERT, K., BROECK, R. VAN, BEKAERT, B., WITTE, F. DE, HEREMANS, B., MESSENS, K., HOFTE, M. & HAESAERT, G. 2009: *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 445-458.
- BEYER, M., POGODA, F., PALLEZ, M., LAZIC, J., HOFFMANN, L. & PASQUALI, M. 2014: Evidence for a reversible drought induced shift in the species composition of mycotoxin producing *Fusarium* head blight pathogens isolated from symptomatic wheat heads. *Int. J. Food Microbiol.* 182-183, 51-56.
- 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.
- BUSMAN, M., DESJARDINS, A.E. & PROCTOR, R.H. 2012: Analysis of fumonisin contamination and the presence of *Fusarium* in wheat with kernel black point disease in the United States. *Food Addit. Contam., Part A* 29, 1092-1100.
- COVARELLI, L., BECCARI, G., PRODI, A., GENEROTTI, S., ETRUSCHI, F., JUAN, C., FERRER, E. & MAÑES, J. 2015: *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *J. Sci. Food Agri.* 95, 540-551.

- DESJARDINS, A.E., BUSMAN, M., PROCTOR, R.H. & STESSMAN, R. 2007: Wheat kernel black point and fumonisin contamination by *Fusarium proliferatum*. Food Addit. Contam. 24, 1131-1137.
- FANDOHAN, P., HELL, K., MARASAS, W.F.O. & WINGFIELD, M.J. 2004: Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. Afr. J. Biotechnol. 2, 570-579.
- INFANTINO, A., SANTORI, A. & SHAH, D.A. 2012: Community structure of the *Fusarium* complex on wheat seed in Italy. Eur. J. Plant Pathol. 132, 499-510.
- JURADO, M., VÁZQUEZ, C., MARÍN, S., SANCHIS, V. & TERESA GONZÁLEZ-JAÉN, M. 2006: PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. Syst. Appl. Microbiol. 29, 681-689.
- KLÖTZEL, M., LAUBER, U. & HUMPF, H.-U. 2006: A new solid phase extraction clean-up method for the determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals and cereal-based food by LC-MS/MS. Mol. Nutr. Food Res. 50, 261-269.
- KULIK, T. 2008: Detection of *Fusarium tricinctum* from cereal grain using PCR assay. J. Appl. Genet. 49, 305-311.
- LESLIE, J.F. & SUMMERELL, B.A. 2006: The *Fusarium* laboratory manual. 1st ed. Blackwell Pub, Ames, Iowa, 388 pp.
- MULÈ, G., SUSCA, A., STEA, G. & MORETTI, A. 2004: A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. Eur. J. Plant Pathol. 110, 495-502.
- NICHOLSON, P., SIMPSON, D.R., WESTON, G., REZANOOR, H.N., LEES, A.K., PARRY, D.W. & JOYCE, D. 1998: Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiol. Mol. Plant Pathol. 53, 17-37.
- NIELSEN, L.K., COOK, D.J., EDWARDS, S.G. & RAY, R.V. 2014: The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. Int. J. Food Microbiol. 179, 38-49.
- NUTZ, S., DOELL, K. & KARLOVSKY, P. 2011: Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. Anal. Bioanal. Chem. 401, 717-726.
- PALACIOS, S.A., RAMIREZ, M.L., CABRERA ZALAZAR, M., FARNOCHI, M.C., ZAPPACOSTA, D., CHIACCHIERA, S.M., REYNOSO, M.M., CHULZE, S.N. & TORRES, A.M. 2011: Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. J. Agric. Food Chem. 59, 12264-12269.
- PANCALDI, D., TONTI, S., PRODI, A., SALOMONI, D., PRA, M. DAL, NIPOTI, P., ALBERTI, I. & PISI, A. 2010: Survey of the main causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. Phytopathol. Mediterr. 49, 258-266.

- PARIKKA, P., HAKALA, K. & TIILIKKALA, K. 2012: Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29, 1543-1555.
- PARRY, D., JENKINSON, P. & MCLEOD, L. 1995: *Fusarium* ear blight (scab) in small-grain cereals - 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 Pathol.* 45, 383-391.
- PRODI, A., PURAHONG, W., TONTI, S., SALOMONI, D., NIPOTI, P., COVARELLI, L. & PISI, A. 2011: Difference in chemotype composition of *Fusarium graminearum* populations isolated from durum wheat in adjacent areas separated by the Apennines in Northern-Central Italy. *Plant Pathol. J.* 27, 354-359.
- PRODI, A., TONTI, S., NIPOTI, P., PANCALDI, D. & PISI, A. 2009: Identification of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from durum wheat in a restricted area of northern Italy. *J. Plant Pathol.* 91, 727-731.
- PURAHONG, W., ALKADRI, D., NIPOTI, P., PISI, A., LEMMENS, M. & PRODI, A. 2012: Validation of a modified Petri-dish test to quantify aggressiveness of *Fusarium graminearum* in durum wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 381-391.
- RASMUSSEN, P.H., NIELSEN, K.F., GHORBANI, F., SPLIID, N.H., NIELSEN, G.C. & JØRGENSEN, L.N. 2012: Occurrence of different trichothecenes and deoxynivalenol-3- $\beta$ -d-glucoside in naturally and artificially contaminated Danish cereal grains and whole maize plants. *Mycotoxin Res.* 28, 181-190.
- RATZINGER, A., RIEDIGER, N., TIEDEMANN, A. VON & KARLOVSKY, P. 2009: Salicylic acid and salicylic acid glucoside in xylem sap of *Brassica napus* infected with *Verticillium longisporum*. *J. Plant Res.* 122, 571-579.
- REYES-VELÁZQUEZ, W.P., FIGUEROA-GÓMEZ, R.M., BARBERIS, M., REYNOSO, M.M., ROJO, F.G.A., CHULZE, S.N. & TORRES, A.M. 2011: *Fusarium* species (section *Liseola*) occurrence and natural incidence of beauvericin, fusaproliferin and fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotoxin Res.* 27, 187-194.
- SCHILLING, A. 1996: Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86, 515.
- SHAH, 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.
- SHEPHARD, G.S., WESTHUIZEN, L. VAN DER, GATYENI, P.M., KATERERE, D.R. & MARASAS, W.F.O. 2005: Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *J. Agric. Food Chem.* 53, 9293-9296.
- SHEPHARD, G., SYDENHAM, E., THIEL, P. & GELDERBLUM, W. 1990: Quantitative determination of fumonisin-B1 and fumonisin-B2 by high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13, 2077-2087.

- STENGLLEIN, S.A. 2009: *Fusarium poae*: A pathogen that needs more attention. J. Plant Pathol. 91, 25-36.
- TOUSSOUN, T.A. & NELSON, P.E. 1976: *Fusarium*: A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. 2d ed. Pennsylvania State University Press, University Park, 43 pp.
- VISENTIN, I., TAMIETTI, G., VALENTINO, D., PORTIS, E., KARLOVSKY, P., MORETTI, A. & CARDINALE, F. 2009: The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. Mycol. Res. 113, 1137-1145.
- VOGELGSANG, S., SULYOK, M., HECKER, A., JENNY, E., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R. & FORRER, H.-R. 2008: Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. Eur. J. Plant Pathol. 122, 265-276.
- WILSON, A., SIMPSON, D., CHANDLER, E., JENNINGS, P. & NICHOLSON, P. 2004: Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. FEMS Microbiol. Lett. 233, 69-76.
- XU, X. & NICHOLSON, P. 2009: Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. In: Annu. Rev. Phytopathol. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 83-103.
- YLI-MATTILA, T. 2010: Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in Northern Europe and Asia. J. Plant Pathol. 92, 7-18.