

DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze e Tecnologie Agrarie Ambientali e
Alimentari

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 07/D1

Settore Scientifico disciplinare: AGR 12

Fusariosi della spiga dell'orzo: eziologia e
caratterizzazione di Fusaria produttori di
micotossine

Presentata da: MARTA GIANNINI

Coordinatore Dottorato

Prof. Giovanni Dinelli

Relatore

Dott.ssa Gloria Innocenti

Correlatori

Dott.ssa Paola Nipoti

Dott. Antonio Prodi

INDICE

ABSTRACT.....	1
INTRODUZIONE.....	3
ORZO	4
Destinazione d'uso dell'orzo	4
Caratteri botanici e biologici	6
FUSARIA	8
FUSARIOSI DELLA SPIGA DELL'ORZO	11
Epidemiologia e processo infettivo	12
Gestione della malattia	14
FUSARIOSI DEL PIEDE	16
Epidemiologia e fonti d'inoculo	17
MICOTOSSINE	18
Tricoteceni	20
Zearalenoni	22
SCOPO DELLA RICERCA.....	23
CAPITOLO I.....	25
MONITORAGGIO DELLA COMPONENTE FUNGINA ISOLATA DA CAMPIONI DI CARIOSSIDI DI ORZO PROVENIENTI DA DIVERSI AREALI NAZIONALI.....	25
RIASSUNTO.....	26
INTRODUZIONE	26
MATERLIALI E METODI.....	29
Campioni analizzati	29
Isolamento	30
Colture monosporiche	31
Estrazione DNA genomico delle colture monosporiche	31
Identificazione molecolare	33
Quantificazione delle micotossine DON e T-2/HT-2.....	35
RISULTATI	36
2011	36
2012	37
2013	39
DISCUSSIONE	41
CAPITOLO II.....	44

VALUTAZIONE DELLA FUSARIOSI DELLA SPIGA IN TRE CULTIVAR DI ORZO INOCULATE CON <i>F. GRAMINEARUM</i> , <i>F. CULMORUM</i> E <i>F. POAE</i> IN AMBIENTE CONTROLLATO E IN PROVE DI CAMPO.....	44
RIASSUNTO.....	45
INTRODUZIONE	45
Problematiche della FHB nell'industria maltaria e nella produzione della birra	46
MATERIALI E METODI	49
Produzione dell'inoculo.....	49
Prove in ambiente controllato e valutazione dei sintomi di FHB.....	50
Prove di campo	51
Analisi statistica.....	53
RISULTATI	54
Prove in ambiente controllato.....	54
Prove di campo	58
DISCUSSIONE	77
CAPITOLO III.....	81
COLONIZZAZIONE DI PIANTE DI ORZO DA PARTE DI <i>F. GRAMINEARUM</i> , <i>F.</i> <i>PSEUDOGRAMINEARUM</i> E <i>F. CULMORUM</i> IN AMBIENTE CONTROLLATO E TRASLOCAZIONE DELLA MICOTOSSINA DON.....	81
RIASSUNTO.....	82
INTRODUZIONE	82
<i>Fusarium culmorum</i>	83
<i>Fusarium graminearum</i>	85
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	86
MATERIALI E METODI.....	87
Coltivazione di piante di orzo.....	87
Preparazione dell'inoculo	87
Inoculazione.....	88
Rilievo fitopatometrico.....	89
Estrazione del DNA.....	90
Quantificazione assoluta del DNA tramite Real Time PCR.....	91
Quantificazione della micotossina DON	93
Osservazione al microscopio a scansione (SEM).....	93
Analisi statistica.....	94
RISULTATI	94
PROVA 1.....	94

Rilievo fitopatometrico.....	94
Quantificazione assoluta del DNA tramite Real Time PCR.....	95
<i>F. culmorum</i>	95
<i>F. graminearum</i>	96
<i>F. pseudograminearum</i>	97
Micotossina DON.....	98
Osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM).....	99
PROVA 2:	102
Rilievo fitopatometrico.....	102
Quantificazione assoluta del DNA tramite Real Time PCR.....	103
<i>F. culmorum</i>	103
<i>F. graminearum</i>	104
<i>F. pseudograminearum</i>	105
Micotossina DON.....	106
DISCUSSIONE	107
CONCLUSIONI.....	111
APPENDICE.....	114
ALLEGATO I	115
ALLEGATO II	117
BIBLIOGRAFIA.....	119
RINGRAZIAMENTI.....	132

ABSTRACT

Fusarium head blight (FHB) is a barley disease with a complex etiology which is caused by different toxigenic *Fusarium* species able to compromise the whole crop yield. Climatic conditions establish the predominance of one *Fusarium* species respect to the others. With the climate change in progress we are attending to a modification of fungal populations that evidence the importance of monitoring the presence of fungal species in the crop, to prevent mycotoxicosis, dangerous for humans and animals. Mycological analysis in barley kernel from different Italian regions has shown that *F. graminearum*, *F. poae* and *F. tricinctum* are the main species. A phytopathometric scale to evaluate FHB was set up in controlled conditions. That scale, practical and easy to use, was used in field trials, where FHB, yield and mycotoxin contamination were evaluated. Mycotoxin DON content was correlated to *F. graminearum* frequency.

Yield data of inoculated plots were not significant respect to the not inoculated ones, this implies that it is easy to find kernel contaminated by mycotoxins in food and feed, because infected grains are slightly lighter than those not infected and they are harvested and commercialized as well with serious consequences to public safety. For the first time on barley, with this study it was shown that after culm colonization of the plant by three toxigenic *Fusarium* spp., able to cause both FHB and FCR, DON mycotoxin can be transferred from the bottom to the head, whereas the presence of the fungi was with high level until the second node. This means that presence of *Fusarium* at base level contributes to the kernel contamination, additionally to FHB.

RIASSUNTO

La Fusariosi della spiga (FHB) dell'orzo è una malattia dall'eziologia complessa causata da specie fungine tossigene appartenenti al genere *Fusarium* in grado di compromettere interi raccolti. La predominanza di una specie di *Fusarium* rispetto ad un'altra dipende principalmente dal clima. Con i cambiamenti climatici in corso si sta assistendo ad una modificazione delle popolazioni fungine e per questo risulta fondamentale monitorare le specie fungine presenti in una determinata coltura, onde prevenire micotossicosi per l'uomo ed animali. Da analisi micologiche su granella di orzo proveniente da varie regioni italiane *F. graminearum*, *F. poae* e *F. tricinctum* sono risultate le specie più presenti. Prove in ambiente controllato hanno consentito di mettere a punto una scala fitopatometrica per la valutazione di FHB. Tale scala risulta pratica e facilmente applicabile ed è stata utilizzata per le prove di

campo. In queste prove oltre a FHB sono stati valutati altri parametri quali produzione e contaminazione da micotossine. Il contenuto di micotossina Deossinivalenolo è correlata alla frequenza di *F. graminearum* su granella. I dati produttivi delle tesi inoculate non sono apparsi significativamente distinti dalle tesi non inoculate, facendo dedurre che granella contaminata da micotossina possa facilmente ritrovarsi nelle derrate alimentari, in quanto le cariossidi infette, solo lievemente più leggere di quelle sane, vengono ugualmente raccolte e commercializzate con serie conseguenze per l'industria mangimistica e alimentare. Con il presente lavoro si è dimostrato per la prima volta che per effetto della colonizzazione di culmi di piante di orzo da parte di tre specie *Fusarium*, responsabili sia della fusariosi del piede che della spiga, la micotossina DON può traslocare dalla base delle piante fino alla spiga, mentre la presenza dei funghi è rilevata da alte concentrazioni fino al secondo nodo. Da questo emerge che la presenza di *Fusarium* a livello basale contribuisce alla contaminazione della granella, oltre a quella dovuta ad FHB.

Parole-chiave

Orzo, cariossidi, componente fungina, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, FHB, sintomatologia, DON, T-2/HT-2, FCR, Real Time PCR, traslocazione DON.

INTRODUZIONE

ORZO

L'orzo (*Hordeum vulgare* L.) è tra le prime otto specie botaniche ad essere stata domesticata (Zohary et al., 2012). Da oltre 10.000 anni l'orzo è coltivato per la produzione alimentare e mangimistica (Harlan, 1995).

Si ritiene che il suo progenitore *H. vulgare* L. ssp. *spontaneum* C. Koch sia originario di un areale corrispondente al Medio Oriente e alle regioni limitrofe del Nord Africa. Dopo la sua domesticazione, fenomeni migratori e commerci difficilmente identificabili hanno rapidamente diffuso la coltura fuori dalla sua zona di origine. Il risultato è stato lo sviluppo di varietà locali adattate agli areali del Nord e dell'Est Europa ed in seguito anche del Nord America, Australia e Sud Africa (Ellis, 2002). L'orzo è quindi una coltura che facilmente si adatta a diverse tipologie di areali. È coltivato dall'equatore fino al 65° parallelo di latitudine Nord e fino al 50° parallelo di latitudine Sud, dagli ambienti marittimi fino ai pendii montani (Baldoni & Giardini, 1989).

L'orzo è la quarta coltura cerealicola al mondo per superficie coltivata, dopo frumento, mais e riso ricoprendo circa il 7% della superficie mondiale (dati FAOSTAT, 2013). In Europa, è la seconda coltura cerealicola più diffusa ed in Italia è la terza dopo frumento e mais (dati FAOSTAT, 2014). Nella Figura 1 viene riportata la variazione percentuale di superficie dedicata in Italia ai principali seminativi durante l'annata agraria 2014-2015 rispetto all'annata precedente, ripartita per aree geografiche. Nel 2013, in Italia, l'orzo occupava una superficie coltivata pari a 274.106 ettari, con una produzione di circa oltre 9,3 milioni di quintali (MiPAAF, 2013). Le regioni più importanti per questa coltura sono Emilia Romagna (oltre 30.000 ha), Umbria (oltre 24.000 ha), Basilicata (oltre 23.000 ha), Marche (oltre 21.000 ha) e Lombardia (20.000 ha) (stime AGRIT 2013). I primi cinque Paesi produttori di orzo a livello mondiale, nel periodo 1993-2013, risultano essere stati Russia, Germania, Canada, Francia e Ucraina (Figura 2).

Destinazione d'uso dell'orzo

L'orzo viene convenzionalmente suddiviso in tipologie in funzione dell'uso (zootecnico, maltario e per alimentazione umana), dell'*habitus* (autunnale, primaverile o alternativo), del numero di file di spighe, 6-, 4- o 2-file (rispettivamente esastico, tetrastico e distico), della cariosside (nuda o vestita) e in base al rapporto amilosio/amilopectina dell'amido.

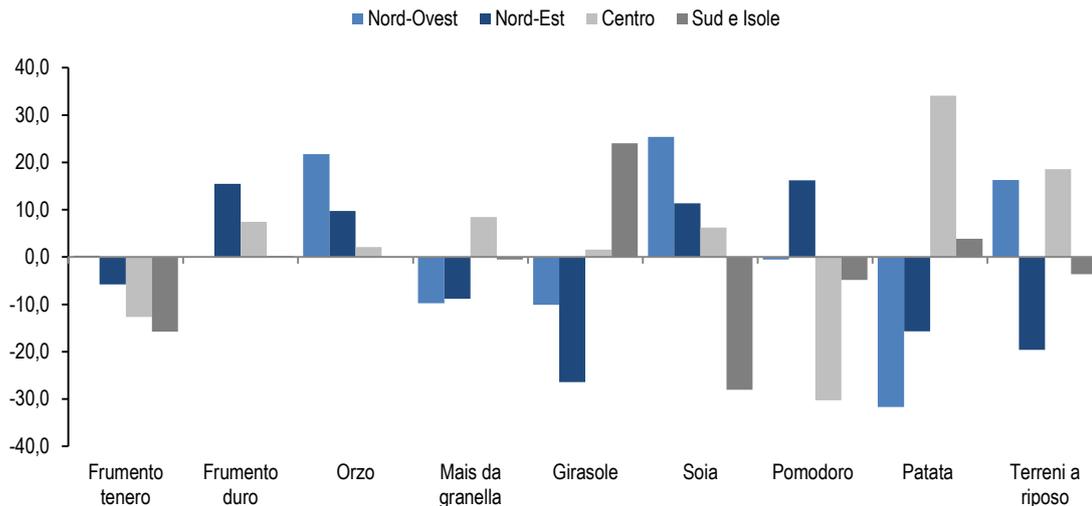


Figura 1: Variazione percentuale rispetto all’annata agraria 2013-2014 della superficie italiana destinata ai principali seminativi, per ripartizione geografica nell’ annata agraria 2014-2015. (Fonte ISTAT).



Figura 2: Produzione media di orzo nel periodo 1993-2013 a livello mondiale (Fonte FAOSTAT).

La destinazione d’uso dell’orzo varia in funzione della varietà coltivata. Le varietà esastiche sono generalmente utilizzate per la produzione di mangimi zootecnici, perché hanno un contenuto di proteine superiore rispetto alle varietà distiche (FAO, 2009).

Le varietà distiche, invece, sono tendenzialmente utilizzate dall’industria di trasformazione per la produzione di malto, perché sono più omogenee per dimensioni, hanno un contenuto di proteine inferiore e una maggiore quantità di amido utilizzabile nella produzione della birra (Shewry, 1992).

È stato stimato che circa l’85% della produzione mondiale di orzo sia destinata all’alimentazione animale, la parte restante alla produzione di malto, all’industria sementiera e all’alimentazione umana, ma anche alla produzione di amido per l’industria sia alimentare sia

chimica (Fischbeck, 2002). Inoltre, in paesi come Marocco, India, Cina e Etiopia l'orzo è ritenuto un'importante coltura per l'alimentazione quotidiana (Bekele et al., 2001; Ceccarelli et al., 1999).

Caratteri botanici e biologici

L'orzo è una poacea della tribù *Hordeae* appartenente al genere *Hordeum*.

All'interno di questo genere si ritrovano più specie:

- 1) *Hordeum vulgare* L. a cui appartengono i gruppi polistici (*H. tetrasticum* ed *H. exasticum*).
- 2) *H. disticum* L. la cui forma spontanea è rappresentata da *H. spontaneum* C. Koch dell'Africa settentrionale e dell'Asia sud-occidentale.
- 3) *H. irregulare* A.W., una forma trovata in Etiopia, probabile zona di origine dell'orzo.

È una pianta erbacea annuale che a maturità raggiunge altezze fra 60 e 150 cm, a seconda delle *cultivar*. L'apparato radicale è di tipo fascicolato. Ha origine da radici seminali o primarie, che si sviluppano formando una massa ramificata fibrosa e si estendono in profondità. Il sistema radicale avventizio si forma successivamente alla base della corona. Il culmo è cilindrico privo di midollo e, a fine crescita, è costituito da internodi cilindrici vuoti, in numero da 5 a 8, separati da setti trasversali. Per ogni pianta accestiscono in genere diversi culmi. Le foglie dell'orzo si differenziano da quelle degli altri cereali, per la presenza di grandi auricole, mentre la ligula non è appariscente, ridotta ad una piccola escrescenza papiracea senza colore. La pagina inferiore della lamina fogliare è liscia, in quella superiore sono presenti scanalature. La foglia terminale, detta "bandiera", è la più piccola e nello stadio di "botticella" contiene generalmente la spiga all'interno della guaina. L'infiorescenza è una spiga composta da un rachide a zig-zag, composta da un numero variabile di nodi (da 10 a 30). In corrispondenza di ogni internodo sono inserite tre spiglette uniflore. Nelle forme esastiche tutti i fiori sono fertili, invece in quelli distici solo il fiore centrale lo è, cosicché, in questa tipologia, la spiga matura presenta solo due file di cariossidi. Ogni spigletta porta ai lati due glume sterili con all'interno i fiori. Ciascun fiore nasce all'ascella di una brattea (gluma inferiore o lemma) che assomiglia alla gluma ed ha la funzione di proteggere l'organo riproduttivo. La lemma presenta una nervatura mediana che termina con la resta. Opposta alla lemma c'è la glumetta superiore (o palea), che è portata dal peduncolo fiorale racchiudente il fiore. La palea risulta più piccola della lemma da cui è avvolta. Palea e lemma a maturazione avvolgono la cariosside. Fanno eccezione le varietà a seme nudo (Baldoni & Giardini, 1989).

Il fiore, ermafrodita, è formato da tre stami e due stimmi pelosi; sono presenti anche due lodicole (Figura 3). Le cultivar di orzo possono avere un tipo di fioritura sia casmogama (a fiore aperto come il frumento), sia cleistogama (a fiore chiuso) (Briggs, 1978; Yoshida et al., 2005). La fioritura inizia dalla parte centrale della spiga, procede in entrambe le direzioni e finisce in 4 giorni. L'impollinazione può avvenire mentre la spiga si trova ancora avvolta nella guaina della foglia a bandiera (fase di botticella), oppure 3 a 4 giorni dopo la spigatura. Nell'orzo casmogamo, il polline viene sparso al momento dell'allungamento del filamento o anche prima. In quelli cleistogami, viene prima rilasciato il polline poi il filamento si allunga rimanendo all'interno dell'infiorescenza chiusa. In alcune cultivar le antere rimangono all'interno delle infiorescenze, mentre in altre vengono estroflesse all'apice della palea e del lembo fornendo una via di entrata per i funghi (Bushnell et al., 2003).

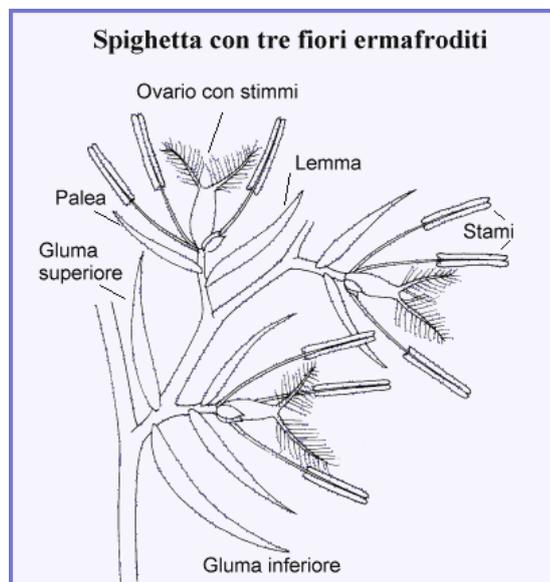


Figura 3: Tipica infiorescenza poacee . (Fonte: <http://www2.units.it/biologia/gram/chars.htm>)

Il frutto è una cariosside dove il seme è strettamente saldato con il pericarpo, costituito da un solco centrale, più o meno marcato e da un'appendice apicale (rachilla), che può essere più o meno pelosa (Baldoni & Giardini, 1989).

Il ciclo vegetativo è simile a quello del frumento e le fasi principali sono: germinazione, accestimento, levata, fioritura e maturazione.

Il ritmo di crescita è influenzato da fattori ambientali e dall'epoca di semina (autunnale o primaverile). In un primo momento la crescita è lenta per permettere alle piantine di affrancarsi e di formare gli accestimenti (l'indice di accestimento è in genere superiore a

quella del frumento). Mentre, nel periodo della levata, la crescita è addirittura più rapida rispetto al frumento.

La fioritura comincia dalle spighe centrali, spesso quando la spiga è ancora in botticella, con stami emersi o meno. Nelle forme polistiche tendono a fiorire prima le spighe della fila mediana rispetto a quelle laterali.

L'aumento di sostanza secca, che si verifica dal momento dell'antesi, è dovuto al granello che si accresce. L'ultimo organo a cessare di crescere è la cariosside, che può persino perdere di peso prima della maturazione.

Il periodo dalla fioritura varia di solito da 20 a 30 giorni, a seconda della stagione. Come per il frumento, ci sono tipi di orzo autunnali che, se seminati in primavera, emettono solo foglie e non spiga, poiché per indurre la formazione della spiga necessitano di una fase di vernalizzazione a basse temperature.

Il ciclo biologico dell'orzo è più breve di quello del frumento e la granella può giungere a maturazione prima delle alte temperature estive (Baldoni & Giardini, 1989).

FUSARIA

La maggior parte delle specie del genere *Fusarium* appartiene all'ordine *Hypocreales*, con forma telomorfa nel genere *Gibberella*, ma un numero più ristretto di *Fusarium* ha telomorfo nei generi *Hemanectria* e *Albonectria* (Leslie & Summerell, 2006).

Le specie del genere *Fusarium* sono molto diffuse in natura e sono sia specie patogene, sia saprofiti (Liddell, 1991). La maggior parte è patogena di piante fra cui i cereali e possono essere isolate da parti diverse della pianta, dai residui colturali e dal suolo (Summerell et al. 2003). Leslie e Summerell (2006) hanno riportato che almeno 80% di tutte le piante coltivate sono associate ad una malattia provocata da una specie di *Fusarium*. Alcune specie possono essere patogene anche per l'uomo e gli animali.

L'infezione da *Fusarium* può verificarsi in qualsiasi stadio dello sviluppo della pianta, dal seme alla maturazione e ciò dipende dalla specie di *Fusarium* coinvolta e dalla pianta ospite. Varie specie di *Fusarium* possono coesistere nella stessa pianta provocando malattie dall'eziologia complessa e inoltre possono produrre metaboliti secondari, quali le micotossine (Logrieco et al., 2007). Una precoce e precisa identificazione di *Fusarium* spp. nei vari stadi di sviluppo della pianta è essenziale per determinare il potenziale rischio tossigeno. L'identificazione e la classificazione di *Fusarium* risulta essere difficoltosa: il genere *Fusarium* consta di un elevato numero di specie (ad ora oltre 80) ed è in continua evoluzione

da un punto di vista tassonomico (Leslie & Summerell, 2006), questa continua evoluzione porta non poche controversie tra i ricercatori (Asan, 2011). Questo genere presenta alcune peculiari caratteristiche morfologiche utili per identificare, con una certa esperienza, le diverse specie. Ad esempio, le caratteristiche fenotipiche della colonia, dei macroconidi, microconidi, clamidospore e altri parametri microscopici sono utili per identificare le più importanti specie di *Fusarium* (Dongyou, 2009).

I macroconidi di *Fusarium* spp. hanno forma tipica a falce e sono multi-settati, mentre i microconidi, a morfologia variabile, possono essere costituiti da una o due cellule (Leslie & Summerell, 2006). La produzione di spore agamiche quali i macroconidi dalla tipica forma a falce, è considerata caratteristica molto utile per l'inquadramento della specie nel genere *Fusarium* (Moretti, 2009). I macroconidi settati sono prodotti sul micelio aereo sia da mono- e poli-fialidi e sia da strutture specializzate su corti mono-fialidi, chiamate sporodochi (Hawksworth & Pitt, 1983) (Figura 4).

L'altra caratteristica utilizzata per il riconoscimento della specie sono i microconidi, che possono variare per forma e dimensioni e sono prodotti sul micelio aereo, in gruppi o catene, sia su mono-fialidi sia su poli-fialidi (Figura 4).

In alcune specie sono presenti le clamidospore, strutture di resistenza costituite da spesse pareti ed alto contenuto di lipidi, che sono formate da porzioni ifali (Figura 5).

I tassonomi suggeriscono, come corretta prassi per l'identificazione della specie, l'uso di colonie ottenute dallo sviluppo di singole spore, coltivate su appositi terreni in condizioni ottimali (Dongyou, 2009).

L'impiego dei metodi basati sull'analisi del DNA ha causato una vera e propria rivoluzione nella tassonomia del genere *Fusarium*, dimostrando una diversità all'interno del genere che era stata sottostimata (O'Donnell, 2000). L'analisi filogenetica molecolare recentemente proposta è stata utilizzata da molti ricercatori; tuttavia, molte relazioni filogenetiche rimangono poco chiare per via del ridotto numero di analisi filogenetiche complete eseguite per questo genere di funghi (Watanabe et al., 2011).

Per l'analisi filogenetica vanno sequenziate regioni di DNA: in *Fusarium*, il gene del fattore di elongazione della trascrizione 1- α (TEF), che codifica una parte essenziale del meccanismo di traduzione di proteine, è stato scelto come strumento per l'identificazione a livello di un unico *locus* (Geiser et al., 2004). Geiser et al. (2004) hanno realizzato ID *Fusarium* v.1.0, la prima versione della banca dati di sequenze del gene TEF di *Fusarium* spp. accessibile al pubblico, che funziona allineando le sequenze in formato FAST su un server BLAST,

accessibile dall'indirizzo <http://isolate.fusariumdb.org/index.php>. Ad oggi in ID *Fusarium* sono presenti oltre 5.740 sequenze inserite.

Sono stati sviluppati inoltre primer specie-specifici per PCR, che però, nella maggior parte dei casi, hanno bisogno di essere più ampiamente testati, in particolare per l'analisi dei ceppi di colture e/o aree geografiche diverse (Rahjoo et al., 2008). Molti ricercatori usano PCR specie-specifiche per identificare alcune specie di *Fusarium* come, ad esempio, *F. culmorum* e *F. graminearum* (Nicholson et al., 1998), *F. poae* (Parry & Nicholson, 1996) e *F. pseudograminearum* (Aoki & O'Donnell, 1999).

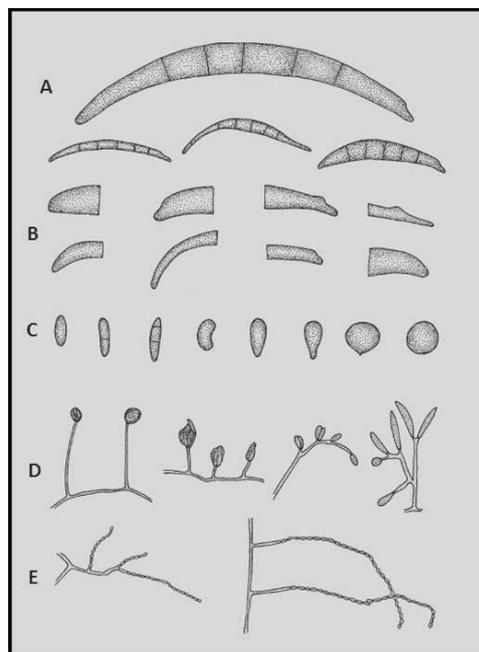


Figure 4: Morfologia di spore per l'identificazione di *Fusarium* spp.

A: Macroconidi; B: cellule apicali e basali di macroconidi; C: microconidi; D: fialidi; E: catene di microconidi (Leslie & Summerell, 2006.)

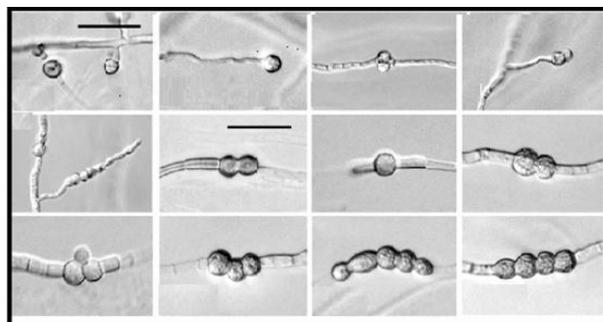


Figure 5: Clamidospore di specie di *Fusarium* (Leslie & Summerell, 2006).

FUSARIOSI DELLA SPIGA DELL'ORZO

Sono molteplici i patogeni in grado di attaccare la coltura dell'orzo nelle diverse fasi di sviluppo della pianta. I danni che derivano dall'attività fitopatogena, vanno ad incidere, seppur in modo diverso, sulla resa e sulla qualità della granella prodotta (Alberti & Pancaldi, 2011). Tra i patogeni fungini di maggiore interesse per l'orzo si annoverano: *Cochliobolus sativum* Ito & Kurib [*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker sin. *Helminthosporium sativum* Pammel, King & Bakke] (anamorfo di *Drechslera sorokiniana*), *Rynchosporium secalis* (Oudem), *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* sin. *Erysiphe graminis* D.C. f. sp. *hordei* Marchal), *Puccinia hordei* Otth., *Pyrenophora teres* Drechsler. (anamorfo *Drechslera teres* Shoemaker), *Pyrenophora graminea* Ito & Kuribay (anamorfo di *Drechslera graminea* Shoemaker), *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr. (sin. *Ustilago tritici*), *Ramularia collo-cygni* B. Sutton & J. M. Waller (Rcc.).

Oltre a questi patogeni, sono da annoverare alcune specie appartenenti al genere *Fusarium*, responsabili della fusariosi della spiga e del piede.

Il numero di studi che riguardano la fusariosi della spiga del frumento è molto maggiore rispetto a quello degli studi condotti sulla medesima malattia dell'orzo. Questo è giustificato dal maggiore impatto economico che la coltura del frumento ha nell'economia mondiale (Steffenson, 2003). La fusariosi della spiga (FHB) è una delle più devastanti e insidiose malattie dell'orzo (Tekauz et al., 2000). Intorno agli anni '90, nella regione del Midwest degli Stati Uniti d'America, si è verificata un'epidemia di FHB che ha determinato ingenti perdite economiche dovute alla impossibilità di impiegare il cereale nell'alimentazione umana ed animale. L'epidemia è stata tanto rilevante che per numerosi anni nell'area non è stato possibile produrre malto di qualità premium (Steffenson, 2003). FHB è comparsa nuovamente nelle ultime decadi ed è uno dei principali fattori di riduzione della quantità e della qualità della granella in diversi areali di coltivazione del Nord America, Sud America, Europa ed Asia (Steffenson, 2003; Yli-Mattila, 2010). In Italia non ci sono studi in bibliografia sulla fusariosi della spiga dell'orzo.

Questa fitopatia è causata da diverse specie del genere *Fusarium*, tra cui le principali sono *F. graminearum* Schwabe (teleomorfo: *Gibberella zeae*), *F. culmorum* (Wm. G. Smith.) Sacc., *F. avenaceum* Sacc. (teleomorfo: *Gibberella avenaceum*), *F. tricinctum* (Corda) Sacc. (teleomorfo: *Gibberella tricincta*), *F. sporotrichioides* Scherb., *F. langsethiae* Torp & Nirenberg e *F. poae* (Peck) Wollenw. e da *Microdochium nivale* (Fries) (Edwards, 2007; Goswami & Kistler, 2004; Linkmeyer et al., 2015; Parry et al., 1995; Salas et al., 1999).

Alcune specie di *Fusarium* sono note per produrre micotossine pericolose per la salute umana ed animale (Bottalico & Perrone, 2002). La predominanza di una specie di *Fusarium* rispetto ad un'altra nel causare la malattia in un determinato areale dipende principalmente dal clima, pertanto, può cambiare da un anno all'altro all'interno delle regioni e tra le regioni.

La comparsa dei sintomi della fusariosi della spiga sulla maggior parte delle piante ospiti, avviene nel periodo compreso tra la spigatura e la maturazione latteo-cerosa. L'alterazione può riguardare sia poche spighe, che appaiono decolorate e disseccano precocemente, sia l'intera spiga che, in caso di infezioni più gravi, può presentarsi totalmente sbiancata (Belli et al., 2012). In orzo i sintomi appaiono come poche spighe decolorate casualmente distribuite lungo la spiga e generalmente singole (Tekauz et al., 2000). Il colore delle cariossidi infette, a differenza di quanto avviene nel frumento, tende nelle prime fasi ad un imbrunimento, piuttosto che ad uno sbiancamento, inoltre la presenza di sporodochi è rara (Tekauz et al., 2000).

La diffusione di questa malattia è determinata da diversi fattori, tra cui i principali sono legati alle condizioni ambientali, ma anche alle pratiche agronomiche (Edwards, 2007).

Epidemiologia e processo infettivo

Sono tre i principali fattori che influenzano il rapporto tra ospite (orzo) e patogeno (*Fusarium* spp.): il genoma di entrambi, l'interazione reciproca e l'ambiente. Quest'ultimo influenza sia la fase vegetativa, sia quella riproduttiva del patogeno e quindi 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 molecolare per poter comprendere i processi coinvolti nello sviluppo della malattia (Stenglein, 2009).

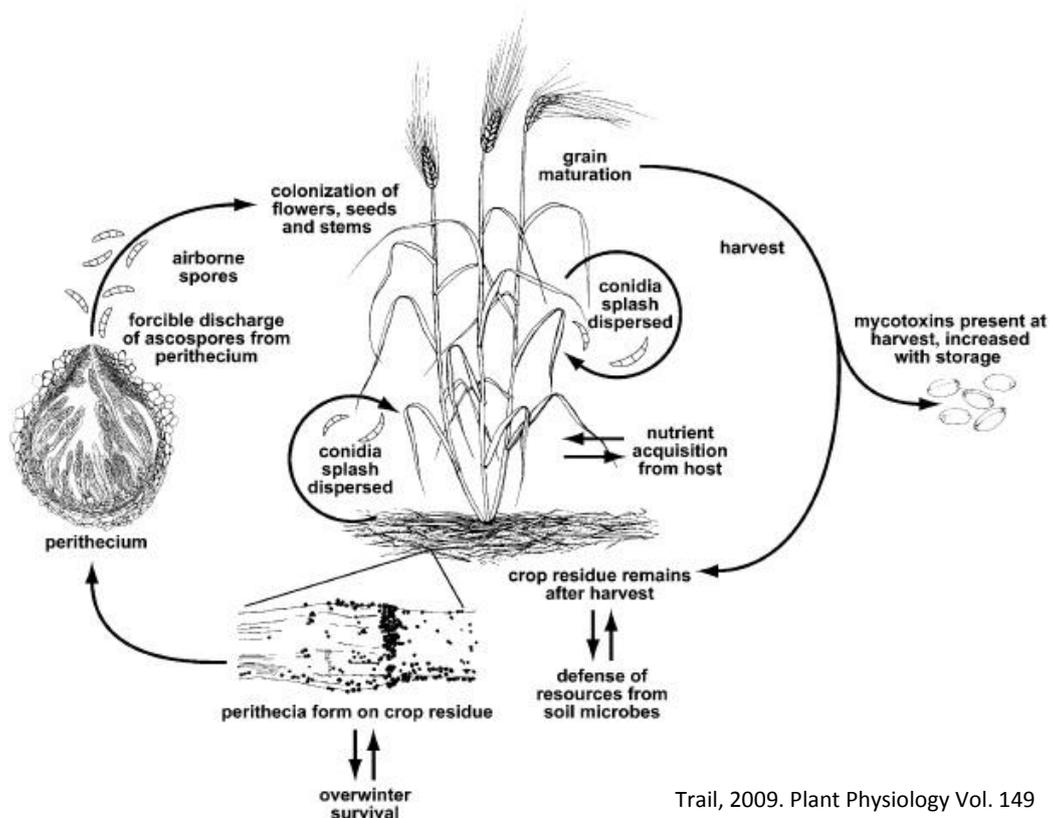
In orzo è ben documentato da vari lavori, che l'antesi rappresenta lo stadio di sviluppo della pianta più suscettibile all'infezione di *Fusarium* (Steffenson, 2003; Yoshida et al., 2008). Ciò ha fatto supporre che le antere contengano sostanze in grado di stimolare la crescita delle ife fungine. Strange e Smith (1978) hanno infatti dimostrato che queste sostanze sono betaina e colina; ma l'antesi, non è l'unico stadio di sviluppo in cui l'ospite può essere infettato.

L'orzo può essere infettato da *Fusarium* già nella fase di "botticella" in cui le spighe sono completamente avvolte dalla guaina della foglia a bandiera e anche quando le infiorescenze emergono appena dalla guaina (Prom et al., 1999).

Il processo infettivo primario si compie in un solo ciclo all'anno (Figura 6) ed inizia con il deposito delle ascospore o di altri propaguli, trasportati dall'aria, dalla pioggia e da insetti, sui

i tessuti delle spighe: le ife si sviluppano dapprima sulla superficie esterna dei fiori e delle glume, successivamente penetrano nelle aperture tra lemma e palea di spiglette deiscienti, dove i tessuti sono più sottili (Bushnell et al., 2003; Parry et al., 1995). Una volta che il fungo si è stabilito nell'ovario, nelle lodicole o sulla base della palea e del lemma, si può diffondere tramite il tessuto vascolare fino alla rachilla e al rachide. La formazione della cariosside può essere compromessa parzialmente o totalmente, oppure la spiga infetta produce granella striminzita (Meriggi et al., 2006). In orzo, rispetto a frumento, la diffusione da nodo a nodo è più limitata e la modalità meno studiata (Bushnell et al., 2003).

Sebbene macroconidi, ascospore, frammenti di ife e clamidospore ricoprono tutti un ruolo nella diffusione della malattia (Sutton, 1982), la maggior parte delle prove è stata condotta con l'inoculazione dei macroconidi (Bushnell et al., 2003). Questa modalità di infezione è equivalente a quella eseguita con ascospore (Scholz & Steffenson, 2001; Stack et al., 1989), le quali hanno una parete adesiva che bene aderisce alla superficie della pianta (Bushnell et al., 2003), mentre la parete dei macroconidi di *F. culmorum* è costituita da una guaina mucillaginosa, la quale potrebbe contribuire alla idrofilicità dei conidi (Marchant, 1966 a, 1966 b) o svolgere una funzione nutrizionale (Marchant & White, 1966).



Trail, 2009. Plant Physiology Vol. 149

Figura 6: Ciclo biologico di *F. graminearum*.

Nel complesso, il successo dell'infezione dipende dalla combinazione di più fattori tra cui il clima, l'umidità dell'aria (Xu, 2003), la suscettibilità della cultivar (Wagacha & Muthomi, 2007) ed un'eccessiva concimazione azotata (Doohan et al., 2003). L'abbondanza dell'inoculo primario e le condizioni climatiche, principalmente temperatura e umidità durante lo stadio di antesi, concorrono a determinare la gravità di malattia della FHB (Bai & Shaner, 2004).

I danni provocati da FHB sulla produzione sono di tipo quali-quantitativo: riduzione della qualità della cariosside dovuta alla modificazione della parete cellulare, alterazione della frazione lipidica e riduzione di quella proteica, riduzione della germinabilità e del peso delle sementi con conseguente perdita di produzione, contaminazione da micotossine. Tutto ciò comporta difficoltà nel commercializzare ed esportare il prodotto con conseguenti perdite economiche (Goswami & Kistler, 2004). In generale, poiché non necessariamente la granello affetta da *Fusarium* appare molto più piccola, più sottile o striminzita, per questa ragione il livello di contaminazione da micotossine può essere superiore a quello previsto da un giudizio visivo (Prom et al., 1996; Tekauz & McCallum, 1998, 1999; Tekauz et al., 2000).

Gestione della malattia

La fusariosi della spiga è una delle malattie più difficili da gestire in orzo (Steffenson, 2003). Le principali strategie per il controllo della malattia sono: idonee pratiche colturali, trattamenti fungicidi, uso di piante tolleranti e controllo biologico.

L'inoculo primario, in genere costituito da ascospore, si diffonde in campo a partire dai residui colturali infetti. Per questa ragione è buona pratica effettuare, alla fine di ogni ciclo colturale, profonde lavorazioni del terreno, così da interrare i residui vegetali che altrimenti contribuirebbero alla sopravvivenza dell'inoculo. Altra buona pratica è la rotazione colturale, prevedendo l'inserimento di colture considerate non ospiti delle specie di *Fusarium* responsabili della FHB, come ad esempio soia, fagioli, girasole al fine di ridurre la densità di inoculo primario presente nel terreno (Dill-Macky & Jones, 2000).

Altra strategia di lotta alla fusariosi della spiga è l'uso di fungicidi sistemici da applicare come concia al seme o alla pianta (Alberti & Pancaldi, 2011). I principi attivi appartengono alla classe dei triazoli: tebuconazolo, epossiconazolo, bromuconazolo, proticonazolo ed imazalil. Queste molecole agiscono sul metabolismo dei lipidi inibendo la sintesi degli steroli, componenti fondamentali della membrana cellulare, di conseguenza viene modificata la permeabilità della membrana con ripercussioni negative sull'assorbimento dei nutrienti che si riduce lentamente fino ad arrestarsi (Gennari & Trevisan, 2008).

I triazoli sono considerati i fungicidi più efficaci per ridurre il livello delle micotossine DON e NIV (Ioos et al., 2005). Tuttavia le complesse relazioni tra fungicidi, sviluppo della malattia, composizione dell'inoculo e accumulo di micotossine, rende difficoltosa la valutazione dell'efficacia del trattamento.

In uno studio condotto da Edwards e Godley (2010) su avena, è stata testata l'efficacia del proticonazolo applicato in diversi tempi ed è emerso che il prodotto si è rivelato efficace solo quando le condizioni ambientali erano prevalentemente secche, poiché le piogge favoriscono il “rain splash” dell'inoculo e quindi la dispersione delle spore di *Fusarium* che può annullare l'azione del fungicida.

Ad oggi la comunità scientifica ritiene efficace l'uso di un trattamento fungicida contro gli agenti della FHB all'inizio dell'antesi, anche se potrebbe non essere sufficiente per ridurre in maniera significativa l'accumulo di micotossine. I costi dei trattamenti, la tempistica di applicazione, l'assenza di una reale garanzia di una copertura uniforme, sono fattori limitanti l'uso della lotta chimica contro FHB (Bai & Shaner, 2004; McMullen et al., 2012). Ogni fungicida dovrebbe essere usato con estrema attenzione, meglio in combinazione con altre strategie per evitare lo sviluppo di *Fusarium* resistenti (Steffenson, 2003).

Il miglioramento genetico per lo sviluppo di cultivar resistenti rappresenta la strategia più efficace a basso impatto ambientale di lotta agli agenti della FHB, specialmente se combinata con pratiche agronomiche che consentano di ridurre l'inoculo nei residui colturali (Steffenson, 2003). Sfortunatamente la resistenza alla FHB è complessa ed è controllata da geni multipli, per cui lo sviluppo di cultivar di orzo resistenti alla malattia e con tutti i tratti qualitativi ed agronomici desiderati richiede molto tempo, un intenso lavoro ed esperienza. Studi di genetica indicano che la resistenza alla fusariosi della spiga è conferita da svariati geni sparsi nel genoma dell'orzo. Più di 100 QTL per resistenza a FHB e DON sono stati identificati in orzo e grano, che si trovano su cromosomi diversi (Buerstmayr et al., 2009; Choo, 2006; Dahleen et al., 2012; Yu et al., 2010), solo alcuni di questi QTL sono stabili negli anni e le loro funzioni sono sconosciute. Studi di mappatura molecolare rivelano che più QTL sono coinvolti nella reazione di degrado della spiga e che essi coincidono con QTL che controllano fattori agronomici, di morfologia della spiga e del fiore, ma gli effetti che questi fattori hanno sulla FHB sono scarsamente conosciuti (Kumar et al., 2015; Steffenson., 2003; Yoshida et al., 2008). Ulteriori studi sono necessari per comprendere i meccanismi che correlano questi tratti alla resistenza, ma soprattutto per comprendere i meccanismi che agiscono direttamente contro l'agente patogeno.

In orzo la lotta biologica contro FHB implica principalmente l'uso di altri microrganismi (in genere batteri) a livello delle spighe per limitare l'infezione da *Fusarium* (Khan & Doohan, 2009; Khan et al., 2006; Petti et al. 2010; Petti et al., 2012). Khan & Doohan, (2009) hanno dimostrato che l'applicazione di ceppi di *Pseudomonas fluorescens*, come azione preventiva alla FHB di frumento e orzo, può ridurre la severità della malattia riducendo anche la contaminazione da DON nelle spighe infette. Recentemente Baffoni et al. (2015) hanno dimostrando che applicando *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus amyloliquefaciens* dall'inizio della spigatura fino all'antesi di piante di frumento comporta una riduzione dell'FHB *index*.

Questa strategia richiede un lungo lavoro preliminare *in vitro* per selezionare i migliori microrganismi in grado di competere con *Fusarium* e per identificare i complessi meccanismi alla base dell'interazione tra microrganismo "utile"- pianta - patogeno. È fondamentale però, che l'agente di lotta biologica non alteri in nessun modo il processo di lavorazione del malto (Steffenson, 2003). La lotta biologica per la gestione della FHB merita maggiori attenzioni considerati anche alcuni risultati positivi osservati nel frumento (Khan et al., 2006).

In conclusione, il controllo della fusariosi della spiga va inserito in un programma di lotta integrata che passa attraverso la scelta varietale, il tipo di agrotecnica da adottare (rotazione colturale, corretta gestione dei residui colturali, semina, concimazione) e, infine, l'impiego di fungicidi a inizio fioritura (10-20% antere visibili).

FUSARIOSI DEL PIEDE

La fusariosi del piede è caratterizzata da necrosi, localizzate a livello della parte basale e radicale della pianta, che determina alterazioni del colore e perdita di consistenza dei tessuti vegetali. A seconda della zona della pianta colpita dalla malattia, si differenzia in Fusarium Crown Rot (FCR), se i tessuti interessati si trovano nella parte basale del culmo, nella zona adiacente al colletto e in Fusarium Root Rot (FRR), se l'infezione si manifesta per lo più nelle radici. Poiché a livello sintomatico le due manifestazioni sono piuttosto simili, si parla in generale di fusariosi del piede (Beccari et al., 2011; Belli et al., 2012). Questa fitopatia colpisce tutti i cereali vernini, in particolare frumento duro, frumento tenero, orzo e avena (Hollaway et al., 2013). I principali agenti patogeni sono *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. pseudograminearum*. I sintomi possono presentare notevoli somiglianze e solo a fronte di un'identificazione dell'agente causale con metodologie tradizionali o molecolari è possibile attribuire con certezza a ciascuna specie la responsabilità della malattia (Belli et al., 2012; Hollaway et al., 2013).

La malattia è diffusa in molte aree cerealicole del mondo, ma soprattutto nelle regioni a clima temperato. Inoltre, siccome questa malattia è determinata dagli stessi *Fusarium* che attaccano la spiga, nelle zone dove vi è un'alta incidenza di FHB è presente spesso anche la fusariosi del piede (Dyer et al., 2009). I Paesi maggiormente colpiti sono Canada, Stati Uniti (Smiley & Patterson, 1996; Strausbaugh et al., 2004), dove i patogeni responsabili della malattia sono *F. culmorum* e *F. pseudograminearum*, e Australia, dove il principale agente coinvolto nelle infezioni su grano duro e orzo è *F. pseudograminearum* (Hollaway et al., 2013). Anche in Italia questa malattia è diffusa, soprattutto su frumento duro, nelle aree cerealicole del Centro-Sud. Il patogeno più diffuso risulta essere *F. culmorum*, anche se altri patogeni, seppure con una frequenza inferiore, sembrano svolgere un ruolo importante nella patogenesi della malattia (Balmas et al., 1999).

I sintomi da fusariosi del piede possono variare a seconda del momento dell'infezione. Le infezioni precoci inducono la morte delle piante in fase di emergenza, provocando fallanze talvolta rilevanti. Mentre, se l'infezione è più tardiva, compaiono imbrunimenti sui primi due-tre internodi del culmo e successivamente si può verificare il disseccamento del culmo principale (Belli et al., 2012; Scherm et al., 2013). Le giovani piante che riescono a sopravvivere presentano estesi imbrunimenti localizzati sulle guaine fogliari e sul culmo, meno frequentemente sulle radici primarie e secondarie. Le piante infette mostrano sviluppo ridotto, associato a morte dei culmi di accostamento e minor resistenza all'allettamento. Inoltre maturano prematuramente, producendo spighe dal colore biancastro, per questo dette "spighe bianche", che contengono cariossidi striminzite o addirittura vuote (Belli et al., 2012). In presenza di umidità elevata, una colorazione rosa-salmone è spesso evidente sui nodi infetti determinata dalla presenza di ammassi di micelio e di spore (Scherm et al., 2013).

Epidemiologia e fonti d'inoculo

La maggior parte dei *Fusaria* responsabili della fusariosi del piede è in grado di sopravvivere sui residui della coltura o di poacee spontanee. Alcune specie, quali *F. graminearum*, sono in grado di differenziare in condizioni non favorevoli clamidospore che conservano la propria vitalità per almeno un quinquennio dopo la loro formazione (Bateman et al., 1998; Cook, 1980).

Su frumento e in generale in tutti i cereali, l'infezione può avvenire ad opera delle spore o del micelio che si sviluppa a partire da residui infetti (Belli et al., 2012). Quando il seme germina, il fungo presente nel terreno penetra attraverso le lesioni che si generano dall'emergenza della

radice principale e poi progredisce verso il culmo. In alternativa, il fungo può penetrare attraverso gli stomi, localizzati nei punti d'inserzione della guaina fogliare alla base del culmo.

La maggioranza degli studi sulla modalità di penetrazione e colonizzazione di *Fusarium* sia a livello tissutale che a livello cellulare, sono stati eseguiti con *F. culmorum*, che è il patogeno che sopravvive più a lungo nei residui colturali (Scherm et al., 2013). Anche se la letteratura riguardante *F. graminearum* e soprattutto *F. pseudograminearum* è più limitata, sembra che le modalità di penetrazione e colonizzazione siano analoghe a quelle di *F. culmorum*. La colonizzazione di tipo necrotrofo segue inizialmente un percorso intercellulare (apoplastico) e successivamente, il fungo avanza a livello intracellulare seguendo un percorso simplastico (Beccari et al., 2011; Covarelli et al., 2012; Pettitt et al., 2001).

Il fungo può diffondersi lungo tutto il culmo, anche se di solito il suo sviluppo è limitato ai primi internodi basali. I sintomi di imbrunimento basale possono apparire in assenza del fungo, come risposta della pianta all'infezione (Beccari et al., 2011; Covarelli et al., 2012).

Ad oggi la lotta alla malattia si basa principalmente su metodi di prevenzione agronomici come a) arature profonde e medie per interrare i residui infetti e ridurre le fonti d'inoculo; b) rotazione delle colture, ad esempio l'inserimento nella rotazione di Crucifere, che o trinciate, o interrate e irrigate, sono in grado di rilasciare molecole bioattive (isotiocianati) che ostacolano la crescita fungina; c) concia del seme, utilizzando inibitori della sintesi degli steroli, efficaci contro vari ceppi di *Fusarium*. Poco usate sono le pratiche di lotta biologica, per gli scarsi risultati finora ottenuti (Belli et al., 2012).

MICOTOSSINE

Molte delle specie di *Fusarium* responsabili dell'FHB possono produrre sostanze tossiche che, se presenti in concentrazioni elevate negli alimenti (sia di origine vegetale che animale), possono causare gravi intossicazioni alimentari per l'uomo e per gli animali (micotossicosi). Le micotossine possono avere caratteristiche di genotossicità, cancerogenicità, immunotossicità, mutagenicità, nefrotossicità e teratogenicità (Zöllner & Mayer-Helm, 2006). Al fine di tutelare la salute umana, l'Unione Europea ha pubblicato regolamenti fissando limiti di legge per la contaminazione dalle principali micotossine prodotte dalle specie di *Fusarium* nei cereali e prodotti derivati destinati all'alimentazione umana e zootecnica (Regolamento della Commissione 1881/2006). Per il momento tali restrizioni in orzo sono limitate alle tossine Deossinivalenolo (DON) e Zearalenone (ZEA) con limiti pari a 1.250 ppb

e 100 ppb, valori riferiti ai cereali non processati. Nessuna limitazione è ancora prevista per NIV. Recentemente la Commissione Europea si è espressa sui livelli di contaminazione da T-2 e HT-2, che nei prodotti di grano non trasformati non deve superare 100 ppb e nell'orzo 200 ppb (Raccomandazione della Commissione 2013/165/EU).

Nella Tabella 1 sono riportate le principali specie di *Fusarium* tossigene con le potenziali micotossine.

Le micotossine vengono secrete dopo il periodo di moltiplicazione e di sviluppo ifale e 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 per la crescita del fungo. Le micotossine vengono elaborate dal fungo verso la fine del ciclo di sviluppo, quando si ha un accumulo di elevate quantità di metaboliti non più necessari allo sviluppo. Sono molecole molto stabili dal punto di vista chimico – fisico, non termolabili e difficili da degradare con i tradizionali sistemi di lavorazione e trasformazione. Inoltre, persistono anche dopo la morte del fungo produttore; sono secrete in basse quantità, ma la loro tossicità è comunque elevata.

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; la reale produzione di micotossine è una caratteristica ceppo specifica (Poggiolini & Beccarini, 2006).

Le micotossine rappresentano un punto chiave del processo di infezione, poiché 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 e le condizioni climatiche di crescita, le tecniche di coltivazione e il livello di suscettibilità della pianta-ospite (Pancaldi et al., 2010).

Tabella 1: *Fusarium* tossigenici e potenziali micotossine producibili.

FUSARIUM spp. tossigeni	MICOTOSSINE
<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. langsethiae</i>	HT-2, T-2, DAS, NEO
<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).

Tricoteceni

I tricoteceni sono un gruppo di micotossine prodotte da specie fungine appartenenti ai generi: *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon* e *Stachybotrys* (Ueno, 1980). Dal punto di vista chimico i tricoteceni sono sesquiterpeni epossidici e la loro tossicità è dovuta al gruppo epossidico legato al C-13. I tricoteceni prodotti da *Fusarium* sono suddivisi in due gruppi, A e B (Figura 7). Il gruppo A comprende le tossine T-2, HT-2, AcetilT-2, Diacetossilscirpenolo (DAS), 15 Acetossilscirpenolo, Neosolaniolo (NEO) ed è caratterizzato dalla presenza in C-8 di un gruppo funzionale diverso da un chetone. Il gruppo B comprende Deossinivalenolo (DON), Nivalenolo (NIV), 3-AcetilDON, 15-AcetilDON, Fusarenone X ed è caratterizzato da un gruppo carbonilico in posizione C-8 (Koch, 2004).

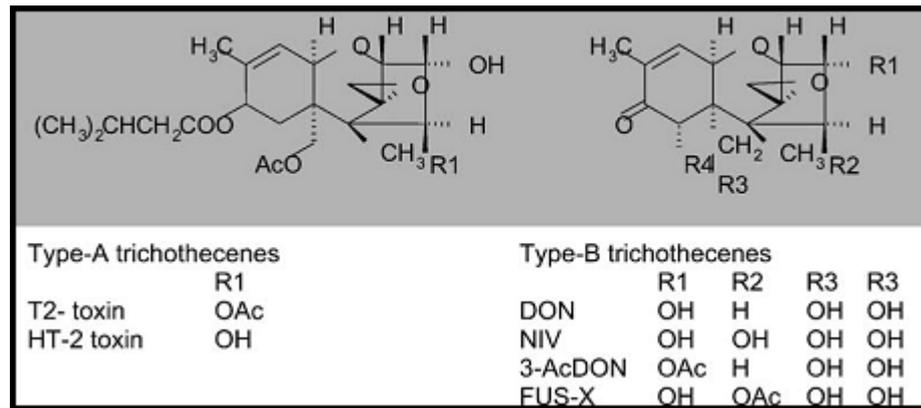


Figura 7: Formule di struttura dei tricoteceni del gruppo A e del gruppo B (Tratto da: Kock, 2004).

F. equiseti, *F. poae* e *F. sporotrichoides* producono tricoteceni di tipo A, mentre *F. culmorum* e *F. graminearum* sono le specie fungine più rilevanti per la produzione di tricoteceni di tipo B (Josephs et al., 2004).

I tricoteceni sono tossine termoresistenti e fotoresistenti che inducono effetti tossici acuti nell'uomo e negli animali e sono capaci di inibire la sintesi proteica negli eucarioti e di causare fenomeni apoptotici sia *in vitro* che *in vivo* in vari organi (Pae et al., 2003; Yang et al., 2000).

La tossicità acuta dei tricoteceni è caratterizzata da disturbi gastrointestinali come vomito, diarrea e infiammazione delle mucose dello stomaco dell'intestino tenue e della bocca, irritazioni cutanee, inappetenza e rifiuto dell'alimento, effetti immunomodulatori quali la soppressione alla stimolazione del sistema immunitario, aborto, emorragie, anemia e leucopenia, febbre, mal di testa, dispnea, vertigini e cancro (Cavret & Lecoecur, 2006; Pestka & Smolinski, 2005; Zöllner & Mayer-Helm, 2006). Deossinivalenolo e la tossina T-2 sono i principali tricoteceni ritrovati come contaminanti naturali su numerosi prodotti agricoli e alimenti commerciali (Sudakin, 2003).

Le *Fusarium*-tossine che si trovano con maggior frequenza nell'orzo sono: deossinivalenolo (DON), nivalenolo (NIV), zearalenone (ZEA) prodotte principalmente da *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. poae*; tossina T-2 e HT-2 prodotte da *F. poae*, *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae* (Edwards, 2007; Imathiu et al., 2013; Linkmeyer et al., 2015; Nielsen et al., 2014).

Deossinivalenolo (DON) è stata la prima micotossina ad essere stata identificata da piante di orzo infettate da funghi appartenenti al genere *Fusarium* (Morooka et al., 1972). Viene comunemente chiamata vomitotossina per la sua capacità di causare emesi nei suini

(Greenhalgh et al., 1986; Vesonder et al., 1973). Spesso DON viene riscontrato nelle colture cerealicole associata alla micotossina zearalenone.

DON nei mammiferi può avere effetti neurotossici e immunotossici ed è responsabile di sindromi emetiche e anoressiche negli allevamenti zootecnici (in particolar modo quelli suini) (Eriksen & Pettersson, 2004).

Nivalenolo (NIV) deve il suo nome al fungo *F. nivale* (oggi *Microdochium nivale*) (Tatsuno et al., 1968), dal quale è stato caratterizzato per la prima volta, anche se successivamente nel 1984 Marasas et al. hanno dimostrato che in realtà si trattava di un ceppo di *F. sporotrichioides*. Il contatto diretto di questa micotossina può portare ad emorragie polmonari e cerebrali, vomito, diarrea e danni nell'inibizione della sintesi proteica e del DNA, effetti molto simili a quelli prodotti da DON (Eriksen et al., 2004).

Tossina T-2 ed il suo metabolita **HT-2**, sono considerate le più pericolose per la salute umana e animale in quanto hanno una tossicità acuta e cronica superiore a tutte le altre tossine appartenenti al gruppo dei tricoteceni. Gli effetti tossici consistono nella progressiva riduzione dello stimolo alimentare, diarrea, emesi, sindromi emorragiche, danni epatici, irritazioni cutanee, citotossicità, immunosoppressione, neurotossicità e riduzione dell'attività mitotica. È stato stimato che tra il 1942 ed il 1948 nell'ex Unione Sovietica morirono per leucopenia tossica alimentare (ATA) circa 100.000 persone. Questa malattia è la manifestazione di una grave micotossicità provocata dal consumo di cereali ammuffiti e contaminati da T-2 e HT-2. ATA si manifesta alcuni giorni dopo l'ingestione di alimenti contaminati dalla micotossina, mostrandosi dapprima con sintomi di infiammazione della mucosa gastrica intestinale, seguita da nausea, vomito, diarrea, dolori addominali, febbre, lesioni alla cavità orale, laringiti e faringiti necrotiche con conseguente strozzatura della laringe (Joffe, 1971).

Zearalenoni

Lo zearalenone (ZEA) appartiene alla famiglia degli estrogeni e chimicamente è un lattone dell'acido resorcilico (Urry et al., 1966), di solito si riscontra maggiormente su mais che su frumento, orzo e sorgo (Kuiper-Goodman et al., 1987). Questo composto non comporta una tossicità acuta, ma ha un'azione estrogeno-simile che può causare sterilità nell'uomo e negli animali. Nei suini è stato ritenuto responsabile di iperestrisimo, mentre nei bovini e nelle specie aviarie di ipofertilità (Desjardins, 2006). Nell'uomo ZEA sembra correlato a disfunzioni ormonali note come pubertà precoce centrale (CPP) (Massart et al., 2008).

SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare l'eziologia della fusariosi della spiga in orzo e il coinvolgimento nella sicurezza alimentare delle specie di *Fusarium* responsabili della malattia e produttrici di micotossine.

Per raggiungere gli obiettivi specifici il lavoro è stato distinto in tre tematiche di ricerca:

1. MONITORAGGIO DELLA COMPONENTE FUNGINA IN CAMPIONI DI CARIOSSIDI DI ORZO PROVENIENTI DA DIVERSI AREALI NAZIONALI
 - (a) identificazione morfologica di funghi isolati da cariossidi di orzo a livello di genere
 - (b) identificazione morfologica e molecolare di *Fusarium* isolati dagli stessi campioni a livello di specie
 - (c) quantificazione di micotossine (DON e tossine T2 e HT2) negli sfarinati ottenuti dalle cariossidi dei campioni di saggiati, con tecnica immunoenzimatica ELISA.

2. VALUTAZIONE DELLA FUSARIOSI DELLA SPIGA IN TRE CULTIVAR DI ORZO INOCULATE CON *F. GRAMINEARUM*, *F. CULMORUM* E *F. POAE* IN AMBIENTE CONTROLLATO E IN PROVE DI CAMPO
 - (a) inoculazione artificiale nello stadio di massima suscettibilità di piante di orzo con sospensioni conidiche di *F. graminearum* e *F. culmorum* (in associazione) e di *F. poae* singolo
 - (b) determinazione dell'incidenza e severità della FHB determinata da *F. graminearum* e *F. culmorum* in un campione di spighe di tre cultivar di orzo distico ad uso maltario, tramite una scala di valutazione messa a punto in questa ricerca
 - (c) determinazione dell'incidenza del sintomo determinato da *F. poae* in un campione di spighe di tre cultivar di orzo distico ad uso maltario
 - (d) quantificazione nella granella ottenuta di micotossine DON e T-2-HT-2, prodotte dalle tre specie di *Fusarium* inoculate artificialmente.

3. COLONIZZAZIONE DA PARTE DI *F. GRAMINEARUM*, *F. PSEUDOGRAMINEARUM* E *F. CULMORUM* IN AMBIENTE CONTROLLATO E TRASLOCAZIONE DELLA MICOTOSSINA DON
 - (a) valutazione della capacità di singoli ceppi di *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* e *F. culmorum* di colonizzare il culmo a diverse altezze e la spiga

di piante di orzo, cultivar Tunika, coltivate in ambiente controllato, con rilievi visivi, immagini SEM e tecniche Real Time PCR

(b) quantificazione della micotossina DON nelle diverse porzioni del culmo e nella spiga con tecnica immunoenzimatica ELISA.

CAPITOLO I

MONITORAGGIO DELLA COMPONENTE FUNGINA ISOLATA DA CAMPIONI DI CARIOSSIDI DI ORZO PROVENIENTI DA DIVERSI AREALI NAZIONALI

RIASSUNTO

In Italia nel 2011 circa l'8% dell'intera superficie cerealicola era coltivata ad orzo destinato principalmente, in ordine di importanza, all'alimentazione zootecnica, all'industria maltaria e all'alimentazione umana. La fusariosi della spiga (FHB) è una malattia del frumento e dell'orzo diffusa in tutto il mondo che può causare gravi perdite nei raccolti e nella qualità della granella, tuttavia il problema principale consiste nell'accumulo di micotossine in grado di mettere a serio rischio la salute dell'uomo e degli animali. Le principali specie associate alla fusariosi della spiga dei cereali in Europa sono *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. avenaceum* anche se negli ultimi anni particolare importanza è stata data alle specie della sezione Sporotrichiella come le specie *F. poae*, *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides* considerate potenziali produttori di tricoteceni di tipo A e B (Stenglein, 2009; Yli-Mattila, 2010). In questo studio sono state condotte per tre anni consecutivi indagini riguardo la componente fungina delle cariossidi di orzo di provenienza nazionale, con particolare attenzione alle specie responsabili dell'FHB e ai livelli di contaminazione delle micotossine DON e T-2/HT-2 prodotte dai *Fusarium* patogeni. La popolazione di *Fusarium* sviluppatesi dai campioni di granella analizzati è variata per specie e frequenza in base all'andamento stagionale delle singole annate agrarie. Dei tre anni considerati nel presente studio 2011, 2012 e 2013, il 2011 è stato quello con maggiore frequenza di *Fusarium* spp. e maggiori livelli di micotossine, solo in pochi casi superiori a quanto indicato dalla legge o dalle raccomandazioni comunitarie. Nel complesso le specie predominanti sono state *F. graminearum*, *F. poae* e *F. tricinctum*.

INTRODUZIONE

L'orzo (*Hordeum vulgare* L.) è uno dei cereali più coltivati nel mondo, destinato sia all'alimentazione umana che animale. Rappresenta circa il 13% dell'intera superficie cerealicola, il cui principale impiego, in ordine di importanza, è l'alimentazione zootecnica, l'industria maltaria e l'alimentazione umana. A livello mondiale e anche in Europa per questo cereale la fusariosi della spiga rappresenta un rischio da non sottovalutare sia per la perdita in resa, sia per la qualità della granella stessa, in quanto, i funghi associati a questa fitopatia, sono in grado di produrre micotossine che possono incidere sulla salute umana e animale (Bottalico & Perrone, 2002; Choo et al., 2004; McMullen et al., 1997; Nielsen et al., 2014; Yli-Mattila, 2010). Per questo motivo, qualità e sicurezza sono da considerarsi requisiti fondamentali per il commercio di questo cereale, avvalorando così l'importanza che ricopre il monitoraggio ed il controllo delle avversità dell'orzo, in particolare di quei patogeni fungini

dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, produttori di micotossine dannose per gli animali e per l'uomo (Bottalico & Perrone, 2002). Le micotossine sono metaboliti secondari che possono causare, sugli animali e sull'uomo, effetti tossici acuti e cronici a seguito di ingestione, contatto o inalazione.

I funghi tossigeni vengono suddivisi in “funghi di campo” e “funghi di magazzino”, in base alle loro esigenze in merito al contenuto di umidità del substrato colonizzato. I funghi di campo prediligono contenuti di umidità piuttosto elevati (20-22%) e vi appartengono i generi *Alternaria*, *Claviceps* e *Fusarium*, mentre i funghi di magazzino comprendono specie capaci di accrescersi su substrati aventi tassi di umidità inferiori (18-20%) e vi appartengono i generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Questa suddivisione non va tuttavia considerata in maniera netta, in quanto ci sono specie fungine con esigenze intermedie. Tuttavia appare evidente che la formazione di fusariotossine, clavi-cepstossine e altre tossine si verifica maggiormente nella fase di pre-raccolta, mentre la formazione di micotossine dei generi *Aspergillus* e *Penicillium* è prevalente nel corso delle operazioni di raccolta e in post-raccolta (Bottalico, 2004). Oltre a quelle menzionate ci sono ulteriori specie con valenza micotossicologica limitata e generalmente presenti in aree geografiche più ristrette. Tra questi si possono ritrovare: *Chaetomium*, *Phomopsis*, *Pithomyces*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Trichoderma* e *Trichothecium* (Bottalico, 2004). Va specificato che all'interno di un genere fungino tossigeno non tutte le specie che vi appartengono sono produttrici di micotossine. Ciò significa che la granella, colonizzata da funghi di una specie potenzialmente tossigena, non necessariamente conterrà micotossine, sia perché il ceppo della specie in questione potrebbe non essere tossigeno e sia perché il biosistema nel quale si sviluppa non glielo consente (Samson et al., 1995).

Nel considerare la pericolosità delle micotossine bisogna tener presente che si tratta di molecole molto stabili e persistenti all'interno dei prodotti contaminati anche per periodi lunghi dopo della morte del fungo produttore. Infatti le micotossine non vengono distrutte o completamente allontanate con i normali processi fisici (calore, radiazioni), chimici (estrazione, raffinazione) e biologici (fermentazione) adottati nelle industrie alimentari. Pertanto, le micotossine, o le loro forme derivate, si possono ritrovare nei mangimi, negli alimenti ottenuti con ingredienti contaminati e nei prodotti della fermentazione (vini, birra, sidro, yogurt, brodi proteici) (Smith & Henderson, 1991; Smith & Solomons, 1994).

Il monitoraggio della componente fungina può servire a determinare i naturali livelli di contaminazione da micotossine nelle materie prime e va considerato un utile strumento per la salvaguardia della sicurezza alimentare del consumatore finale.

Per alcune micotossine, l'Unione Europea, al fine di tutelare la salute umana, ha pubblicato regolamenti fissando limiti di legge per la contaminazione delle principali micotossine prodotte dalle specie di *Fusarium* nei cereali e prodotti derivati destinati all'alimentazione umana e zootecnica (Regolamento della Commissione 1881/2006). Per il momento tali restrizioni in orzo sono limitate alle tossine DON e ZEA con limiti di 1.250 ppb e 100 ppb, quest'ultimo valore è riferito ai cereali non processati. Nessuna limitazione è ancora prevista per NIV. Recentemente la Commissione Europea si è espressa sui livelli di contaminazione da T-2 e HT-2, che nei prodotti di frumento non trasformati non deve superare 100 ppb e 200 ppb in quelli di orzo non trasformati (Raccomandazione della Commissione 2013/165/EU). I limiti proposti per T-2 e HT-2 sono stati più bassi rispetto alle altre micotossine regolamentate in quanto considerate le più tossiche tra i tricoteceni (Caloni & Nebbia, 2009). Inoltre queste tossine sono state rinvenute più frequentemente in avena e orzo, visto che interessano maggiormente i cereali a paglia in semina primaverile (Reyneri et al., 2013).

Lo scopo di questo lavoro è stato di individuare le principali specie di *Fusarium* responsabili della fusariosi della spiga di piante di orzo e le principali specie fungine riscontrabili in campioni di granella di orzo raccolti nelle annate agrarie 2011, 2012 e 2013 provenienti principalmente dagli areali del centro Italia, prendendo in considerazione sia cultivar distiche, sia polistiche. In Italia, nel 2011, anno di inizio del monitoraggio, l'orzo rappresentava l'8% della superficie cerealicola coltivata con 270.386 ha di superficie coltivata e 951.000 tonnellate prodotte (dati ISTA 2012). L'Istituto Nazionale di Statistica ha indicato che nel 2015 la superficie nazionale coltivata ad orzo era suddivisa come riportato nella Figura 1.1. Emilia Romagna, Lombardia, Abruzzo e Puglia erano le regioni con la maggiore superficie coltivata ad orzo ed insieme coprivano il 45% della superficie totale nazionale.

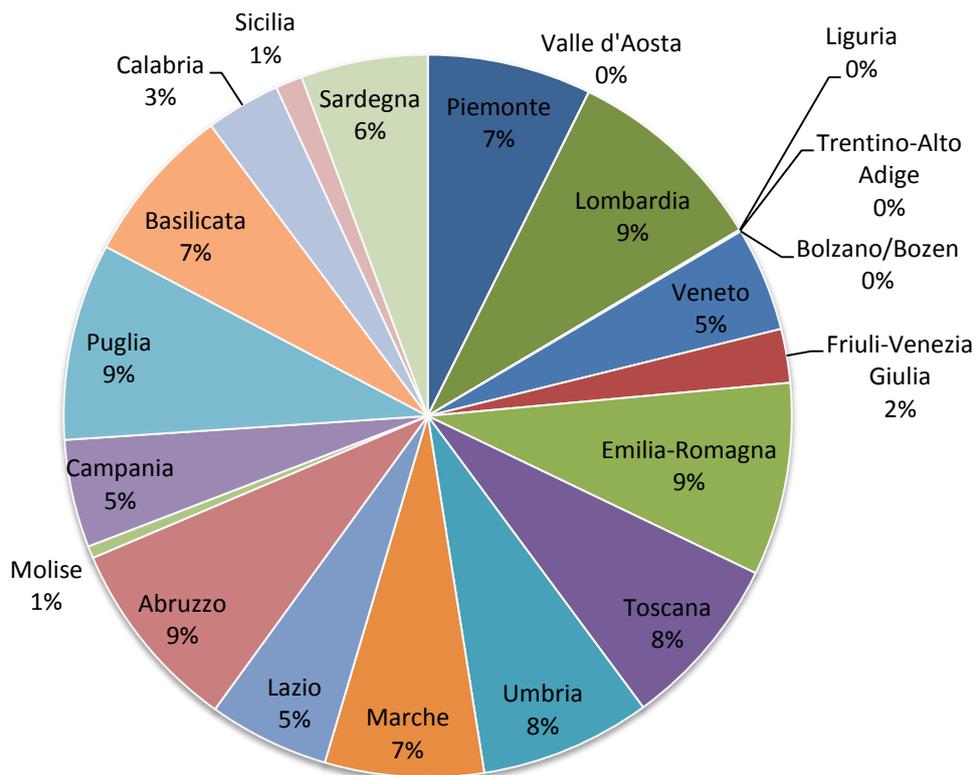


Figura 1.1: Suddivisione per regioni del totale della superficie italiana coltivata ad orzo nel 2015.

MATERIALI E METODI

Campioni analizzati

Campioni di seme in natura di orzo, di tre annate agrarie e proveniente da diverse regioni d'Italia, sono stati analizzati per determinare la loro componente fungina. Il numero di campioni analizzati suddivisi per annata agraria sono stati i seguenti:

- anno 2010/2011, n. 35 campioni
- anno 2011/2012, n. 33
- anno 2012/2013, n. 20

Nella Tabella 1.1 di seguito riportata viene indicata la provenienza dei campioni per ciascun anno considerato.

I campioni sono stati gentilmente forniti dal CREA SCS di Bologna.

Tabella 1.1: Regioni di provenienza e numero campioni di seme analizzati in ciascuno dei tre anni di monitoraggio.

Numero di campioni di seme analizzati				
Regioni	2011	2012	2013	
Emilia Romagna	6	17	5	
Marche	11	8		
Umbria	16	5	7	
Lazio	2			
Abruzzo		2	3	
Molise		1	1	
Veneto			4	
	totale	35	33	20

Isolamento

Le indagini di monitoraggio della popolazione fungina su campioni di seme di orzo sono state condotte prelevando in modo random 100 cariossidi per ciascun campione. Le cariossidi sono state dapprima superficialmente disinfettate con ipoclorito di sodio al 2% di cloro attivo per 3 minuti e risciacquati con acqua sterile, poi sono state poste su terreno agarizzato (Potato Dextrose Agar, Difco -PDA) addizionato di solfato di streptomicina (200 mg/l) e neomicina (100 mg/l) e lasciate ad incubare ad una temperatura di 25°C per 5 giorni al buio. Le colonie sviluppatesi dalle cariossidi sono state identificate a livello di genere basandosi sul colore della colonia, sulla morfologia del margine e sulla velocità di crescita e a livello microscopico su strutture caratteristiche (Watanabe, 2002).

Le colonie riconducibili a *Fusarium* spp. sono state isolate in piastre Petri contenenti PDA. Le chiavi tassonomiche utilizzate per l'identificazione sono quelle descritte in Leslie e Summerell (2006). Attraverso l'impiego di un microscopio ottico si sono osservati i seguenti parametri:

- morfologia dell'ifa (presenza di setti) e delle fialidi;
- presenza/assenza di macro/microconidi;
- morfologia dei macroconidi, in particolar modo della struttura della cellula basale e apicale, del numero di setti e del rapporto di lunghezza/larghezza del conidio;
- presenza/assenza di clamidospore.

Qualora l'analisi macro-microscopica della morfologia delle colonie accresciutesi su PDA non fosse sufficiente per identificare le specie di *Fusarium* spp., si è proceduto con l'identificazione molecolare che prevedeva varie fasi: produzione di colture monosporiche, estrazione e amplificazione del DNA da micelio, utilizzo di primer specie-specifici e, in caso di esito negativo, sequenziamento della regione del gene Translation Elongation Factor-1 alpha (TEF-1 α), come indicato da Geiser et al. (2004).

Colture monosporiche

Per svolgere analisi di tipo molecolare è stato indispensabile procedere con l'ottenimento di colonie monosporiche (Balmas et al., 2000). Tali colonie si sono ottenute prelevando frammenti di micelio con conidi con un'ansa sterile che sono stati posti in una provetta di vetro contenente 5 ml di acqua deionizzata sterile e agitata per facilitarne la dispersione dei conidi. La sospensione è stata quindi distribuita uniformemente in una piastra Petri con substrato AS (Bacto Agar, Difco). Le piastre sono state mantenute in posizione inclinata (per evitare ristagni d'acqua) a temperatura ambiente per 24 ore. Al termine dell'incubazione, le piastre sono state osservate controluce per individuare i conidi germinati, che sono stati prelevati con un ago sterile e trasferiti in nuove piastre con terreno PDA. Le piastre ottenute vengono incubate a 25°C al buio per 7 giorni. (Figura 1.2).

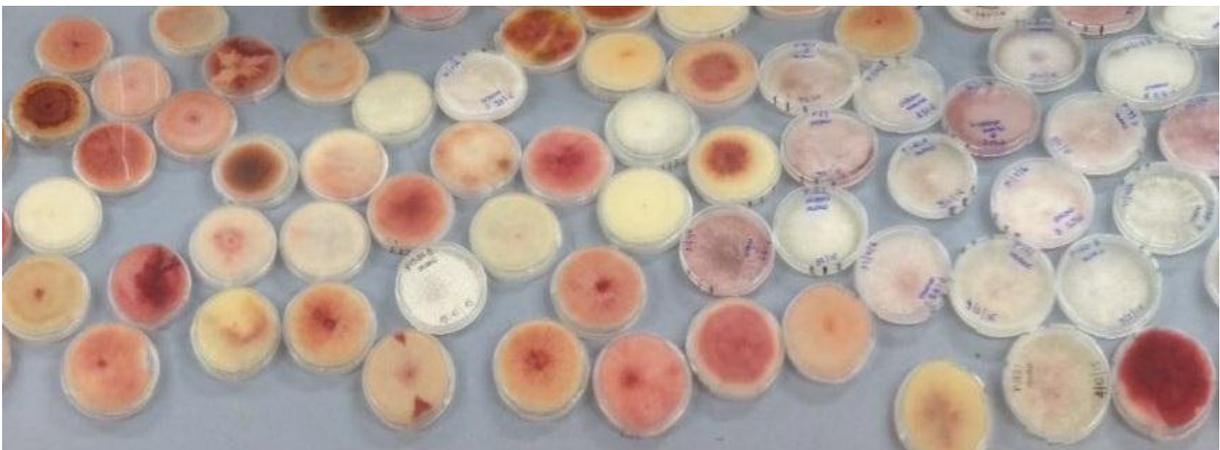


Figura 1.2: Colture monosporiche di *Fusarium* spp.

Estrazione DNA genomico delle colture monosporiche

Per l'estrazione del DNA genomico dalle colonie monosporiche è stato utilizzato il metodo di estrazione detergente CTAB (bromuro di esadecil-trimetilammonio) allestito da modificato.

Il CTAB è una sostanza che in presenza di alte temperatura (60°C) e a elevate concentrazioni saline si lega agli acidi nucleici formando un complesso stabile e solubile in acqua.

Il protocollo comprendeva i seguenti passaggi:

- 100-200 mg di micelio fungino proveniente dalle colture monosporiche è stato prelevato con un bisturi sterile ed inserito in sacchetti di polietilene. I sacchetti con il micelio sono stati immersi in azoto liquido per pochi secondi.
- 1,5 ml di tampone di estrazione (2% CTAB, 100 mM Tris-HCL a pH 8, 20 mM di EDTA, 1,4 NaCl, 1% solfito di sodio e 1% di PVP-40) sono stati aggiunti all'interno delle buste di polietilene e con l'impiego di un martelletto e di un rullo si è cercato di frantumare quanto più possibile il micelio in modo da ottenere un prodotto finale fluido.
- Tale composto è stato versato in tubi sterili da 2 ml e messi ad incubare a 65°C per 10-15 minuti al fine di denaturare le proteine.
- Il campione è stato centrifugato per 10 minuti a 14.000 rpm a temperatura ambiente.
- In altri tubi sterili da 1,5 ml sono stati versati 700 µl di surnatante con l'aggiunta di un ugual volume di cloroformio-isoamilalcool (IAA) nella proporzione 24:1.
- Il contenuto dei tubi è stato miscelato capovolgendoli per 4-5 volte, quindi sono stati centrifugati per 10 minuti a temperatura ambiente (14.000 rpm).
- L'operazione è stata ripetuta prelevando 550 µl di surnatante.
- Successivamente 450 µl della fase acquosa surnatante è stata delicatamente trasferita in un nuovo tubo da 1,5 ml in cui sono stati aggiunti 225µl di una soluzione 5 M di NaCl a pH 8,0 e un ugual volume di isopropanolo.
- La soluzione è stata lasciata riposare 1 h a -20°C.
- Trascorso il tempo si è centrifugato per 15 minuti a 14.000 rpm a 4°C. Al termine di questa fase il DNA genomico è precipitato formando un pellet alla base del tubo.
- Per allontanare l'isopropanolo dal pellet si è proceduto al lavaggio con aggiunta di 500 µl di etanolo al 70%. Il tutto è stato centrifugato per 10 minuti a 14.000 rpm.
- Dopo di che è stato eliminato l'etanolo ed il tubo lasciato aperto in una campana a vuoto spinto per asciugare il pellet di DNA genomico da residui di etanolo.
- Successivamente il DNA è stato ridisciolti in 50 µl di acqua distillata sterile RNAsi free.
- Il prodotto ottenuto è stato conservato a -20°C.

Identificazione molecolare

Per confermare l'appartenenza di alcuni ceppi a una determinata specie sono state effettuate PCR con i seguenti marcatori molecolari specie-specifici.

Tabella 1.2: Primer specie-specifici impiegati per confermare molecolarmente alcune specie di *Fusarium*.

Specie	Nome Primer	Sequenza	T annealing	Dim. frammento	Riferimento
<i>F. avenaceum</i>	JIAf	5'-GCT AAT TCT TAA CTT ACT AGG GGC C-3'	58°C	220 bp	Turner <i>et al</i> 1998
	JIAr	5'-CTG TAA TAG GTT ATT TAC ATG GGC G-3'			
<i>F. culmorum</i>	FC01f	5'-ATGGTGAACCTCGTCGTGGC-3'	62°C Touch down	570 bp	Nicholson <i>et al</i> (1998)
	FC01r	5'-CCCTTCTTACGCCAATCTCG-3'			
<i>F. graminearum</i>	Fg16Nf	5' ACA GAT GAC AAG ATT CAG CGA CA 3'	62°C	410 bp	Nicholson <i>et al</i> (1998)
	Fg16Nr	5' TTCTTT GAC ATC TGT TCA ACC CA 3'			
<i>F. poae</i>	Fp82f	5'-CAAGCAAACAGGCTCTTACC/TGT-3'	62°C	220 bp	Parry & Nicholson (1996)
	Fp82r	5'-TCCACCTCAGTGACAGGTT-3'			
<i>F. sporotrichioides</i>	FsporF1	5'-CGCACAACGCAAACCTCATC-3'	58°C	332 bp	Wilson <i>et al</i> (2004)
	LanspoR1	5'-TACAAGAAGACGTGGCGATAT-3'			
<i>F. langsethiae</i>	FlangF3	5'-CAAAGTTCAGGGCGAAAAC-3'	58°C	310 bp	Wilson <i>et al</i> (2004)
	LanspoR1	5'-TACAAGAAGACGTGGCGATAT-3'			
<i>F. proliferatum</i>	Pro1	5'-CTTCCGCCAAGTTTCTTC-3'	56°C	585 bp	Mulè <i>et al</i> (2004)
	Pro2	5'-TGTCAGTAACTCGACGTTGTG-3'			

Le reazioni sono state eseguite in un volume finale di 25 μ L di cui 5 μ L di DNA (1:10). Per le reazioni sono stati considerati dNTP 50 mM, GoTaq® Buffer 5x (Promega, Madison USA) e GoTaq® G2 DNA Polymerase 5 U/ μ l (Promega; Madison USA). I primer sono stati usati a 10 mM/ml.

Il profilo termico è stato ottimizzato tenendo conto delle diverse temperature di *annealing* delle varie reazioni (Tabella 1.2). I cicli di amplificazione totali erano 30, indipendentemente dalla sequenza considerata.

Gli ampliconi di DNA sono stati caricati in pozzetti di gel di agarosio (1%) e sono stati sottoposti ad elettroforesi all'interno di una cella riempita con il tampone TBE. Per visualizzare la banda, il gel è stato immerso per 6-10 minuti in una soluzione di TBE e 0,4 μ g/ml di bromuro di etidio.

Qualora non fosse possibile identificare con tecnica PCR le colonie fungine, si è proceduto con il sequenziamento della regione del gene Translation Elongation Factor-1 alpha (TEF-1 α). Per quanto riguarda l'amplificazione tramite PCR del gene TEF-1 α , il protocollo che è stato seguito è analogo a quanto descritto sopra con la differenza che i primer utilizzati sono stati:

EF-1H (forward primer) 5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'

EF-2T (reverse primer) 5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'

ad una temperatura di annealing di 53°C (Geiser et al., 2004).

Per integrare il plasmide ricombinante alle cellule di *Escherichia coli* è stato utilizzato un elettroporatore ad una potenza di 2500V.

Successivamente in cappa sterile, sono inseriti 500 µl di LB e miscelati. In seguito si è proceduto alla incubazione in un bagno d'acqua riscaldato a 37°C per 30 minuti.

La coltura liquida è stata inoculata, su piastra Petri di 9 cm di diametro con substrato di LB agar (Luria Bertani agar) con l'aggiunta di ampicillina (100 mg/ml), IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside; 0,5 mM) e X-Gal (bromo-cloro-indolilgalatto-piranoside; 80 mg/ml), nella misura di 300 µl per piastra Petri e stesa uniformemente sulla superficie del substrato. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore. La sequenza d'interesse è stata clonata sfruttando la crescita per scissione binaria del batterio.

Il plasmide, con l'inserimento della sequenza dell'EF è stato interrotto nel punto del gene lacZ, che codifica la β-galattosidasi, necessaria per scindere l'X-Gal presente nel substrato di coltivazione. Le colonie batteriche a cui è stato inserito con successo tale plasmide ricombinate non riescono a scindere il substrato X-Gal conferendo alla colonia una colorazione bianca. Viceversa, se il plasmide non è stato incorporato, il gene lacZ è in grado di codificare l'enzima per la metabolizzazione dell'X-Gal, cosicché la colonia batterica assumerà una colorazione tendente al blu. Successivamente si è proceduto con lo screening delle colonie accresciute con l'inserito mediante amplificazione PCR. Con l'utilizzo di stuzzicadenti sterilizzati, sono state prelevate le colonie bianche e posizionate su una "master plate" e ponendo in seguito il puntale in un tubo termstrip da 0,2 ml contenente per ciascuna reazione una miscela composta di:

GoTaq® Buffer 5x (Promega, Madison USA)	4,0 µl
Primer M13 reverse (10 nM/ml)	1,0 µl
Primer M13 forward (10 nM/ml)	1,0 µl
Miscela dNTP (10 mM)	1,0 µl
Go Taq® G2 DNA polimerasi	0,1 µl
SDW (acqua ultrapura sterile)	13,5 µl

La *master plate* è stata posta per tutta la notte a 37°C, mentre con il tubo termstrip è stata eseguita una reazione PCR che prevedeva un ciclo di 94°C per 2', (94°C per 10", 54°C per 10", 72°C per 40") x 35 volte, 72°C per 2'.

I prodotti di PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio (1%) e in base alle dimensioni del frammento ottenuto sono state selezionate le colonie batteriche da sottoporre all'estrazione del plasmide.

Le colonie risultate trasformate sono state trasferite in mezzo liquido LB e ampicillina (100 mg/ml) e lasciate in agitazione per 24 ore a 37°C. In questo ambiente le colonie batteriche hanno la possibilità di accrescersi così da moltiplicare la sequenza integrata nel plasmide.

Infine è stata effettuata l'estrazione e la purificazione della sequenza amplificata utilizzando il kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison USA), seguendo le indicazioni della casa costruttrice.

Per verificare la purezza del DNA estratto è stato utilizzato uno spettrofotometro per quantificare l'amplificato. Successivamente il prodotto finale dei due campioni è stato inviato a Eurofins MWG GmbH che ha sequenziato l'amplificato del gene EF-1 α .

La sequenza nucleotidica ottenuta è stata comparata con le sequenze presenti nella banca dati Fusarium-ID (isolate.fusariumdb.org).

Quantificazione delle micotossine DON e T-2/HT-2

Da ogni campione apri a 100 g di granella d'orzo è stata ottenuta la farina utilizzando un mulino elettrico da banco con macina di pietra, e. Con la farina sono stati condotti saggi immunoenzimatici per quantificare la presenza di micotossine utilizzando kit di diagnosi AgraQuant Deoxynivalenol e AgraQuant T-2/HT-2 (Romer Labs®). Si tratta di test immunoenzimatici quantitativi di tipo ELISA con specifici limiti di rilevazione (LOD) 0,2 ppm per DON e 25 ppb per T-2/HT-2 e con un range di quantificazione (LOQ) rispettivamente di 0,25 – 5,0 ppm e 25 – 500 ppb. Nel 2011 n. 16 campioni sono stati analizzati con la precedente versione del kit AgraQuant T-2/HT-2 (Romer Labs®) con un LOD di 75 ppb. Le piastre immuno-impresse sono state lette ad una lunghezza d'onda di 450 nm con spettrofotometro OpsysMR (Dynex technologies). I risultati sono stati interpretati con il software Agraquant Assay Spreadsheet fornito da Romer Labs, mediante una curva dose/risposta in base alle concentrazione degli standard e la relativa densità ottica. La validità dei risultati è rappresentata dal coefficiente di linearità (R^2) della curva di calibrazione che deve essere per DON superiore a 0,985, e per T-2/HT-2 deve compreso -0,990 e -1,000.

RISULTATI

2011

Nel 2011 il 68% dei campioni di orzo analizzati per la determinazione della componente microbiologica è risultato infetto da *Fusarium*. Le specie di *Fusarium* più frequentemente isolate sono state *F. poae* (37,1%) e *F. tricinctum* (14,6%), seguite da *F. graminearum* (2,5%), dalle specie del complesso *Fusarium Incarnatum Equiseti Species Complex* (FIESC - 9,9%), *F. avenaceum* (0,9%) e *F. langsethiae* (0,5%). Non è stato isolato alcun ceppo di *F. culmorum*. *F. poae* è apparsa la specie predominante in Emilia Romagna (21,6%) ed Umbria (10,5%) (Figura 1.3).

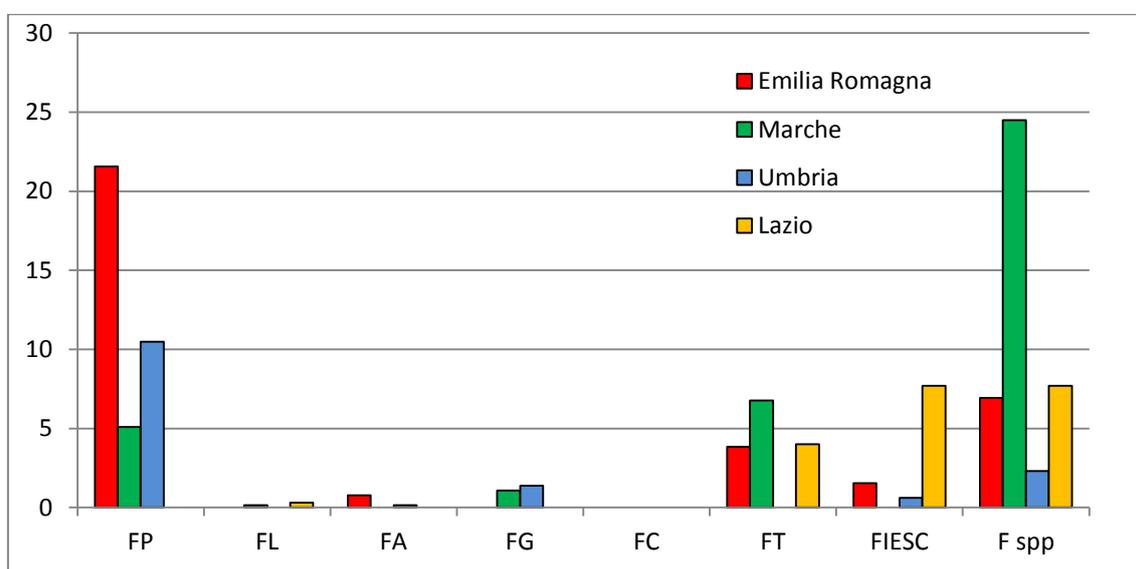


Figura 1.3: Frequenze medie di *Fusarium* riscontrate nelle diverse regioni di campionamento. Anno monitoraggio 2011.

FP = *F. poae*, FL = *F. langsethiae*, FA = *F. avenaceum*, FG = *F. graminearum*, FC = *F. culmorum*, FT = *F. tricinctum*, FIESC = *Fusarium Incarnatum Equiseti Species Complex*, F spp = altri *Fusarium*. I colori rappresentano la regione (riportata in legenda) di provenienza dei campioni di seme.

Nel totale dei campioni analizzati, il 46% è risultato contaminato da micotossina DON con valori superiori ai 0,20 ppm ed il 48% dei campioni era invece contaminato da T-2/HT-2 con valori superiori a 25 e 75 ppb (valori differenti di LOD sono dovuti a diversi kit Romer impiegati) (Figura 1.4).

Complessivamente nel 2011 i campioni con concentrazioni superiori ai limiti di legge o alle indicazioni fornite dalla CE sono lo 0,4% per DON e 8,6% per T-2/HT-2.

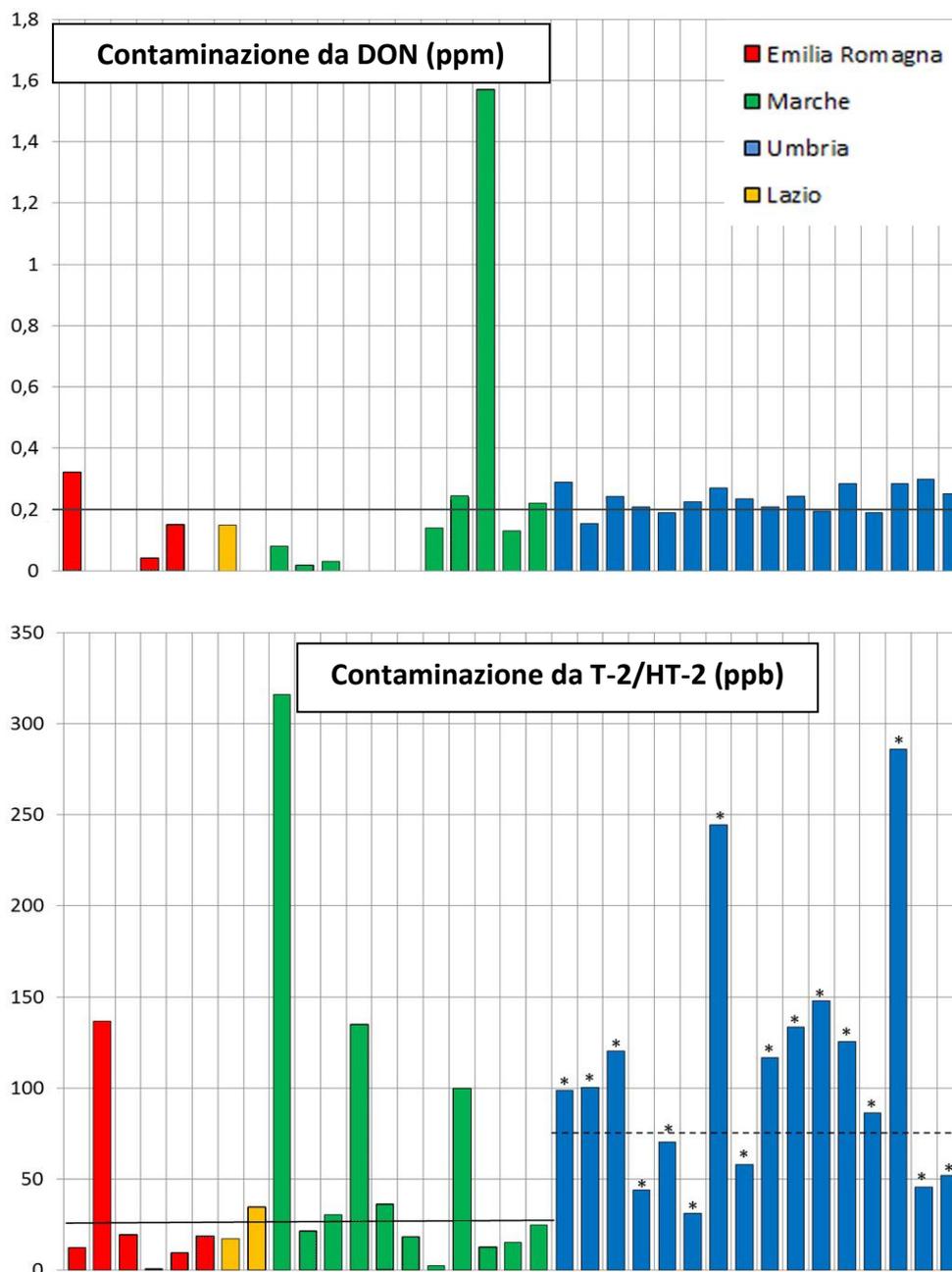


Figura 1.4: Contenuto di micotossine DON e T-2/HT-2 in 35 campioni di granella d'orzo suddivisi per regione. Anno 2011.

Le linee orizzontali contrassegnano il limite di *detection* (LOD) specifico dei kit ELISA utilizzati. I campioni contrassegnati con l'asterisco sono stati analizzati con un kit con sensibilità di *detection* differente: 75 ppb. I colori rappresentano la regione (riportata in legenda) di provenienza dei campioni di seme.

2012

Il 2012 è stato un anno particolarmente sfavorevole alla diffusione di *Fusarium*. Dei campioni di granella analizzati, il 21% era contaminato da *Fusarium*. La specie predominante è stata *F. proliferatum* con il 76,9%, seguite in egual misura da FIESC e *F. culmorum* con il

7,7%. Le regioni in cui *Fusarium* era maggiormente presente sulla granella sono l'Emilia Romagna (46,2%) le Marche e (38,5%) (Figura 1.5).

Il 24% dei campioni è risultato contaminato dalla micotossina DON (valori superiori al LOD), ma comunque entro i limiti di legge. I campioni contaminati da T-2/HT-2 erano invece il 48%, tutti entro le raccomandazioni della Commissione Europea (Figura 1.6).

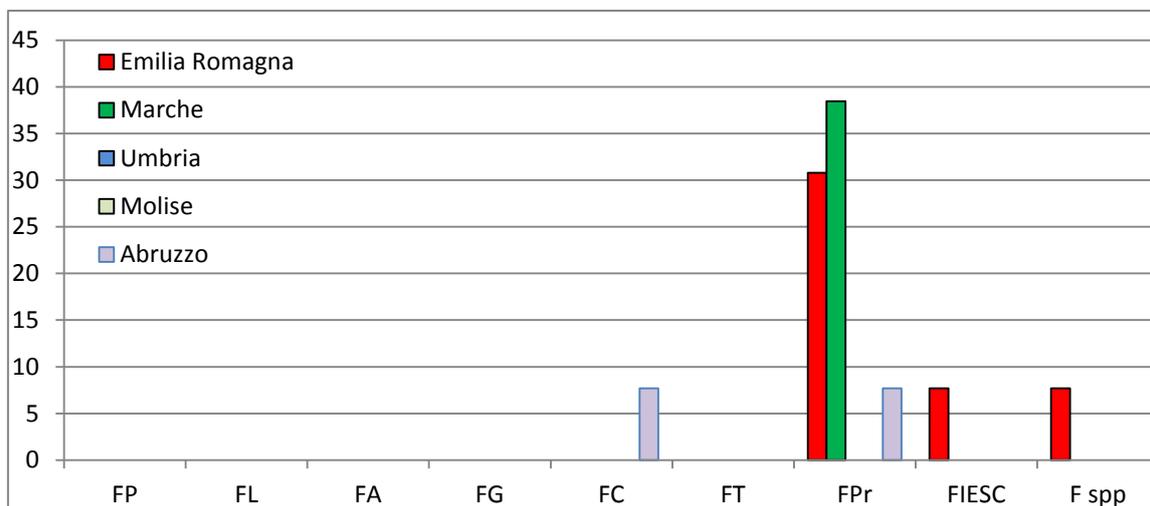


Figura 1.5: Frequenze medie di *Fusarium* riscontrate nelle diverse regioni di campionamento. Anno monitoraggio 2012 su n. 33 campioni.

FP = *F. poae*, FL = *F. langsethiae*, FA = *F. avenaceum*, FG = *F. graminearum*, FC = *F. culmorum*, FT = *F. tricinctum*, FIESC = *Fusarium Incarnatum Equiseti Species Complex*, FPr = *F. proliferatum*, F spp = altri *Fusarium*.

Oltre al genere *Fusarium*, sono state identificate, fino al livello di genere, anche altre componenti microbiche presenti nella granella, si è osservato che *Alternaria* spp. (31,7%) era il genere predominante insieme al suo teleomorfo *Lewia* spp. (13,58%), seguiti da *Epicoccum* spp. (2%), *Aspergillus* spp. (1,67%), *Cladosporium* spp. (1,18%) e *Pyrenophora* spp. (0,42%).

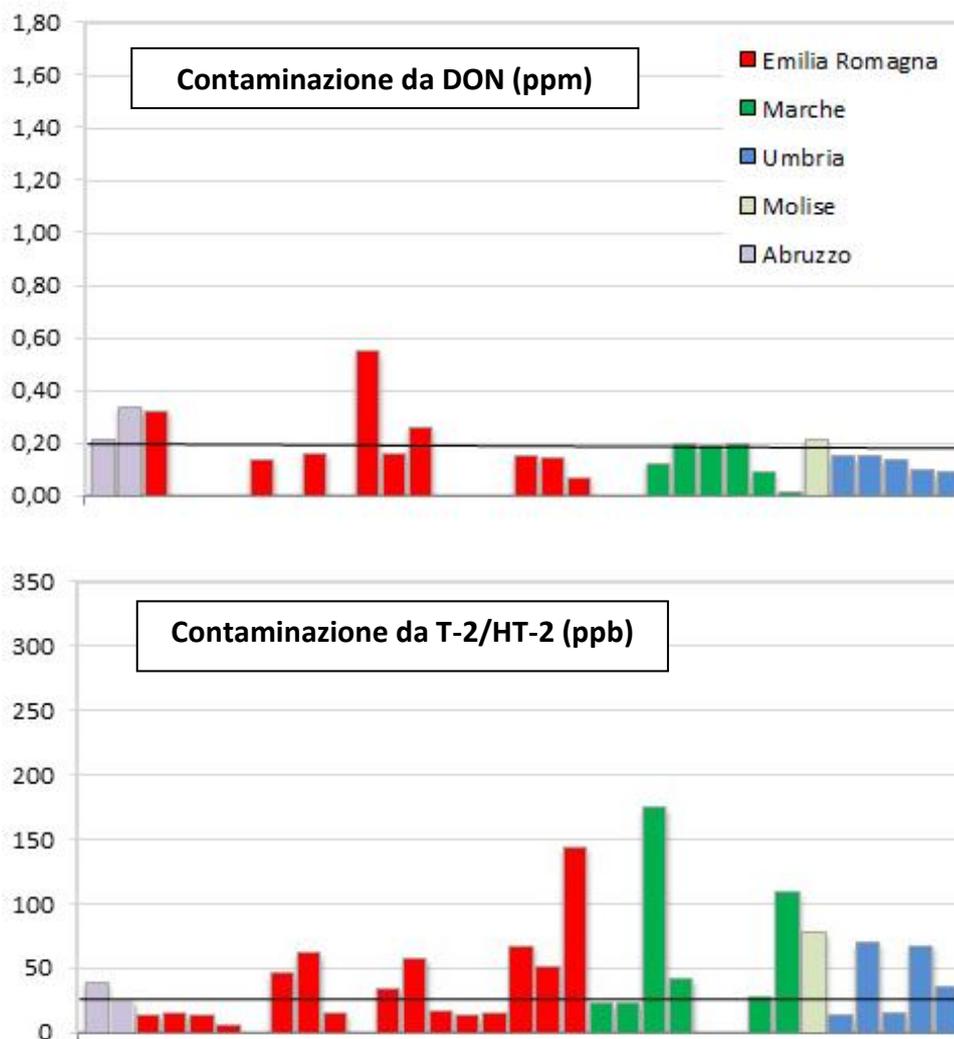


Figura 1.6: Quantificazione micotossine DON e T-2/HT-2 in 33 campioni di granella d'orzo suddivisi per regione. Anno 2012.

Le linee orizzontali contrassegnano il limite di *detection* (LOD) specifico dei kit ELISA. I colori rappresentano la regione (riportata in legenda) di provenienza dei campioni di seme.

2013

Nel 2013 si è rilevata una ampia diffusione di fusariosi della spiga. Dalla granella analizzata è risultato che l'85% era infetta da *Fusarium* spp. La specie predominante è stata *F. graminearum* con il 60,4%, seguita da *F. tricinctum* (12,5%), *F. culmorum* 10,4%, *F. poae* e FIESC (7,3%). Presente anche *F. avenaceum* e *F. sambucinum* (1%). La regione con maggiore presenza di campioni infetti da *Fusarium* è stata il Veneto (50%) seguita Umbria (31,3%) e Emilia Romagna (17,7%) (Figura 1.7).

I campioni contaminati da DON sono risultati il 30% di cui la metà erano sopra il limite di legge. Mentre i campioni contaminati da T-2/HT-2 sono risultati il 10%, tutti con valori inferiori alle raccomandazioni indicate per l'orzo (Figura 1.8).

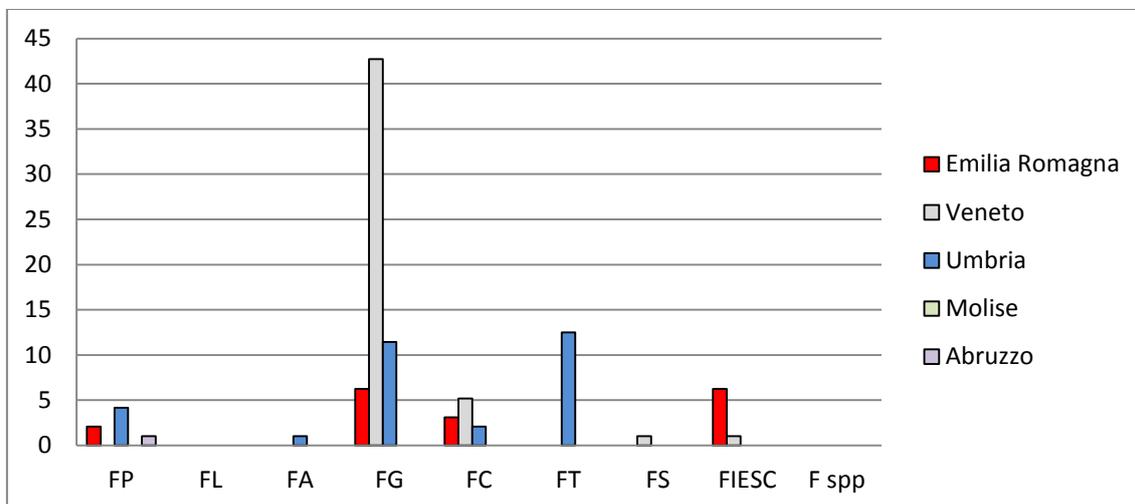


Figura 1.7: Frequenze medie di *Fusarium* riscontrate nelle diverse regioni di campionamento. Anno monitoraggio 2013 su n. 20 campioni.

FP = *F. poae*, FL = *F. langsethiae*, FA = *F. avenaceum*, FG = *F. graminearum*, FC = *F. culmorum*, FT = *F. tricinctum*, FIESC = *Fusarium Incarnatum Equiseti Species Complex*, FS = *F. sambucinum*, F spp = altri *Fusarium*.

Delle altre colonie fungine sviluppatesi dalle 100 cariossidi per ciascun campione, è risultato che *Alternaria* spp. (58,1%) e il suo teleomorfo *Lewia* spp. (10,6%) sono state le specie più frequenti seguite da *Pyrenophora* spp. (18,2%), *Epicoccum* spp. (4,6%), *Aspergillus* spp. (1,85%), *Cladosporium* spp. (1,1%) e *Cochliobolus* spp. (0,4%).

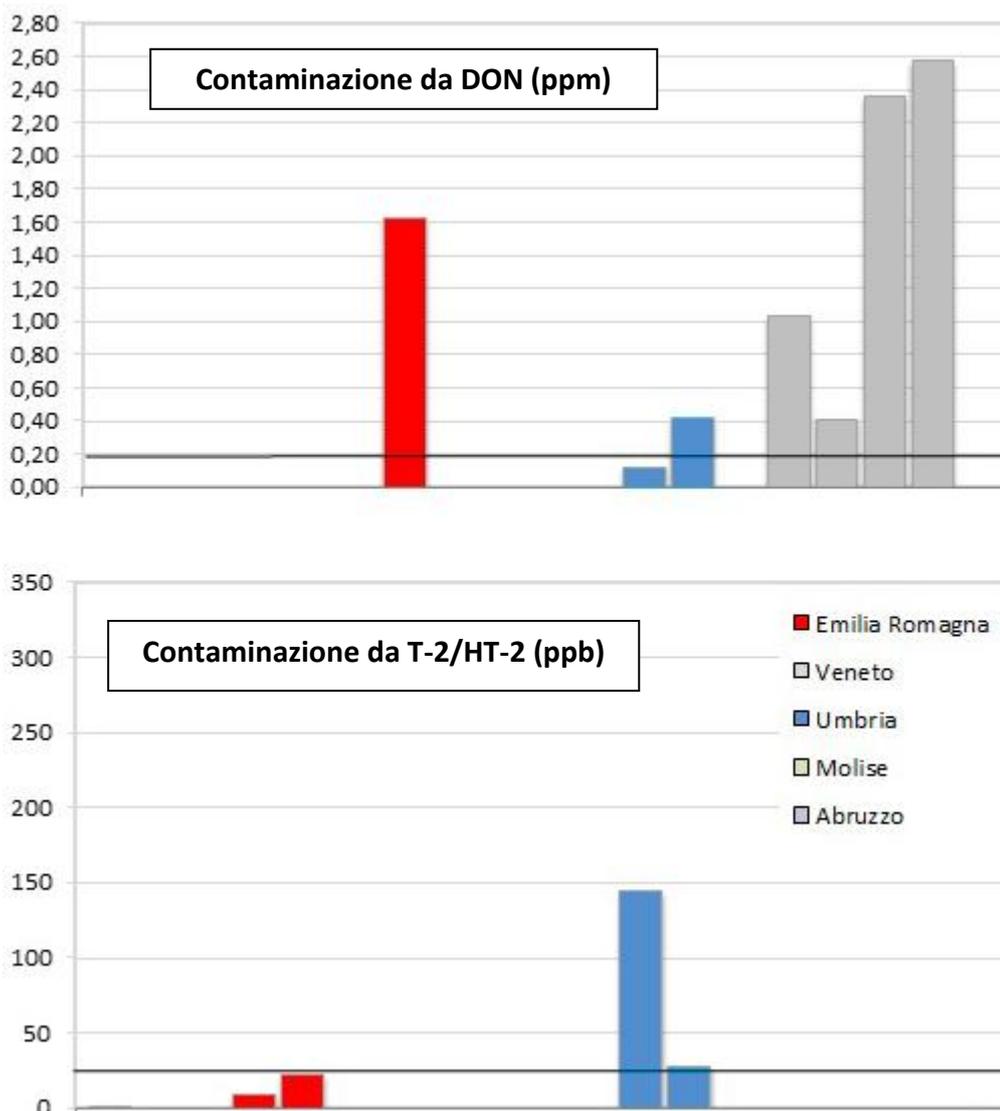


Figura 1.8: Quantificazione micotossine DON e T-2/HT-2 in 35 campioni di granella d'orzo suddivisi per regione. Anno 2013.

Le linee orizzontali contrassegnano il limite di *detection* (LOD) specifico dei kit ELISA. I colori rappresentano la regione (riportata in legenda) di provenienza dei campioni di seme.

DISCUSSIONE

Nel presente capitolo sono state identificate le specie di *Fusarium*, agenti della fusariosi della spiga dell'orzo, isolate da cariossidi di diversa provenienza italiana. Questi *Fusaria* sono tutte potenziali specie tossigene produttrici di tricoteceni, in particolare DON e T-2/HT-2, dannosi per la salute umana ed animale.

In Italia è stato rilevato che i funghi con maggiore capacità di produrre micotossine in frumento e mais appartengono al genere *Fusarium* (Moretti et al., 2004), mentre non risultano a riguardo indagini condotte su orzo. Questo è il primo studio di monitoraggio condotto in

diversi areali di coltivazione di orzo italiani in cui sono state identificate le specie di *Fusarium* coinvolte e le relative concentrazioni di micotossine DON e T-2/HT-2.

L'andamento stagionale, diverso negli anni di prova, ha determinato una differente presenza delle specie di *Fusarium* sui campioni analizzati. Le specie predominanti sono state *F. graminearum*, *F. poae*, *F. tricinctum* e *F. culmorum*. Erano presenti anche altre specie, quali quelle appartenenti al complesso FIESC, *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, *F. proliferatum* e *F. sambucinum*, tutte agenti causali della FHB dell'orzo (Gil-Serna et al., 2013; Goswami & Kistler, 2004; Steffenson, 2003; Yli-Mattila, 2010). In Canada, Clear et al. (2000), hanno rilevato che le principali specie di *Fusarium* presenti su granella di orzo erano *F. graminearum*, *F. poae* e *F. sporotrichioides* e in misura minore anche *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. sambucinum* e *F. tricinctum*, confermando in parte i risultati ottenuti con questo studio.

È importante considerare quali siano le esigenze climatiche delle principali specie di *Fusarium*. *F. graminearum*, l'agente più frequente della FHB, predilige climi caldi e umidi che caratterizzano il sud Europa, con un *optimum* di temperatura che oscilla tra i 28-30°C. *F. culmorum*, specie meno frequente rispetto a *F. graminearum*, preferisce condizioni climatiche di tipo continentale con temperature più basse, intorno ai 18-26°C (Xu & Nicholson, 2009). *F. culmorum* è maggiormente presente nelle regioni centro settentrionali dell'Italia, dove vi sono condizioni ambientali favorevoli al suo sviluppo. *F. poae*, la meno frequente delle specie finora citate in FHB, è favorito da alte temperature simili a quelle di *F. graminearum*, ma preferisce ambienti più secchi.

I funghi appartenenti a FIESC sono patogeni cosmopoliti, molto comuni nelle zone caratterizzate da un clima secco e tollerano un ampio range di temperature (13-30°C).

Tra gli altri generi fungini componenti della micoflora delle cariossidi analizzate, il più diffuso è risultato *Alternaria* insieme al suo teleomorfo *Lewia*. Nel 2013 è stata significativa la presenza di *Pyrenophora* spp, mentre *Epiccoccum* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp. sono stati sempre ritrovati in percentuali appena superiori al 1%. Clear et al. (2000), in accordo con i risultati nel presente studio, hanno rilevato che *Alternaria* spp. era tra i generi predominanti, segnalando anche l'elevata presenza di *Stagonospora*, *Cochliobolus* e *Cladosporium*, che invece in questo studio sono stati ritrovati solo parzialmente e con bassa frequenza d'isolamento.

Tra quelli considerati, l'anno più favorevole alla diffusione dei *Fusarium* patogeni è stato il 2011, in cui si è anche riscontrata una elevata presenza di micotossine DON e T-2/HT-2 anche se in pochi casi sopra i limiti di legge o di raccomandazioni comunitarie. Nel 2013

invece, considerato abbastanza favorevole all'istaurarsi della malattia, sono stati registrati valori di micotossina DON superiori alla normativa vigente per lo più nei campioni di provenienza veneta. Nella totalità dei campioni considerati nei tre anni di monitoraggio, solo il 4,5% superava i limiti di legge previsti per DON e il 3,4% quello delle raccomandazioni per T-2/HT-2. Gil-Serna et al. (2013) trovarono che in campioni di orzo l'86% era positivo per la presenza di *Fusarium* tossine di cui DON rappresentava il 72% e T-2/HT-2 il 10%.

È auspicabile continuare il monitoraggio cercando di ampliare non solo il numero di campioni, ma anche le regioni di provenienza dei campioni per fornire una mappatura della distribuzione delle specie di *Fusarium* in orzo nelle regioni italiane più interessate alla coltivazione di questo cereale, con lo scopo di prevenire e/o limitare le contaminazioni da micotossine .

CAPITOLO II

**VALUTAZIONE DELLA FUSARIOSI DELLA SPIGA IN TRE
CULTIVAR DI ORZO INOCULATE CON *F. GRAMINEARUM*,
F. CULMORUM E *F. POAE* IN AMBIENTE CONTROLLATO E
IN PROVE DI CAMPO**

RIASSUNTO

La fusariosi della spiga (FHB), causata da funghi appartenenti ai generi *Fusarium* e *Microdochium*, è una fitopatia che può influenzare significativamente, in condizioni climatiche particolarmente favorevoli, la resa e la qualità della granella di orzo con gravi conseguenze sulla sicurezza dei prodotti derivati. In Italia, FHB è stata studiata principalmente su frumento e poco si conosce di questa malattia su orzo.

In questo studio, sono state realizzate dapprima prove in ambiente controllato per valutare la sintomatologia indotta sulle spighe da singole specie di *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides*; quindi sono state condotte, per due anni consecutivi, prove di campo con tre diverse cultivar di orzo distico da birra, inoculando ceppi di *F. graminearum* e *F. culmorum* (in associazione) e *F. poae* (singolarmente), tutti potenziali produttori di tricoteceni. I parametri fitopatometrici sono stati correlati ai dati produttivi e qualitativi (micotossine prodotte). I due anni di prove di campo sono stati caratterizzati da condizioni climatiche molto diverse, che hanno influenzato i risultati delle prove. In particolare, nel primo anno, in cui le condizioni climatiche sono state più favorevoli alla malattia, sono stati rilevati valori di incidenza, gravità di malattia e FHB *index* più alti rispetto al secondo. Questi dati sono stati confermati dai risultati dell'analisi micologica della granella e dalla presenza di micotossine DON e T-2 e HT-2 ritrovati nelle farine. Nel primo anno sono stati spesso rilevati livelli di micotossine superiori ai limiti di legge o alle raccomandazioni europee. Per quanto riguarda i dati produttivi, non sono state riscontrate differenze significative tra le diverse tesi di una stessa cultivar.

INTRODUZIONE

La fusariosi della spiga dell'orzo è frequentemente riscontrata in Europa settentrionale (Goswami & Kistler, 2004; Yli-Mattila, 2010), tuttavia le conoscenze, riguardo gli agenti causali e l'effetto della fusariosi della spiga dell'orzo sulla qualità e la quantità della produzione, sono ancora incomplete. In Italia l'FHB dell'orzo è a tutt'oggi poco studiata.

Questa malattia è causata da un complesso che comprende 20 specie di *Fusarium*, di cui quella predominante è *F. graminearum*, seguita da *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* e *Microdochium nivale*.

Arseniuk et al. (1999) hanno osservato che un inoculo artificiale costituito da un mix di *Fusarium* spp. è in grado di produrre più sintomi di FHB rispetto ad un inoculo composto da una sola specie, rispecchiando più chiaramente quanto avviene in natura.

La diversità genetica per la resistenza a FHB in orzo è in gran parte associata all'infezione iniziale (Lewandowski et al., 2006; McMullen et al., 2012; Steffenson, 2003; Tekauz et al., 2000). Sebbene siano stati descritti cinque tipi di resistenza in frumento e orzo, solo tre tipi sono comunemente usati per lo screening del germoplasma (Chamarthi et al., 2014). La resistenza di tipo I, definita da Schroeder e Christensen (1963) come resistenza iniziale all'infezione, può essere determinata in serra o in campo. L'inoculazione spray al momento dell'antesi è riconosciuto essere un valido metodo per la valutazione della resistenza alle infezioni iniziali di linee di orzo infette da *F. graminearum* (Geddes et al., 2008). Lewandowski et al. (2006) hanno osservato che la penetrazione del fungo nelle spighe di orzo avviene principalmente attraverso le fessure tra palea e lemma, o attraverso l'apertura dell'infiorescenza apicale, evidenziando l'importanza della resistenza alle infezioni iniziali. La resistenza di tipo II, definita come resistenza alla diffusione nella spiga, è ottenuta mediante l'inoculazione puntiforme, che si determina iniettando i macroconidi di *Fusarium* direttamente nell'ovario del fiore e si valuta contando le spighe sintomatiche dopo un tempo definito (Geddes et al., 2008). La resistenza di tipo III è la capacità di produrre deossinivalenolo (DON) (Miller & Arnison, 1986).

Anche se la resistenza di tipo II è stata rilevata in alcune linee di orzo (Bushnell et al., 2003; Zhu et al., 1999), la resistenza di tipo I appare la più significativa (Steffenson, 2003), poiché in orzo le infezioni che originano da più punti sono più comuni rispetto alla diffusione nella spiga. Lo screening per la resistenza a FHB in orzo è, quindi, principalmente focalizzato sull'infezione iniziale delle spighe e sulla produzione di DON.

Le principali micotossine associate a FHB sono DON e nivalenolo (NIV), con le rispettive forme derivate, sono tricoteceni di tipo B, prodotti principalmente dalle specie *F. graminearum* e *F. culmorum* (Parry et al., 1995). Altre micotossine associate alla malattia sono tricoteceni di tipo A, tossina T-2 (T-2) e la tossina HT-2 (HT-2), prodotte principalmente da *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae* e da qualche ceppo di *F. poae*. Sono note anche micotossine emergenti (enniatine, beauvericine e monifilormine) che sono prodotte da altre specie di *Fusarium* (Bottalico & Perrone, 2002).

Problematiche della FHB nell'industria maltaria e nella produzione della birra

L'orzo è il principale ingrediente per la produzione della birra e contribuisce fino al 70% del costo per la produzione del malto e quest'ultimo concorre fino al 35% del costo per la produzione della birra (FAO, 2009).

L'infezione da *Fusarium* spp. durante lo sviluppo della cariosside, può provocare una riduzione sia quantitativa che qualitativa delle materie prime per la produzione della birra. Infatti la cariosside infettata subisce modificazioni sia dell'ultrastruttura che del metabolismo, con conseguente riduzione della *fitness* germinativa (Sarlin et al., 2007). Una volta presente nella cariosside, il micelio del fungo provoca la rottura della pareti cellulari e la demolizione delle sostanze di riserva che utilizza per il proprio sviluppo vegetativo per completare il ciclo biologico (Schwarz, 2003). Le cariossidi infette, subiscono una riduzione della capacità germinativa del 45% rispetto a quelle sane (Oliveira et al., 2012; Schwarz et al., 2001).

Altro problema di tipo tecnologico è il “*gushing*” e cioè l'iper-produzione di schiuma che avviene nell'immediata apertura di una bottiglia, senza che ci sia stata una precedente agitazione del contenitore (Garbe et al., 2008) (Figura 2.1). Il *gushing* può essere associato ad un grande numero di fattori ed in base a questi Gjertsen (1967) ha distinto due categorie: *gushing*, primario e secondario. Nel *gushing* primario il fattore scatenante è la presenza di metaboliti prodotti da microrganismi fungini tra cui alcune specie di *Fusarium* presenti nel malto utilizzato per la produzione della birra (Sarlin, 2012). Il *gushing* secondario è invece causato da ioni metallici (in particolare Ni e Fe), impurità, ossalato di calcio e tensioattivi residui di prodotti utilizzati per la pulizia delle bottiglie. Di fatto il *gushing* secondario deriva da procedure non corrette intervenute nel processo di trasformazione (Gardner, 1973). Molti studi (Garbe et al., 2008; Gardner, 1973; Gjertsen, 1967; Sarlin et al., 2005; Sarlin et al., 2007; Schwarz et al., 1995) hanno evidenziato una stretta correlazione tra la presenza di specie di *Fusarium* associate alla FHB e il fenomeno del *gushing* (Sarlin, 2012). Questi funghi producono idrofobine, proteine extracellulari anfipatiche a basso peso molecolare 7-20 kDa (Wessels, 1996).

Da un punto di vista biologico, le idrofobine hanno un ruolo di primaria importanza sia per i processi morfogenici dei funghi, infatti sono implicate nella formazione di spore e corpi fruttiferi, sia per la modificazione dell'ambiente circostante dato che permettono di modificare da idrofila a idrofobica e vice versa la natura della superficie (cuticola e tessuti delle piante) con cui è a contatto l'ifa fungina, riducendo la tensione superficiale dell'acqua e facilitando l'adesione e/o penetrazione del fungo (Garbe et al., 2008; Wessels, 1996).

Grazie alle loro proprietà chimiche, le idrofobine sono in grado di formare strati con interfacce idrofile e idrofobiche, provocando una stabilizzazione delle bolle d'aria nel liquido. La riduzione della tensione superficiale, inoltre, porta ad un'ulteriore formazione di bolle che, nel caso in di un calo repentino della pressione, come avviene quando si apre una bottiglia, determina un incremento delle dimensioni di queste, con conseguente rilascio di CO₂ dalla

soluzione sovrasatura provocando il *gushing* (Gardner, 1973). La concentrazione di idrofobine che provoca il *gushing* è molto bassa e varia da 0,05 a 0,5 mg/kg (Sarlin et al., 2005). Ad oggi, per determinare il rischio di *gushing*, sono stati messi a punto numerosi test di laboratorio (Vaag et al., 1993). Il test sulle micotossine rientra fra questi, anche se le micotossine non provocano direttamente il *gushing*, ma la loro produzione è strettamente correlata con lo sviluppo e la crescita della biomassa di *Fusarium* (Garbe et al., 2007; Schwarz et al., 1995). La bibliografia riporta dati contrastanti sulla relazione tra il contenuto di DON e il potenziale di *gushing*. Sarlin et al. (2005) non ha trovato correlazioni tra la quantità di DON contenuto nei campioni di malto e il potenziale di *gushing*; in contrasto con quanto osservato da Schwarz et al. (1995), Garbe et al. (2007) e in particolare da Nielsen et al. (2014) il quale sul 70% dei campioni studiati con alti livelli di DON ha osservato fenomeni di *gushing*.

Per evitare il fenomeno del *gushing* e per ovviare alle altre problematiche legate alla presenza di funghi associati alla FHB dell'orzo, risulta fondamentale l'utilizzo da parte dell'industria maltaria di cariossidi sane (Buiatti et al., 2006). Oltre a problematiche di tipo tecnologico, esistono anche problemi di ordine sanitario. Infatti DON, la principale micotossina rilevata nell'orzo, è solubile in acqua, quindi facilmente estraibile dal malto e può essere presente nel prodotto finale (Nielsen et al., 2014).

Durante il processo di maltazione, si creano condizioni ambientali (20-25°C e 100% umidità relativa) idonee allo sviluppo del fungo e ne consegue un'addizionale produzione di DON. In particolare, la biosintesi di DON durante il processo di maltazione si concentra nella fase di tostatura (Nielsen et al., 2014) in cui, nonostante si raggiungano temperature sfavorevoli alla proliferazione di *Fusarium*, si producono grandi quantità di DON in risposta allo stress termico e la tossina, termostabile, rimane inalterata (Sarlin et al., 2005; Sarlin et al., 2007). Studi condotti da Oliveira et al. (2012) hanno evidenziando come su un campione di orzo infettato al 20%, la produzione di DON aumentasse del 75% durante la fase di tostatura.

Negli ultimi anni, la produzione complessiva di orzo in Italia si è attestata sulle 950 mila tonnellate, di cui il 10% è costituito da orzo distico per malto da birra, ciò spiega il crescente interesse al contenimento delle malattie di questo cereale, che, da sempre, è stato considerato minore. Pertanto, anche i danni da FHB in orzo devono essere costantemente monitorati ed è fondamentale la conoscenza dell'epidemiologia della malattia. Per questa ragione sono state condotte prove sperimentali di inoculazione artificiale di *Fusarium* in cultivar di orzo distico ad uso maltario, per valutare la sintomatologia, l'incidenza, la severità della malattia, il danno sulla granella e la contaminazione da micotossine DON e T-2/HT-2.



Figura 2.1: Effetto *gushing* in bottiglie di birra. Tratto da Linder et al. 2005.

MATERIALI E METODI

Produzione dell'inoculo

Tutte le prove, in ambiente controllato e in pieno campo, sono state realizzate impiegando come inoculo sospensioni conidiche di ceppi delle singole specie di *F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae* presenti nella collezione del Laboratorio di Micologia Fitopatologica del DipSA dell'Università di Bologna e caratterizzati per patogenicità e presenza dei geni per la produzione di DON e T-2/HT-2.

I ceppi di *Fusarium* sono stati coltivati su piastre contenenti PDA per 7 giorni e dalle colonie sviluppate sono stati prelevati tondelli del diametro di 5 mm. Per ciascun ceppo, due tondelli sono stati posti in beute contenenti 150 ml di brodo colturale V8 (Singleton et al., 1992). Il terreno liquido V8 è stato preparato miscelando energicamente 1 L di succo vegetale a base di pomodoro V8 con 5 g di carbonato di calcio. Questa miscela è stata quindi centrifugata a 4.000 rpm per un tempo di 20 minuti. Il surnatante è stato poi diluito con acqua demineralizzata 1:4 (v/w), quindi autoclavato a 120°C per 15 minuti. Le beute contenenti V8 inoculate con *Fusarium* sono state lasciate in agitazione per 2 settimane in un agitatore orizzontale (MaxQ 4.000, Thermo Fisher) a 120 rpm, 25°C, sotto luce solare incidente.

Quindi il contenuto di ogni beuta è stato filtrato per separare il micelio dai conidi e la sospensione ottenuta è stata poi conservata a 4°C al buio. La concentrazione conidica è stata

misurata con un ematocitometro e aggiustata, rispettivamente per le prove in ambiente controllato e pieno campo a) ad un valore pari a 1×10^4 conidi/ml e 1×10^5 conidi/ml per il mix di *F. graminearum* e *F. culmorum* e b) ad un valore pari a $1,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^6$ conidi/ml nel caso di *F. poae*, *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae*.

Prove in ambiente controllato e valutazione dei sintomi di FHB

In serra sono state allestite prove con lo scopo di evidenziare la sintomatologia causata da alcune specie di *Fusarium* su spighe di orzo distico. Per garantire una corretta spigatura delle piante è stata scelta la cultivar Tunika, ad *habitus* primaverile ed è stato preventivamente eseguito un protocollo di vernalizzazione dei semi germinati. La prova è stata organizzata utilizzando 9 ceppi di *Fusarium* di seguito elencato (ogni ceppo corrisponde ad una tesi). Ogni tesi comprendeva 2 piante ripetute 3 volte. Sono stati utilizzati i seguenti ceppi il cui codice di identificazione è riportato tra parentesi:

- (1) *F. poae* (F448)
- (2) *F. poae* (F1157)
- (3) *F. sporotrichioides* (F1144)
- (4) *F. sporotrichioides* (F1145)
- (5) *F. langsethiae* (F1158)
- (6) *F. langsethiae* (F9489)
- (7) *F. graminearum* (F913)
- (8) *F. culmorum* (F820)
- (9) controllo (piante non inoculate)

Per l'intera durata della prova le condizioni ambientali sono state impostate alla temperatura $24 \pm 2^\circ$ C, umidità relativa del 70%, 14 ore di luce ad intensità di 30.000 lux.

Ogni pianta ha prodotto più culmi secondo il coefficiente di accostamento tipico della cultivar. Per indurre una risposta di resistenza di tipo I, le piante sono state inoculate allo stadio fenologico BBCH 53 mediante nebulizzazione (2 ml/spiga). Ogni spiga è stata quindi incappucciata con un sacchetto di plastica trasparente (Figura 2.2) per 48 ore nelle tesi *F. graminearum* e *F. culmorum* e per 72 ore nelle restanti tesi.



Figura 2.2: Prova inoculazione artificiale su piante di orzo cv Tunika.

L'eventuale manifestazione e sviluppo dei sintomi da FHB sono stati osservati a partire da una settimana dall'inoculazione. La presenza del patogeno è stata verificata mediante inoculazione di diverse parti della spiga in piastre Petri contenenti substrato agarizzato (PDA) che sono state poste a 25°C al buio.

Prove di campo

Nelle annate agrarie 2012-2013 e 2013-2014, presso l'azienda sperimentale dell'Università di Bologna a Cadriano (BO), sono state realizzate prove di inoculazione artificiale di piante di orzo. Queste prove sono state condotte per valutare l'effetto dei *Fusarium* sulla formazione dei sintomi, la produzione di granella e la contaminazione da tricoteceni DON e T-2/HT-2.

Sono state utilizzate le seguenti cultivar di orzo distico ad uso maltario: Quench, Wintmalt e Varenne a doppia attitudine, maltaria e zootecnica. Le cultivar di orzo sono state seminate contemporaneamente, in autunno, con una dose di seme di 160 kg/ha. Sono state effettuate le normali pratiche agricole del luogo, esclusi i trattamenti fungicidi. I dati climatici sono stati forniti dalla stazione meteo dell'Università di Bologna presente nell'azienda ed includono temperatura media, minima e massima giornaliera (T), umidità relativa (RH) e precipitazioni dal periodo antecedente la fioritura fino al momento della raccolta.

Le parcelle, distribuite secondo lo schema del blocco randomizzato con tre ripetizioni, avevano dimensioni pari 2,2 x 1,2 m.

Le tesi predisposte per ogni cultivar sono le seguenti:

- (1) inoculazione con sospensione conidica di *F. poae* (Fp)

- (2) inoculazione con sospensione conidica di *F. graminearum* e *F. culmorum* (Fg+Fc)
- (3) trattamento con acqua (Test)
- (4) trattamento con fungicida Proline star® (Bayer CropScience) (Proline)
- (5) inoculazione con sospensione conidica di *F. poae* in piante trattate con fungicida Proline star® (Fp+Proline)
- (6) inoculazione con sospensione conidica di *F. graminearum* e *F. culmorum* in piante precedentemente trattate con fungicida Proline star® (Fg+Fc+Proline).

Le piante sono state inoculate nebulizzando i ceppi di *Fusarium* sulle spighe allo stadio fenologico in cui presentavano il 30% di antere emesse (BBCH 53). Sono stati nebulizzati 114 ml/m² di sospensione conidica ad una concentrazione di 1,5 x 10⁶ e 1 x 10⁵ conidi/ml, rispettivamente per le tesi con *F. poae* e quelle con il co-inoculo di *F. graminearum* e *F. culmorum*.

Il trattamento fungicida è stato invece effettuato nelle 24-72 ore antecedenti le inoculazioni dei *Fusarium*, con Proline star® (Bayer CropScience) con dosaggio di 0,80 L/ha. Proline è un fungicida sistemico acropeto a base di proticonazolo (12,7%) e tebuconazolo (12,7%), noto per contenere gli agenti di FHB e la produzione di micotossine in frumento (Alvisi et al., 2011).

Tutti i rilievi sono stati effettuati a distanza di circa una, due e tre settimane dal giorno dell'inoculazione artificiale (Tabella 2.1), annotando l'incidenza e la diffusione delle aree necrotiche su 100 spighe per parcella (severità).

L'Incidenza (DI - *Disease Incidence*) è espressa come percentuale di spighe sintomatiche sul totale delle esaminate ed è stata calcolata con la seguente formula

$$\text{Incidenza (DI)} = \frac{\text{n. di spighe infette}}{\text{n. di spighe del campione}} \times 100$$

La severità (DS - *Disease Severity*) è stata valutata sullo stesso campione di spighe di cui sopra, ma solo per le tesi inoculate con il mix *F. graminearum* e *F. culmorum* e per le tesi di controllo, secondo la scala fitopatometrica (Giannini et al., 2013). La severità della malattia è stata calcolata con la formula seguente (Xue et al., 2006).

$$\text{Severità (DS)} = \frac{\sum_0^{95} \text{n. di spighe infette} \times \text{ogni percentuale di spiga malata}}{\text{n. totale di spighe infette}} \times 100$$

Il calcolo di *FHB index* è stato effettuato con la formula seguente (Tekauz et al., 2000):

$$FHB \text{ index} = \text{Incidenza (DI)} \times \text{Severità (DS)} / 100$$

Le spighe delle diverse parcelle sono state raccolte a maturazione fisiologica. La tempistica dei diversi interventi è riportata nella Tabella 2.1.

Per ogni parcella è stato rilevato il peso della granella, poi sono stati prelevati dei sub-campioni di trecento cariossidi per tesi su cui è stato valutato *Fusarium Damaged Kernels* (FDK), cioè il numero di cariossidi che presentano i sintomi della FHB.

Tabella 2.1: Date trattamenti fungicidi, inoculazioni e rilievi prove di campo.

Anno prova	Cultivar	Trattamento fungicida	Data inoculazione	I Rilievo	II Rilievo	III Rilievo	Giorno raccolta
1	Varenne	03/05/2013	06/05/2013	11/05/2013	20/05/2013	28/05/2013	04/07/2013
1	Quench	13/05/2013	14/05/2013	20/05/2013	28/05/2013	04/06/2013	04/07/2013
1	Wintmalt	21/05/2013	22/05/2013	29/05/2013	04/06/2013	12/06/2013	04/07/2013
2	Varenne	14/04/2014	16/04/2014	23/04/2014	28/04/2014	06/05/2014	16/06/2014
2	Quench	14/04/2014	16/04/2014	23/04/2014	28/04/2014	06/05/2014	16/06/2014
2	Wintmalt	05/05/2014	06/05/2014	14/05/2014	-	-	16/06/2014

Analisi micologica delle cariossidi

Per verificare la presenza delle tre specie di *Fusarium*, sub-campioni da 100 cariossidi per parcella (300 cariossidi per tesi) sono stati sottoposti ad analisi micologica secondo la metodologia riportata nel capitolo I e identificati morfologicamente secondo quanto descritto da (Leslie & Summerell, 2006).

La restante granella è stata macinata e conservata in cella refrigerata a 4°C per la quantificazione delle micotossine.

Quantificazione delle micotossine DON e T-2/HT-2

Con la farina ottenuta dalla granella sono stati condotti dei saggi immunoenzimatici per quantificare la presenza di micotossine, utilizzando kit di diagnosi AgraQuant Deoxynivalenol e AgraQuant T-2/HT-2 (Romer Labs®). Per la metodologia si rimanda a quanto descritto nel capitolo I.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato usato il software IBM SPSS 20. La comparazione delle medie, su set di dati multipli, è stata effettuata mediante analisi della varianza (ANOVA) con un livello di significatività di $p \leq 0.05$. I risultati sono stati confrontati con il test post hoc di

Tukey HDS. Le analisi di correlazione sono state calcolate usando il coefficiente di correlazione di Pearson (indice r) con $p \leq 0,05$.

RISULTATI

Prove in ambiente controllato

In questa prova è stato possibile osservare l'evoluzione della malattia fino al momento della morte fisiologica della pianta. Sin dal momento in cui sono stati tolti i sacchetti di plastica dalle spighe inoculate con i patogeni, nella maggior parte delle piante, indipendentemente dal ceppo di *Fusarium*, era visibile la presenza di micelio alla sommità delle glume. I sintomi sono stati osservati nelle reste, nel rachide, nella rachilla, nelle glume e nei tegumenti seminali. I sintomi causati da *F. graminearum* e *F. culmorum* erano simili tra di loro e costituiti da imbrunimenti delle spighe. Per la valutazione della severità di malattia è stata messa a punto una scala che prende ispirazione da quella proposta da Parry et al. (1984) per frumento (Figura 2.3). La scala realizzata per orzo considera le stesse percentuali della scala di Parry, ma il valore 2% indica la sintomatologia su una sola spigetta, 5% su due, 10% su tre. Le restanti percentuali si riferiscono alla frazione dell'area infetta della spiga e precisamente 25% a $\frac{1}{4}$, 50% a $\frac{1}{2}$, 75% a $\frac{3}{4}$ e 95% maggiore di $\frac{3}{4}$ (Figura 2.4).

Per quanto riguarda *F. poae* i sintomi erano caratterizzati da tacche necrotiche ad “occhio di pavone”, o semplicemente puntiformi, che sono rimaste localizzate a livello di una o poche spighe (Figura 2.5). È stato quindi possibile rilevare la presenza/assenza (incidenza) e non stabilire la severità della malattia.

Per quanto riguarda *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides* non sono stati osservati sintomi specifici sulle glume, anche se, a maturazione fisiologica si è notata la formazione di spighe striminzite (Figura 2.6 e 2.7).

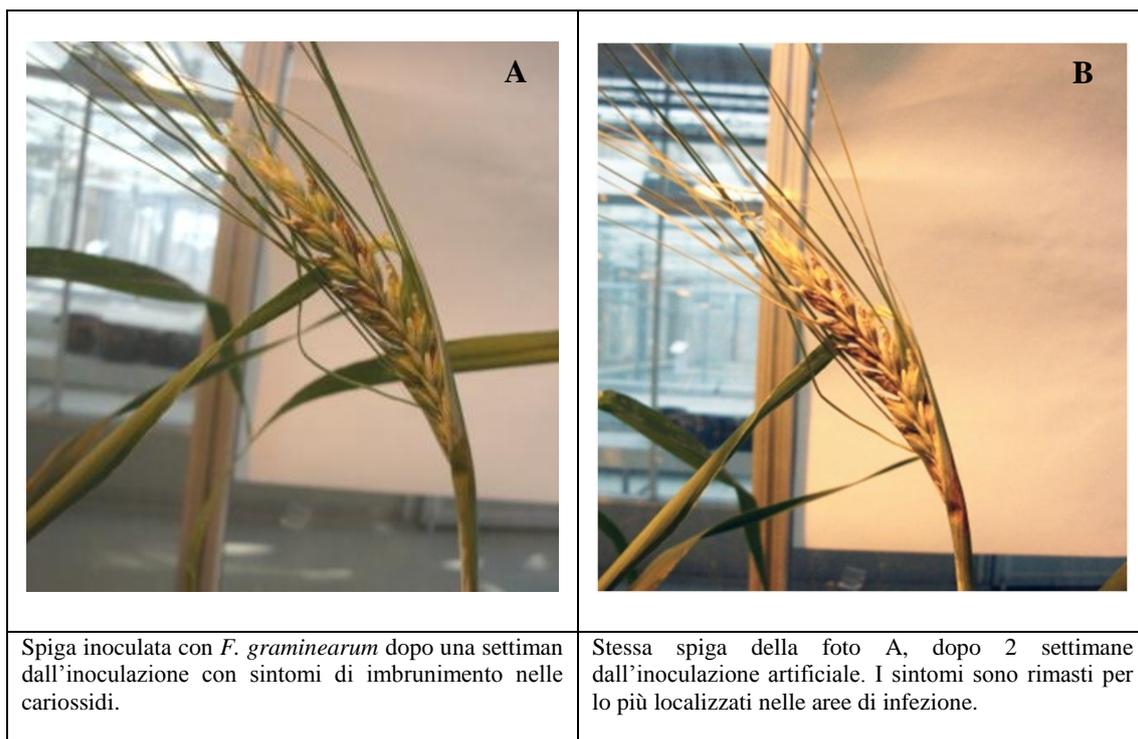


Figura 2.3: A, B: Sintomi su spighe inoculate con *F. graminearum*.

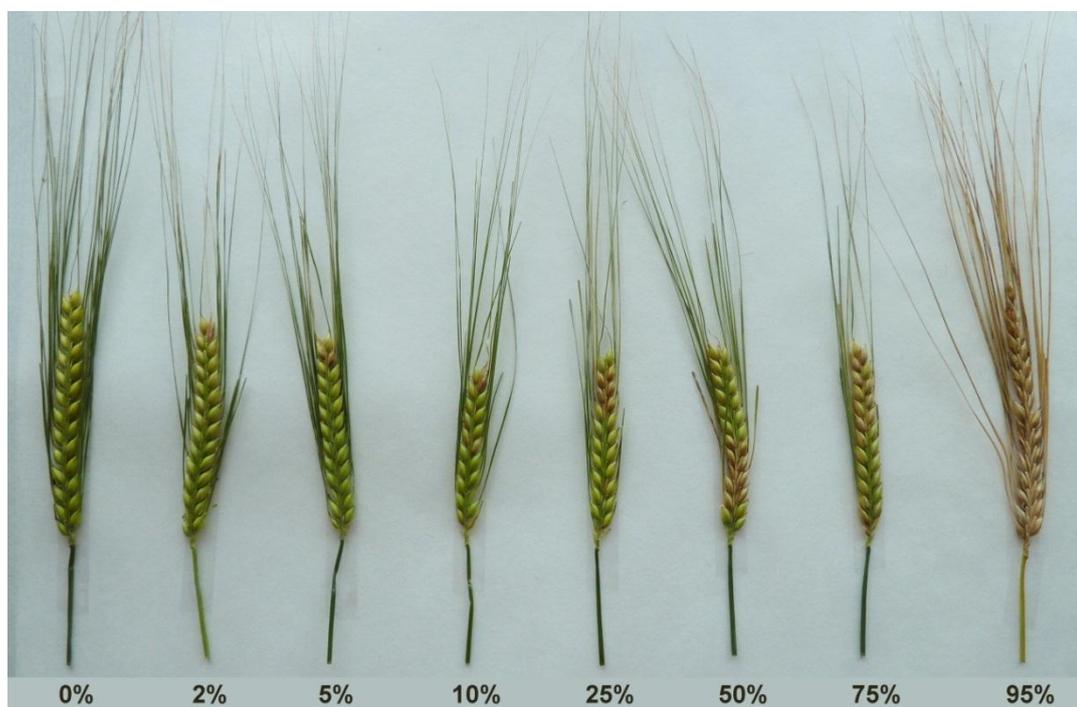


Figura 2.4: Scala fitopatometrica di cultivar di orzo distico. I sintomi sono stati determinati dall'inoculazione artificiale con *F. graminearum* e *F. culmorum*.

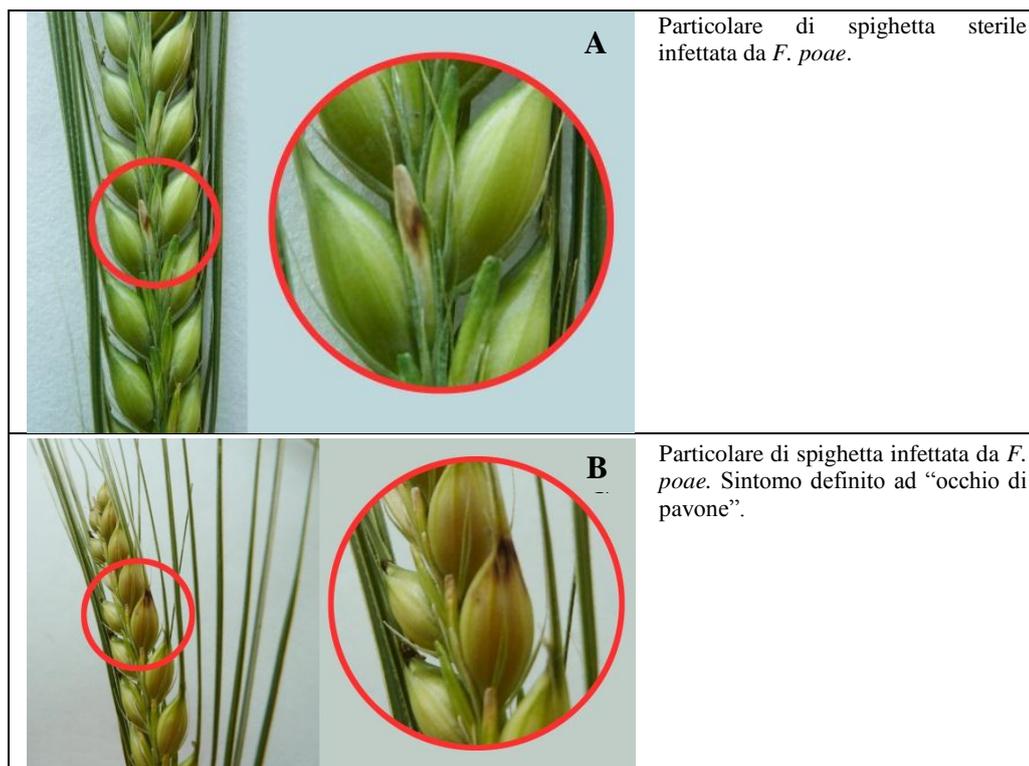


Figura 2.5: A, B,; sintomi su spighe inoculate con *F. poae*.



Figura 2.6: A, B: sintomi su spighe inoculate con *F. sporotrichioides*.



Figura 2.7: A, B, C, D: sintomi su spighe inoculate con *F. langsethiae*.

Prove di campo

Nei due anni di prova in campo i sintomi determinati da *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* sono stati rilevati costantemente come parziali o complete necrosi di singole o multiple spighe per spiga.

I risultati dei parametri valutati sono riportati in tabelle, suddivisi per anno, per cultivar e per specie di *Fusarium*.



Figura 2.8: Campo prova parcellare con tre le cv di orzo, Cadriano 2013.



Figura 2.9: Spighe di orzo affette da FHB. Prove campo.

Primo anno di prova: 2012-13

L'andamento delle condizioni climatiche dal primo maggio al 10 luglio è riportato in Figura 2.10.

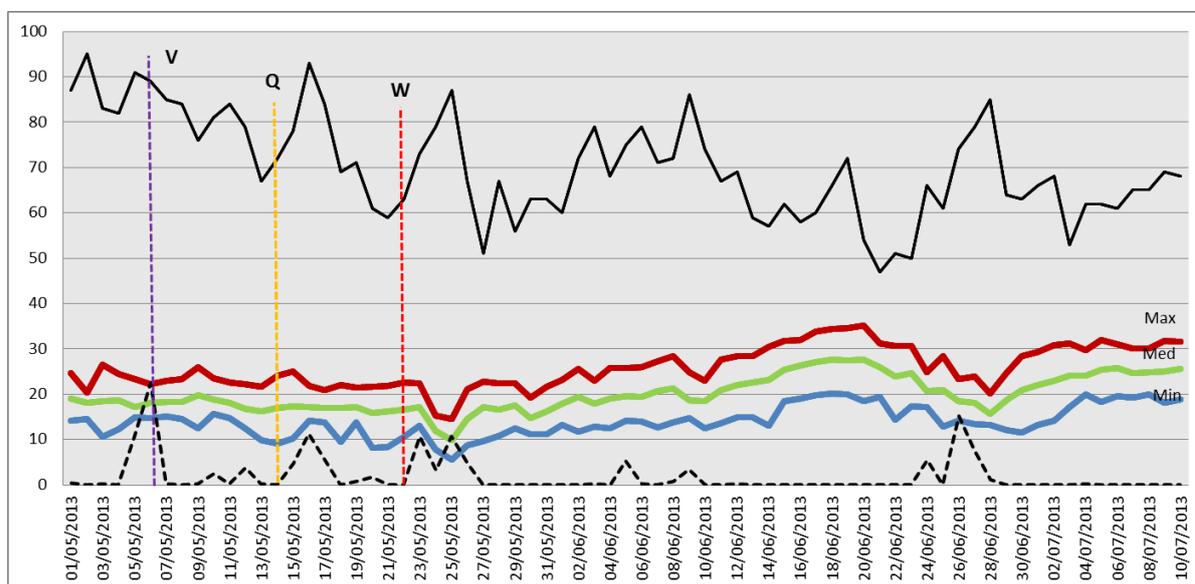


Figura 2.10: Condizioni climatiche anno 2013 (T min., med. e max., precipitazioni in mm e umidità relativa) con contrassegnate le date delle inoculazioni artificiali per ciascuna cultivar.

In nero (tratto continuo) è rappresentata la percentuale di umidità relativa nell'aria; in nero (tratto tratteggiato), le precipitazioni espresse in millimetri. Le linee in grassetto colorate sono le temperature massime, medie e minime. Le linee verticali rappresentano le date di applicazione dell'inoculazione artificiale nelle singole cultivar: viola per Varenne (V), gialla per Quench (Q) e rossa per Wintmalt (W).

Nel 2013, nelle parcelle non inoculate sono stati riscontrati sintomi da FHB, ciò indica la presenza di inoculo naturale in tutte le cultivar. Nel complesso si è osservato quanto riportato di seguito.

La percentuale di incidenza di FHB riscontrata nella tesi Fg+Fc è stata per le cv Varenne (Tabella 2.2) e Quench (Tabella 2.3) al I rilievo 41,7% e 30,7%, al II rilievo 45,9% e 56,7% e al III rilievo 68% e 67%, tutte significativamente più alti rispetto a quelli della tesi Fg+Fc+Proline eccetto che per il II rilievo della cv Varenne. Per la cultivar Wintmalt (Tabella 2.4), invece, non si sono riscontrate differenze significative tra le tesi ai diversi rilievi.

Per quanto riguarda la severità di malattia (DS), in generale si sono riscontrati bassi valori e non significativamente differenti fra le tesi nei tre rilievi e nelle tre cultivar. Ha fatto eccezione la cv Wintmalt che al II rilievo per la tesi Fg+Fc+Proline ha registrato una DS pari a 3,6%, valore significativamente più alto rispetto a quelli delle altre tesi (Tabelle 2.2-2.3-2.4). Limitatamente alle tesi con *F. graminearum* e *F. culmorum*, è stato valutato FHB index, che, nei singoli rilievi, è risultato statisticamente significativo: in particolare per Varenne al II

rilievo tra le tesi Proline (1,3%) e Fg+Fc (3%) e al III rilievo tra le stesse tesi (2,5% e 6,4%) (Tabella 2.2). Anche per Quench (Tabella 2.3) si sono osservati valori di FHB *index* significativi: al II rilievo la tesi Proline ha fatto registrare il valore più basso (1,2%) differenziandosi da quello delle altre tesi, mentre al III rilievo è la tesi Fg+Fc con il valore più alto 6,6% che si differenzia dalle altre. Per la cultivar Wintmalt (Tabella 2.4), invece, non si sono riscontrate differenze significative tra le tesi ai diversi rilievi. Nelle figure di seguito riportate (Figura 2.11, 2.12 e 2.13), si può notare un andamento della malattia, nelle cv Varenne, Quench e Wintmalt, tendenzialmente esponenziale, con una fase di latenza fra il I e II rilievo ed un rapido incremento dalla seconda alla terza settimana dall'inoculazione.

Per quanto riguarda le tesi inoculate con *F. poae* DI non è risultata nel III rilievo statisticamente significativa rispetto alla tesi Fp+Proline per tutte le cultivar (Tabella 2.5, 2.6 e 2.7). I valori di DI delle tesi non inoculate con il fungo si sono statisticamente discostati, con valori più bassi, da quelli delle tesi inoculate al III rilievo per le cv Varenne (Tabella 2.5) e Quench (Tabella 2.6) e al II rilievo per Varenne Wintmalt (Tabella 2.7).

I dati di produzione non sono risultati statisticamente significativi tra le tesi (Tabella 2.8).

Nella Tabella 2.9 sono indicate le specie di *Fusarium* re-isolate dalla granella delle varie tesi oggetto di studio. Il numero totale di colonie di *Fusarium* isolate dalla granella è stato variabile con valori di frequenza pari a 71,33% nella cv Varenne, 40,48% in Wintmalt e 36% in Quench. Tali valori sono stati posti pari a 100 per esprimere la percentuale di presenza delle singole specie. Le specie mediamente più presenti sono state *F. graminearum* (7,56% nella cv Varenne, 0,89% in Quench, 2,85% in Wintmalt) e *F. culmorum* (6,33 % nella cv Varenne, 4,56 % in Quench, 4,04 % in Wintmalt). *F. poae* è stato isolato con valori di 2,22 % in Varenne, 0,67 % in Quench, e 0,44 % in Wintmalt. Sono state ritrovate, con bassi valori percentuali, anche altre specie oltre a quelle inoculate come quelle appartenenti al complesso FIESC e *F. langsethiae*. Nella Tabella 2.9 è anche riportato il valore di FDK per ciascuna tesi e cultivar. In generale si notano valori costanti all'interno della stessa cultivar indipendentemente dalla tesi.

I livelli delle micotossine DON e T-2/HT-2 distinte tra le diverse tesi per ciascuna cultivar sono riportati nella Tabella 2.10. Si è osservato un minore contenuto di DON nella tesi trattate Proline rispetto alla tesi Fg+Fc in Varenne e Quench. In Wintmalt DON è assente. Per quanto riguarda T-2/HT-2, le tesi inoculate con Fp mostrano contenuti più alti rispetto a quelle non inoculate solo nella cv Quench (Tabella 2.10).

Tabella 2.2: Incidenza (DI), severità di malattia (DS) e FHB *index* nelle tesi inoculate con un mix di *F. graminearum*, *F. culmorum* per la cultivar Varenne nell'anno 2013.

VARENNE									
TESI	DI			DS			FHB <i>index</i>		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	27,3 a	44 ab	60,3 ab	3,1	4,0	4,0	0,9	1,8 ab	5,2 ab
Proline	12,3 b	33,7 b	46,3 b	2,5	3,7	3,7	0,3	1,3 b	2,5 b
Fg + Fc	41,7 a	45,9 a	68 a	5,7	6,7	6,7	2,4	3,0 a	6,4 a
Fg + Fc + Proline	22,3 b	39,3 ab	47,2 b	2,6	4,1	4,1	0,6	1,6 ab	3,4 ab
p value	0,006	0,014	0,012	0,082	0,21	0,167	0,255	0,049	0,022

Tabella 2.3: Incidenza (DI), severità di malattia (DS) e FHB *index* nelle tesi inoculate con un mix di *F. graminearum*, *F. culmorum* per la cultivar Quench nell'anno 2013.

QUENCH									
TESI	DI			DS			FHB <i>index</i>		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	24,7 ab	50,3 a	59 ab	2,7	5,7	6,2 b	0,7	2,9 a	3,8 b
Proline	21,3 ab	23,3 b	36,7 b	3,1	4,9	4,8 ab	0,6	1,2 b	1,8 b
Fg + Fc	30,7 a	56,7 a	67 a	5,0	6,7	9,9 b	1,5	3,9 a	6,6 a
Fg + Fc + Proline	17,7 b	28,3 b	38,7 b	2,9	5,0	5,5 ab	0,5	1,4 a	2,2 b
p value	0,021	0,000	0,013	0,119	0,431	0,012	0,060	0,023	0,001

Tabella 2.4: Incidenza (DI), severità di malattia (DS) e FHB *index* nelle tesi inoculate con un mix di *F. graminearum*, *F. culmorum* per la cultivar Wintmalt nell'anno 2013.

WINTMALT									
TESI	DI			DS			FHB <i>index</i>		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	4,3	22,0	53,0	3,1	2,8 b	10,3	0,1	0,5	5,4
Proline	2,7	6,0	48,7	1,5	2,3 b	7,7	0,1	0,2	3,7
Fg + Fc	6,0	18,0	58,3	2,4	2,6 b	13,2	0,2	0,5	7,6
Fg + Fc + Proline	3,7	10,5	49,8	3,5	3,6 a	9,6	0,2	0,4	5,1
p value	0,264	0,164	0,756	0,674	0,007	0,267	0,893	0,117	0,135

Tabella 2.5: Incidenza (DI) di spighe infettate con *F. poae* nella cv. Varenne nell'anno 2013.

VARENNE			
TESI	DI %		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	16,0	16,0	42,0 ab
Proline	8,0	22,0	24,0 b
Fp	12,0	12,0	58,0 a
Fp + Proline	12,0	42,0	48,0 a
p value	0,645	0,093	0,029

Tabella 2.6: Incidenza (DI) di spighe infettate con *F. poae* nella cv. Quench nell'anno 2013.

QUENCH			
TESI	DI %		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	8,0	32,0	30,0 ab
Proline	8,0	22,0	20,0 b
Fp	14,0	30,0	43,3 a
Fp + Proline	14,0	30,0	43,3 a
p value	0,060	0,173	0,026

Tabella 2.7: Incidenza (DI) di spighe infettate con *F. poae* nella cv. Wintmalt nell'anno 2013.

WINTMALT			
TESI	DI %		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	2,0	6,0 b	24,0
Proline	n.d.	2,0 b	20,0
Fp	2,0	14,0 a	59,0
Fp + Proline	2,0	8,0 a	40,0
p value	0,114	0,028	0,052

cv. Varenne

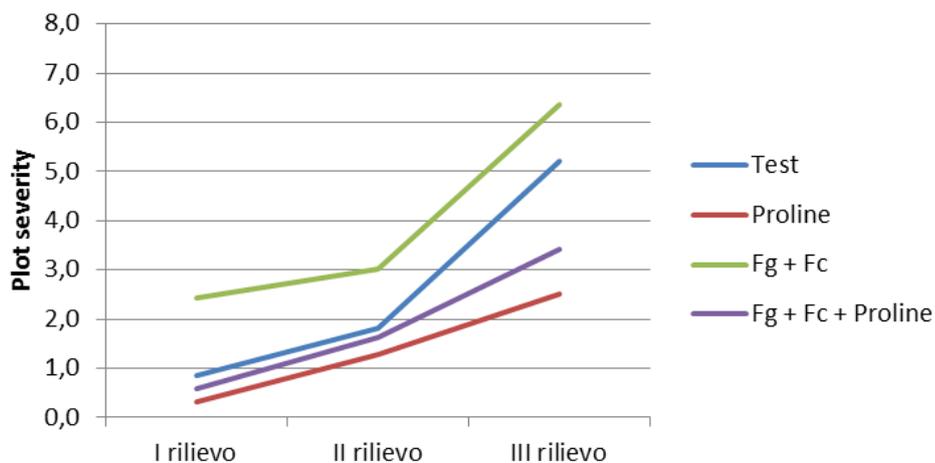


Figura 2.11: FHB index della cv Varenne nei tre rilievi effettuati nel 2013.

cv. Quench

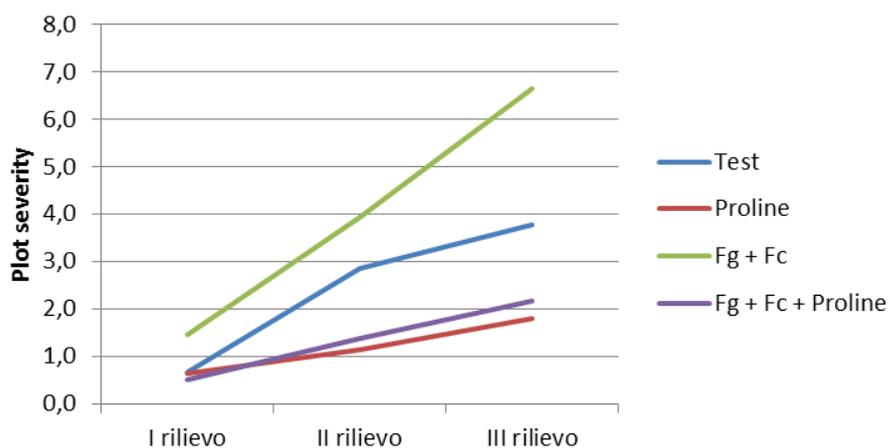


Figura 2.12: FHB index della cv Quench nei tre rilievi effettuati nel 2013.

cv. Wintmalt

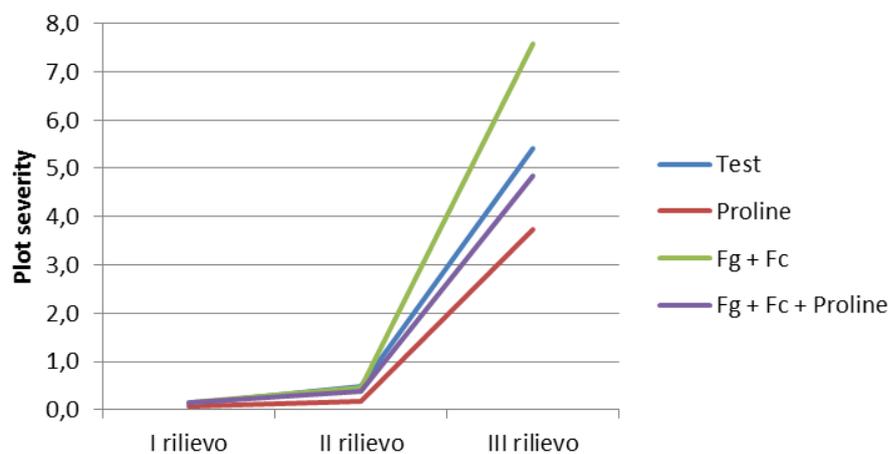


Figura 2.13: FHB index della cv Wintmalt nei tre rilievi effettuati nel 2013.

Tabella 2.8: Dati di produzione, anno di prova 2012-13.

2013	Produzione (t/ha)*		
	Varenne	Quench	Wintmalt
Test	9,03	15,21	8,04
Proline	9,11	15,62	7,30
Fg + Fc	9,20	15,39	8,51
Fg + Fc + Proline	7,91	16,41	7,45
Fp	8,40	15,51	8,04
Fp + Proline	9,74	15,51	7,67

*Valori riferiti al 13% di umidità relativa.

Tabella 2.9: Percentuale di colonie di *Fusarium* spp. re-isolate da granella. I dati corrispondono alle medie delle specie di *Fusarium* re-isolate ed espresse in valori percentuali rispetto a *Fusarium* spp. totali posti uguali a 100. Anno di prova 2012-13.

CULTIVAR	TESI	FDK	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. langsethiae</i>	FIESC	GFSC	altri <i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> tot.
			(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Varenne	Fp	46,00	5,33	2,67	4,00	0,67	0,00	4,67	0,00	48,00	65,34
"	Fg+Fc	40,67	14,00	21,33	2,00	0,00	0,67	3,33	0,67	31,33	73,33
"	Test	36,00	10,00	0,00	4,67	0,67	0,00	2,67	0,67	57,33	76,00
"	Proline	45,50	0,00	0,00	0,67	1,33	0,00	3,33	0,67	65,33	71,33
"	Fp+Proline	42,33	10,67	0,00	2,00	0,00	0,00	2,67	0,67	56,00	72,00
"	Fg+Fc+Proline	40,67	5,33	14,00	0,00	0,00	0,00	4,00	1,33	45,33	70,00
media cv		41,86	7,56	6,33	2,22	0,44	0,11	3,44	0,67	50,56	71,33
Quench	Fp	29,00	0,00	0,00	2,67	0,00	0,67	3,33	0,00	22,67	29,33
"	Fg+Fc	28,33	4,67	26,67	0,00	0,00	0,67	8,67	0,00	23,33	64,00
"	Test	23,67	0,00	0,00	0,67	0,00	1,33	4,00	0,00	48,67	54,67
"	Proline	23,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33	2,67	0,00	4,00	8,00
"	Fp+Proline	29,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,67	8,67	0,00	26,00	36,00
"	Fg+Fc+Proline	19,00	0,00	0,67	0,67	0,00	1,33	4,67	0,00	16,67	24,00
media cv		25,33	0,89	4,56	0,67	0,00	1,00	5,33	0,00	23,56	36,00
Wintmalt	Fp	30,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	2,67	0,67	16,00	20,00
"	Fg+Fc	30,67	0,67	7,33	0,00	0,67	0,00	1,33	0,00	12,00	22,00
"	Test	32,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	2,00	0,00	8,00	16,00
"	Proline	25,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	1,33	0,00	12,00	14,00
"	Fp+Proline	33,33	0,00	0,00	0,67	0,00	2,00	1,33	0,00	0,00	4,00
"	Fg+Fc+Proline	32,00	0,00	0,00	0,67	0,00	2,00	0,67	0,00	5,33	8,67
media cv		30,56	0,11	1,22	0,44	0,11	0,78	1,56	0,11	8,89	14,11

Tabella 2.10: Micotossine DON e T-2/HT-2 quantificate con tecnica ELISA su campioni di granella provenienti dalle tesi delle prove di campo, anno 2012-13

	DON		T-2/HT-2	
	2013	ppm		ppb
Varenne	Test	3,03	Test	431,51
	Proline	1,61	Proline	503,67
	Fg + Fc	3,82	Fp	251,68
	Fg + Fc + Proline	2,27	Fp + Proline	334,96
Quench	Test	0,20	Test	189,60
	Proline	n.q.	Proline	143,64
	Fg + Fc	0,48	Fp	189,11
	Fg + Fc + Proline	n.q.	Fp + Proline	211,16
Wintmalt	Test	n.q.	Test	129,89
	Proline	n.q.	Proline	160,66
	Fg + Fc	n.q.	Fp	50,36
	Fg + Fc + Proline	n.q.	Fp + Proline	107,17

Medie del contenuto di tricoteceni presenti nella granella delle parcelle delle tesi del primo anno di prova. DON=deossinivalenolo, T-2=tossina T-2, HT-2=tossina HT-2. Limite di rilevamento: DON=0,2 ppm, T-2+HT-2=25 ppb.

Secondo anno di prova: 2013-14

L'andamento delle condizioni climatiche dal 10 aprile al 19 giugno è riportato in Figura 2.14.

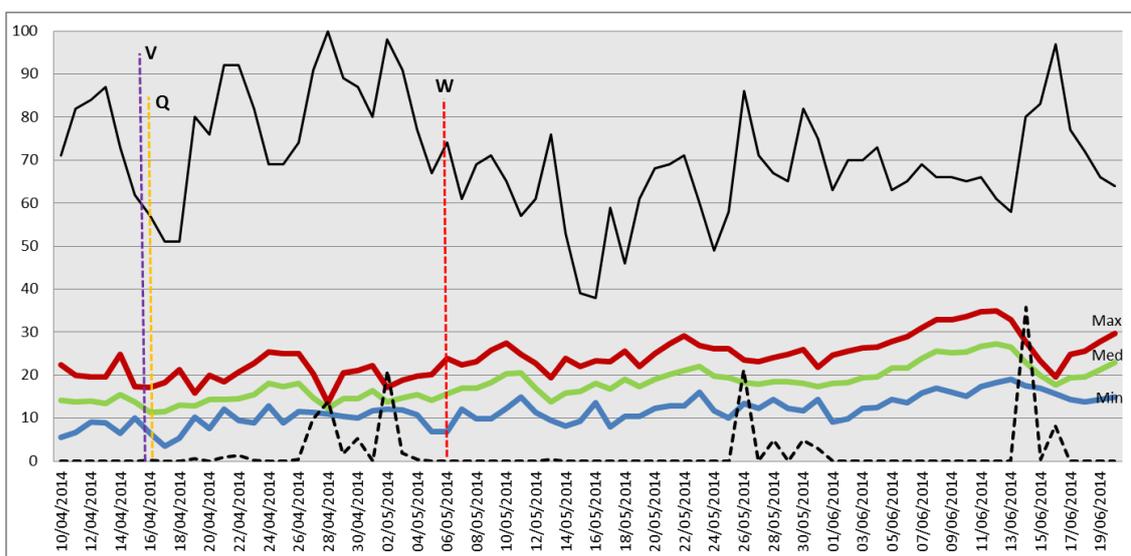


Figura 2.14: Condizioni climatiche dell'anno 2014 (T min., med. e max., precipitazioni in mm e umidità relativa) con indicazione delle date delle inoculazioni artificiali per ciascuna cultivar.

In nero (tratto continuo) è rappresenta la percentuale di umidità relativa nell'aria; in nero (tratto tratteggiato), le precipitazioni espresse in millimetri. Le linee in grassetto colorate sono le temperature massime, medie e minime. Le linee verticali rappresentano le date di applicazione dell'inoculazione artificiale nelle singole cultivar: viola per Varenne (V), gialla per Quench (Q) e rossa per Wintmalt (W).

Nel 2014 l'anticipo della stagione calda rispetto alla norma ed un aumento delle temperature nel momento della maturazione delle spighe, per la cv Wintmalt, più tardiva, inoculata 20 giorni dopo le altre, hanno reso possibile l'effettuazione di un solo rilievo di DI e DS. Nel complesso si è osservato quanto riportato di seguito.

Per quanto riguarda l'incidenza dei sintomi provocati da *F. graminearum* e *F. culmorum* (Tabelle 2.11, 2.12 e 2.13), al momento del I rilievo, si sono registrati valori molto bassi. Nella cv Quench sono state rilevate differenze statisticamente significative al II rilievo per le tesi Fg+Fc e Proline dove sono stati rilevati valori di incidenza rispettivamente di 12% e 0% (Tabella 2.12). Da un punto di vista statistico non sono state rilevate differenze al III rilievo tra i valori di DI in Varenne (Tabella 2.11). Per Quench il valore di DI della tesi Fg+Fc (58,7%) si differenzia significativamente da quello (16%) della tesi inoculata e trattata con il fungicida (Tabella 2.12). Per Wintmalt i valori nell'unico rilievo non risultano significativi (Tabella 2.13). FHB è stata rilevata in tutte le cv anche tesi Test indicando la presenza di inoculo naturale nel campo dove si è svolta la prova.

Per DS, in tutte le tesi sono stati rilevati valori bassi e le uniche differenze significative sono state osservate nella varietà Quench, al II rilievo in cui per Proline è stato calcolato un valore di 0% e nella tesi Fg+Fc di 6% (Tabella 2.12). Per Wintmalt i valori nell'unico rilievo non risultano significativi (Tabella 2.13).

Per *FHB index* si è osservata una significatività in Varenne solo al III rilievo tra Fg+Fc (3,1%) sia con Test (1%) sia con Proline (0,9%) (Tabella 2.11). In Quench al II rilievo è stato rilevato un valore di *FHB index* in Proline significativamente più basso di Fg+Fc e di Fg+Fc+Proline (rispettivamente 0,0%, 0,7% e 0,3%) ed al III rilievo significativamente più alto in Fg+Fc (3%) rispetto alle tesi trattate con Proline (Tabella 2.12). Per Wintmalt i valori nell'unico rilievo non risultano significativamente diversi fra loro (Tabella 2.13). Nelle figure di seguito riportate (Figura 2.15 e 2.16), si può notare un andamento della malattia nelle cv Varenne e Quench, tendenzialmente di tipo esponenziale, con una fase di latenza fra il I e II rilievo ed un rapido incremento dalla seconda alla terza settimana dall'inoculazione.

Per DI delle tesi inoculate con *F. poae* per la cv Quench (Tabella 2.16) si è rilevato una differenza significativa dopo 20 giorni l'inoculazione (III rilievo), tra Fp (46%) e le tesi trattata e inoculata con Proline (20%) e quella trattata solo con Proline (14,7%).

I dati di produzione non sono risultati significativamente diversi tra le tesi delle singole varietà (Tabella 2.17).

Nella Tabella 2.18 sono indicate le specie di *Fusarium* re-isolate dalla granella. Il numero totale di colonie di *Fusarium* isolate dalla granella è stato molto basso con valori di frequenza pari a 2,28 % nella cv Quench, 1,87% in Wintmalt e 1,61 % in Varenne. La specie di *Fusarium* mediamente più presente è stata *F. culmorum* (1,11 % nella cv Varenne, 1,22 % in Quench, 0,67 % in Wintmalt). *F. poae* è stato isolato con valori inferiori all'1%. In Tabella 2.18 è anche riportato il valore di FDK per ciascuna tesi e cultivar. In generale si notano valori costanti all'interno della stessa cultivar indipendentemente dalla tesi.

La micotossina DON è risultata assente in tutte le tesi delle tre cultivar testate, la micotossina T-2/HT-2 è risultata presente ma con valori bassi (Tabella 2.19).

Tabella 2.11: Incidenza (DI), severità di malattia (DS) e FHB *index* nelle tesi inoculate con un mix di *F. graminearum*, *F. culmorum* per la cultivar Varenne nell'anno 2014.

VARENNE									
TESI	DI			DS			FHB <i>index</i>		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	1,7	2,7	22,7	2,0	2,3	5,5	0,0	0,2	1,0 b
Proline	1,0	0,0	21,3	1,3	0,0	4,0	0,0	0,0	0,9 b
Fg + Fc	0,7	4,3	60,0	1,3	3,2	5,1	0,0	0,2	3,1 a
Fg + Fc + Proline	1,0	5,3	26,7	1,3	4,0	4,0	0,0	0,2	1,2 ab
p value	0,806	0,076	0,103	0,748	0,131	0,506	0,857	0,155	0,025

Tabella 2.12: Incidenza (DI), severità di malattia (DS) e FHB *index* nelle tesi inoculate con un mix di *F. graminearum*, *F. culmorum* per la cultivar Quench nell'anno 2014.

QUENCH									
TESI	DI			DS			FHB <i>index</i>		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	1,3	2,7 ab	46,7 ab	1,3	2,7 ab	5,5	0,0	0,1 bc	2,6 a
Proline	1,0	0,0 b	21,3 ab	0,7	0,0 b	4,0	0,0	0,0 c	0,9 b
Fg + Fc	3,3	12,0 a	58,7 a	2,1	6,0 a	5,1	0,1	0,7 a	3,0 a
Fg + Fc + Proline	1,3	4,7 a	16,0 b	1,3	4,0 ab	4,4	0,0	0,3 ab	0,7 b
p value	0,743	0,031	0,012	0,725	0,037	0,082	0,580	0,004	0,005

Tabella 2.13: Incidenza (DI), severità di malattia (DS) e FHB *index* nelle tesi inoculate con un mix di *F. graminearum*, *F. culmorum* per la cultivar Wintmalt nell'anno 2014.

WINTMALT			
TESI	DI	DS	FHB <i>index</i>
	I rilievo	I rilievo	I rilievo
Test	22,5	4,5	1,1
Proline	32,0	5,5	1,8
Fg + Fc	36,0	5,1	1,8
Fg + Fc + Proline	41,3	5,1	2,1
p value	0,152	0,686	0,212

Tabella 2.14: Incidenza (DI) di spighe infettate con *F. poae* nella cv. Varenne nell'anno 2014.

VARENNE			
TESI	DI		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	2,0	0,7	8,7
Proline	0,7	0,0	8,0
Fp	4,7	3,3	15,3
Fp + Proline	1,3	2,0	10,5
p value	0,709	0,084	0,071

Tabella 2.15: Incidenza (DI) di spighe infettate con *F. poae* nella cv. Quench nell'anno 2014.

QUENCH			
TESI	DI		
	I rilievo	II rilievo	III rilievo
Test	0,3	2,7	32,7 ab
Proline	1,7	0,0	14,7 a
Fp	2,5	8,7	46,0 b
Fp + Proline	1,7	0,7	20,0 a
p value	0,784	0,051	0,031

Tabella 2.16: Incidenza (DI) di spighe infettate con *F. poae* nella cv. Wintmalt nell'anno 2014

WINTMALT	
TESI	DI % I rilievo
Test	28,0
Proline	27,3
Fp	42,0
Fp + Proline	33,3
p value	0,214

cv. Varenne

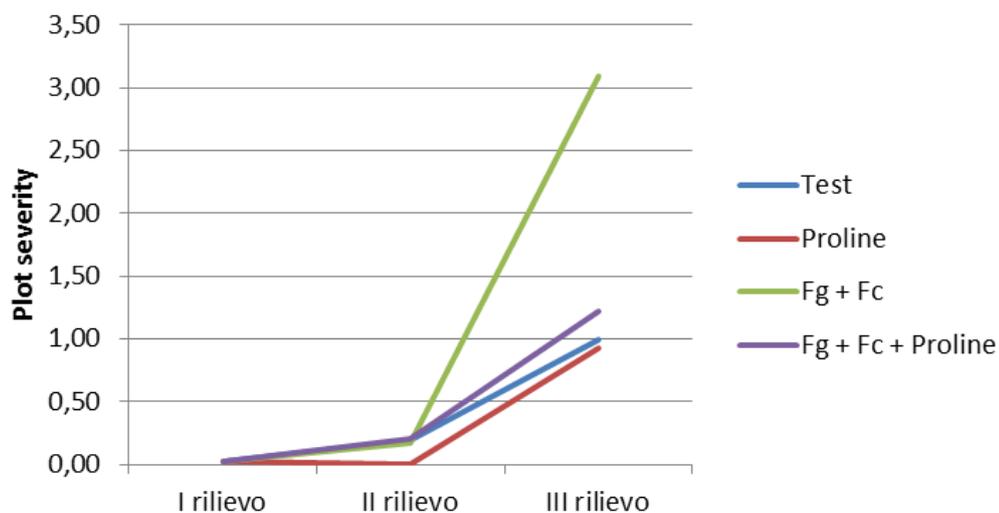


Figura 2.15: andamento di FHB *index* della cv Varenne nei tre rilievi effettuati nel 2014.

cv. Quench

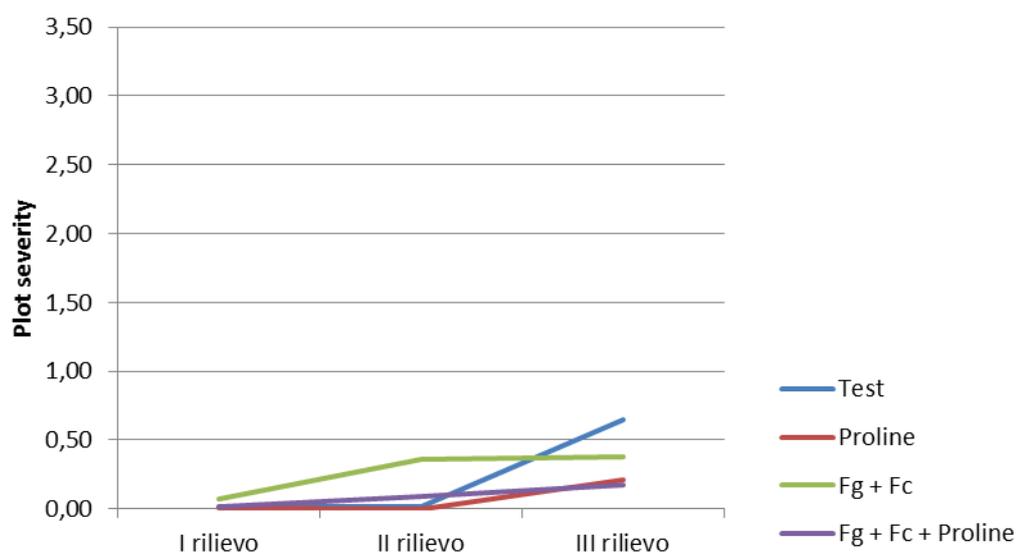


Figura 2.16: andamento di FHB *index* della cv Quench nei tre rilievi effettuati nel 2014.

Tabella 2.17: Dati di produzione della granella in campo, anno di prova 2013-14.

2014	Produzione (t/ha)*		
	Varenne	Quench	Wintmalt
Test	6,57	8,15	6,17
Proline	6,72	8,26	5,89
Fg + Fc	6,95	7,31	6,25
Fg + Fc + Proline	6,74	8,34	5,43
Fp	6,95	7,75	5,68
Fp + Proline	6,79	7,16	6,66

*Valori riferiti al 13 % di umidità relativa.

Tabella 2.18: *Fusarium* spp. re-isolate da granella. I dati corrispondono alle medie delle specie di *Fusarium* re-isolate ed espresse in valori percentuali rispetto a *Fusarium* spp. totali posti uguali a 100. Anno di prova 2013-14.

CULTIVAR	TESI	FDK	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. langsethiae</i>	FIESC	GFSC	altri <i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> tot.
			(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)
Varenne	Fp	6,33	0,33	2,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,67
"	Fg+Fc	6,33	1,67	3,67	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,67
"	Test	4,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
"	Proline	8,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33
"	Fp+Proline	6,67	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33
"	Fg+Fc+Proline	5,67	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67
media cv		6,28	0,33	1,11	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,61
Quench	Fp	14,67	0,00	1,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,67
"	Fg+Fc	17,00	4,00	4,67	0,67	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	9,67
"	Test	14,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,33
"	Proline	12,67	0,00	1,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33
"	Fp+Proline	13,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
"	Fg+Fc+Proline	14,67	0,33	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67
media cv		14,45	0,72	1,22	0,17	0,06	0,00	0,06	0,00	0,00	2,28
Wintmalt	Fp	11,67	0,00	1,67	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,67
"	Fg+Fc	11,00	1,00	1,33	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,67
"	Test	12,67	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67
"	Proline	9,00	0,33	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
"	Fp+Proline	11,33	0,00	0,67	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,67
"	Fg+Fc+Proline	13,67	0,33	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67
media cv		11,56	0,28	0,67	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,72

Tabella 2.19: Micotossine DON e T-2/HT-2 quantificate con tecnica ELISA in campioni di granella provenienti dalle tesi delle prove di campo, anno 2013-14.

2014		DON	T-2/HT-2	
		ppm	ppb	
Varenne	Test	n.q.	Test	53,14
	Proline	n.q.	Proline	47,48
	Fg + Fc	n.q.	Fp	51,33
	Fg + Fc + Proline	n.q.	Fp + Proline	35,32
Quench	Test	n.q.	Test	53,14
	Proline	n.q.	Proline	47,48
	Fg + Fc	n.q.	Fp	51,33
	Fg + Fc + Proline	n.q.	Fp + Proline	35,32
Wintmalt	Test	n.q.	Test	108,75
	Proline	n.q.	Proline	97,93
	Fg + Fc	n.q.	Fp	85,30
	Fg + Fc + Proline	n.q.	Fp + Proline	84,46

Medie del contenuto di tricoteceni presenti nella granella delle parcelle delle tesi del secondo anno di prova. DON=deossinivalenolo, T-2=tossina T-2, HT-2=tossina HT-2. Limite di rilevamento: DON=0,2 ppm, T-2+HT-2=25 ppb.

Di seguito sono riportate le tabelle con i dati di correlazione per le tesi Fg+Fc (Tabella 2.20), Fg+Fc+Proline (Tabella 2.21), Fp (Tabella 2.22) e Fp+Proline (Tabella 2.23) analizzate per le tre cultivar contemporaneamente nei due anni di prova. Nelle tesi inoculate con il mix *F. graminearum* e *F. culmorum* sono state confrontati tra di loro i valori di FHB *index*, dati produttivi (t/ha), cariossidi fusariate (FDK), presenza di *F. graminearum* (FG) e di *F. culmorum* (FC) e della micotossina DON. Le tesi inoculate con *F. poae* sono state confrontate con i valori di incidenza (DI), produzione (t/ha), FDK, presenza di *F. poae* nell'analisi micologica e micotossina T-2/HT-2.

Da questa elaborazione si evidenzia che c'è una correlazione positiva, relativamente alla tesi Fg+Fc+Proline tra FHB *index* e FDK ($r = 0,862$, $p=0,027$), tra FG e FC ($r=0,999$, $p=0,000$) e tra FC e DON ($r=0,999$, $p=0,000$) (Tabella 2.21).

Dal confronto fra i dati di due anni relativamente alla tesi Fp è risultata una correlazione tra la presenza di tossina T-2/HT-2 e la frequenza di *F. poae* re-isolati ($r=0,997$, $p=0,000$) (Tabella 2.22).

Tabella 2.20: Indice di correlazione di Pearson relativamente alla tesi Fg+Fc.

	FHB index	t/ha	FDK	Fg	Fc	DON
FHB index	1	-,012	,647	-,079	-,616	,255
t/ha	-,012	1	,380	-,407	-,152	,082
FDK	,647	,380	1	-,429	-,403	,808
Fg	-,079	-,407	-,429	1	-,254	-,201
Fc	-,616	-,152	-,403	-,254	1	-,272
DON	,255	,082	,808	-,201	-,272	1

L'eventuale correlazione è evidenziata con il simbolo asterisco.

* La correlazione è significativa con $p < 0,05$.

**La correlazione è significativa con $p < 0,01$

Tabella 2.21: Indice di correlazione Pearson relativamente alla tesi Fg+Fc+Proline.

	FHB index	t/ha	FDK	Fg	Fc	DON
FHB index	1	-,073	,862*	,343	,345	,355
t/ha	-,073	1	,050	-,117	-,114	-,086
FDK	,862*	,050	1	,730	,728	,741
Fg	,343	-,117	,730	1	,999**	,999**
Fc	,345	-,114	,728	,999**	1	,999**
DON	,355	-,086	,741	,999**	,999**	1

L'eventuale correlazione è evidenziata con il simbolo asterisco.

* La correlazione è significativa con $p < 0,05$.

**La correlazione è significativa con $p < 0,01$

Tabella 2.22: Indice di correlazione di Pearson relativamente alla tesi Fp.

	DI	t/ha	FDK	Fp	T-2/HT-2
DI	1	,201	,265	,464	,444
t/ha	,201	1	-,549	,470	,517
FDK	,265	-,549	1	-,522	-,568
Fp	,464	,470	-,522	1	,997**
T-2/HT-2	,444	,517	-,568	,997**	1

L'eventuale correlazione è evidenziata con il simbolo asterisco.

* La correlazione è significativa con $p < 0,05$.

**La correlazione è significativa con $p < 0,01$

Tabella 2.23: Indice di correlazione Pearson relativamente alla tesi Fp+Proline.

	DI	t/ha	FDK	Fp	T-2/HT-2
DI	1	,362	-,108	,537	,691
t/ha	,362	1	-,612	-,016	,600
FDK	-,108	-,612	1	-,444	-,706
Fp	,537	-,016	-,444	1	,789
T-2/HT-2	,691	,600	-,706	,789	1

L'eventuale correlazione è evidenziata con il simbolo asterisco.

* La correlazione è significativa con $p < 0,05$.

**La correlazione è significativa con $p < 0,01$.

DISCUSSIONE

In accordo con quanto riportato da vari Autori (Goswami & Kistler, 2004; Linkmeyer et al., 2015; Steffenson, 2003; Tekauz et al., 2000), le infezioni da *Fusarium* spp. in orzo non sempre sono chiaramente evidenti. Sia prima che a maturità, i semi di orzo assumono una colorazione brunastra difficile da diagnosticare con certezza, poiché decolorazioni simili possono essere causate da altri patogeni quali *Pyrenophora teres* e *Cochliobolus sativus* e l'aspetto traslucido determinato da saprofiti in campo quali *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp. (Tekauz et al., 2000). Dalle osservazioni effettuate sulle spighe è stato, inoltre, possibile confermare che varie parti della pianta possono essere infettate da *Fusarium*: le reste, il rachide, la rachilla, le glume e i tegumenti seminali, come indicato anche da Bushnell et al. (2003).

Nelle piante inoculate artificialmente i sintomi causati da *F. graminearum* e *F. culmorum* erano simili tra di loro e lievemente differenti da quelli osservati in frumento, dove la malattia si manifesta tipicamente con la morte prematura e l'imbianchimento delle spighe (Goswami & Kistler, 2004; Parry et al., 1995). In orzo i sintomi della malattia sono caratterizzati più frequentemente da imbrunimenti, per lo più alla base della gluma. Questi imbrunimenti possono colpire aree più o meno diffuse della spiga e si sviluppano principalmente nella parte centrale. In base alla sintomatologia determinata da *F. graminearum* e *F. culmorum* è stata realizzata una scala di valutazione dei sintomi su spighe di orzo distico (Giannini et al., 2013). Nei programmi di breeding, in genere sono utilizzate scale arbitrarie di valutazione che assegnano punteggi da 0-10 (Tekauz et al., 2000) e l'utilizzo di un'unica scala faciliterebbe lo scambio di risultati fra vari gruppi di ricerca.

Le infezioni determinate da *F. poae* rimangono localizzate su una singola spigetta, come generalmente avviene in frumento (Alberti & Pancaldi, 2011; Doohan et al., 1998;

Vogelgsang et al., 2008), per questo non è stato possibile mettere a punto una scala di valutazione, ma è stato possibile considerarne solo l'incidenza. A differenza del frumento, la sintomatologia si manifesta oltre che con la caratteristica macchia ad occhio di pavone anche con piccole macchie marroni in genere localmente circoscritte a una o poche glume.

Per *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides* non sono stati osservati sintomi specifici quindi non è stato possibile farne una valutazione specifica.

Nei due anni di prova di campo, si sono verificati andamenti stagionali diversi. Nel 2013 la temperatura e l'umidità relativa, che si sono verificate subito dopo la fase dell'inoculazione, sono state particolarmente favorevoli allo sviluppo dell'infezione soprattutto da parte di *F. graminearum* e *F. culmorum* per le cv Varenne e Quench. La cv Wintmalt è stata la più tardiva ad emettere le antere, per questo è stata inoculata per ultima (22/05/2013) e nella settimana seguente l'inoculazione la temperatura è diminuita rallentando lo sviluppo della malattia (Figura 2.10). Nel 2014, in cui le temperature medie registrate la settimana successiva l'inoculazione delle cv Varenne e Quench sono state al di sotto la media stagionale con valori minimi che oscillavano attorno ai 8°C con minime fino a 4°C e che quindi, a differenza dell'anno precedente, hanno ritardato l'espressione della malattia. Lo sfasamento della data di inoculazione delle tre cultivar ha determinato tempi diversi di rilievo che potrebbero essere la ragione dei dati diversi relativi alle cultivar saggiate.

È noto che *F. graminearum*, l'agente più virulento della FHB nei cereali, predilige climi caldi e umidi che caratterizzano il sud dell'Europa, con un *optimum* di temperatura tra i 28-30°C. *F. poae*, specie meno virulenta tra quelle saggiate nelle prove di campo, è favorito da temperature simili a quelle di *F. graminearum*, privilegiando però ambienti più secchi. *F. culmorum*, specie in genere meno virulenta rispetto a *F. graminearum*, è adattato a climi di tipo continentali, con temperature più basse (tra 19 e 27°C) (Xu & Nicholson, 2009). La temperatura influenza lo sviluppo delle infezioni da FHB, ma non è il fattore determinante, è bene ricordare che contribuiscono al successo dell'evento infettivo anche il livello di precipitazioni oltre la norma e soprattutto l'umidità elevata al momento dell'antesi (Stack, 2000).

Per quanto riguarda la severità della malattia, i dati ottenuti da Yoshida et al. (2008) su piante di orzo inoculate in serra con *F. graminearum*, dove è stata evidenziata una severità che variava da 3,3 a 13%, sono apparsi in linea con i dati del I anno di prove di campo in cui le condizioni ambientali sono state più favorevoli alla proliferazione di *Fusarium* spp. Autori hanno notato che in campo, valori di incidenza di FHB in orzo tendevano ad essere più alti che in frumento, mentre la severità era in genere più bassa (Gilbert et al., 1999; McCallum et

al., 1999). I dati relativi ad *FHB index* in entrambi gli anni di prova evidenziano che l'infezione è contenuta nella prima settimana dopo l'inoculazione, per poi aumentare rapidamente all'ultimo rilievo.

Per quanto riguarda l'incidenza di *F. poae*, si sottolinea che nel 2013 la tesi Fp+Proline non è risultata statisticamente diversa dalla tesi Fp. Questo potrebbe indicare che, per tale patogeno, il trattamento fungicida non è stato sufficientemente efficiente nel contrastare la malattia.

L'analisi micologica effettuata sulle cariossidi provenienti dalle parcelle sperimentali delle diverse tesi ha evidenziato una maggiore presenza di *F. graminearum* ed *F. culmorum* nel primo anno di prova. *F. graminearum* ed *F. culmorum* risultano le specie più presenti anche in uno studio condotto su cultivar di orzo naturalmente infette nella regione tedesca bavarese da Linkmeyer et al. (2015). Indagini recenti svolte in Europa su orzo hanno mostrato che in realtà il complesso FHB è molto più ampio di quanto in precedenza considerato, infatti include oltre a *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. poae*, altri patogeni quali *F. langsethiae*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* e *Microdochium nivale* e *M. majus* (Nielsen et al., 2011; Nielsen et al. 2013).

Steffenson (2003) sostiene che, nonostante la fusariosi della spiga sia senza dubbio una delle più devastanti e insidiose malattie dell'orzo, in certi casi questa malattia può non provocare ingenti perdite dei raccolti. Tekauz et al. (2000) affermano che le cariossidi di orzo infette sono leggermente più piccole e leggere delle sane, ma sono ugualmente raccolte dalle macchine trebbiatrici, contrariamente a quanto avviene nel frumento dove le cariossidi infette sono molto più leggere e vengono perse durante la fase di raccolta. Quindi anche bassi livelli di infezione possono provocare serie conseguenze per l'industria maltaria e per l'alimentazione umana e zootecnica poiché le cariossidi infette e presumibilmente contaminate da micotossine come DON, T-2 e HT-2 vengono raccolte ed utilizzate.

I dati hanno dimostrato che la concentrazione di DON è risultata correlata nei due anni di prova alla frequenza di *F. graminearum* nella granella. In particolare si evidenzia che, nel primo anno di prova, in cui maggiore è stata la presenza della malattia, il valore della concentrazione di DON nella cv Varenne è risultato al di sopra del limite massimo ammesso di 1.250 ppm indicato nel Regolamento CE 1881/2006. La correlazione tra la concentrazione di DON e la frequenza di *F. graminearum* risulta molto interessante visto che i parametri fondamentali per la valutazione di FHB in orzo, come riportato da Tekauz et al. (2000), risultano *FHB index*, FDK, % di *F. graminearum* nella granella e livelli di DON.

Importante è risultata anche la contaminazione da micotossina T-2 e HT-2 presente con alti livelli in tutte le cultivar testate ed in particolar modo in Varenne. Questi valori sono risultati

correlati con la presenza di *F. poae* ritrovato nella granella. Nelle prove del 2013 sono state isolate molte altre specie appartenenti al genere *Fusarium* tra cui *F. langsethiae*, noto produttore di tricoteceni di tipo A. Sempre nel il primo anno, i valori di T-2/HT-2, nelle cv Varenne e Quench sono stati superiori a quelli indicati dalle raccomandazioni divulgate dalla Comunità Europea (nella granella di orzo sono previsti tenori massimi di 200 ppb). Le analisi delle micotossine, in particolare DON, sono comunque da considerarsi di particolare importanza e sono consigliabili come analisi preventiva per evitare il rischio di *gushing* nella birra. Tale effetto negativo sembra non essere provocato direttamente dalle micotossine, ma da particolari proteine chiamate idrofobine (Garbe et al., 2007; Sarlin et al., 2005; Sarlin et al., 2007; Schwarz et al., 1995; Vaag et al., 1993) ed in bibliografia ci sono pareri contrastanti sulla relazione tra le micotossine e il rischio di *gushing*: Sarlin et al. (2005) infatti non ha rilevato nessuna correlazione, mentre Schwarz et al. (1995) hanno osservato che il 55-60% del malto contaminato da DON, con concentrazioni medie 740 ppm induce il fenomeno del *gushing*.

I dati presentati sono stati ottenuti in due diverse annate agrarie con andamenti climatici troppo differenti per poter comprendere la complessa eziologia della malattia di FHB in orzo, che si traduce in un'articolata gestione della malattia e delle micotossine prodotte dagli agenti causali. Non resta che continuare ad investigare su quali siano i meccanismi che comportano l'accumulo di micotossine e come le micotossine interagiscano con le piante ospiti, gli altri microrganismi ed i fattori ambientali. Comprendere la complessa relazione di tutti questi fattori è fondamentale per determinare l'effettiva dimensione e la rilevanza di eventuali epidemie da FHB in orzo ed eventualmente sviluppare efficaci strategie di contenimento della malattia.

Ulteriori approfondimenti dovranno indagare sulla tempistica d'infezione e l'accumulo di micotossine in base alla diversa morfologia florale delle varietà distiche (prevalentemente cleistogame) rispetto alle varietà polistiche (prevalentemente casmogame). Per le varietà distiche la fase fenologica di maggior suscettibilità è a fine fioritura (tra il settimo e il decimo giorno dall'antesi), invece, per le varietà polistiche è nelle prime fasi dell'antesi (Yoshida et al., 2007).

CAPITOLO III

COLONIZZAZIONE DI PIANTE DI ORZO DA PARTE DI *F. GRAMINEARUM*, *F. PSEUDOGRAMINEARUM* E *F. CULMORUM* IN AMBIENTE CONTROLLATO E TRASLOCAZIONE DELLA MICOTOSSINA DON

RIASSUNTO

Questo studio è stato svolto in ambiente controllato su piante di orzo, cv Tunika, per valutare la capacità di singoli ceppi di *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* e *F. culmorum*, inoculati al colletto delle piante, di colonizzare il culmo e la spiga. A maturazione fisiologica, è stato condotto un rilievo visivo per determinare la presenza/assenza di necrosi al colletto. Successivamente i culmi sono stati suddivisi in segmenti su tali porzioni sono state effettuate analisi quantitative assolute del DNA fungino (Real Time PCR), quantificazione della micotossina DON (test ELISA) e osservazioni al SEM.

Dai rilievi fitopatometrici e dall'analisi molecolare si è osservato che le specie di *F. culmorum* e *F. graminearum* sono state in grado di colonizzare le piante di orzo fino alla spiga, mentre *F. pseudograminearum* è rimasto localizzato nella parte basale delle piante. La micotossina DON è risultata presente in tutte le porzioni delle piante dalla base alla spiga per tutte e tre le specie di *Fusarium*.

INTRODUZIONE

Al genere *Fusarium* appartengono specie fitopatogene che nei cereali, a seconda della parte della pianta infettata, provocano fusariosi del piede o fusariosi della spiga. Talvolta le due malattie possono coesistere, è stato infatti riscontrato che in zone con un'alta incidenza di FHB, può essere presente anche la fusariosi del piede (Clement & Parry, 1998; Windels et al., 2000). Le principali specie coinvolte sono: *Fusarium graminearum* (teleomorfo: *Gibberella zae* Schwein), *F. pseudograminearum* (teleomorfo: *Gibberella coronicola*), *F. culmorum*, *F. avenaceum* (teleomorfo: *G. avenacea* R.J. Cook), *F. sporotrichioides* e *F. poae* (Parry et al., 1995). La diffusione delle specie di *Fusarium* durante l'intero periodo del ciclo colturale è favorita dalla combinazione di fattori di tipo climatico (temperatura, precipitazioni, umidità relativa), agronomico (densità di semina, lavorazioni del terreno non idonee, eccessive o scarse concimazioni) e genetico (susceptibilità varietale).

F. culmorum, *F. graminearum* e *F. pseudograminearum* sono i più importanti patogeni dei cereali e sono i principali agenti causali della fusariosi della radice (FRR), del culmo (FCR) (Paulitz et al., 2002; Wang et al., 2006) e della spiga nel mondo (Goswami & Kistler, 2004; Miedaner et al., 2008; Obanor et al., 2013; Parry et al., 1995). Nel complesso le specie del genere *Fusarium* rappresentano uno dei gruppi di patogeni più dannosi per le produzioni agricole sia prima della raccolta, sia dopo la raccolta, durante le fasi di stoccaggio, in quanto molte specie appartenenti a questo genere sono produttrici di micotossine termoresistenti.

Tutti questi funghi sono in grado di produrre tricotecene deossinivalenolo (DON), che è ritenuta essere la micotossina predominante nei cereali infetti da *Fusarium* (D'mello et al., 1999). La Commissione Europea fin dal 2006 ha stabilito per questa tossina dei limiti di accettabilità di contaminazione della granella (Commission, 2006). La granella contaminata da DON non solo mette a rischio la salute dei consumatori, ma danneggia da un punto di vista economico gli agricoltori quando la contaminazione risulta essere piuttosto consistente (Winter et al., 2013). È interesse generale cercare di contenere i livelli di contaminazione da DON nella granella.

Sono diversi i lavori che si occupano di *F. culmorum* come un patogeno ad *habitat* terricolo in grado di indurre FCR nei cereali. In situazioni di colture cerealicole ripetute, il fungo, presente nei residui della coltura precedente, colonizza dapprima la parte basale del culmo penetrando attraverso la guaina fogliare fino a raggiungere il *lumen* e successivamente il tessuto del parenchima a livello del primo nodo sia per via intercellulare che intracellulare (Clement & Parry, 1998).

I tricoteceni sono sintetizzati dal fungo durante il processo di infezione e colonizzazione della pianta (Beccari et al. 2011). Covarelli et al. (2012) hanno dimostrato che in frumento tenero la traslocazione di DON segue l'infezione di *F. culmorum* dalla base del culmo fino alla parte superiore della pianta, concludendo che, questo sistema di trasporto della micotossina, potrebbe spiegare la contaminazione della granella.

Rispetto al frumento, l'orzo è ritenuta una coltura più rustica, per le minore esigenze nutrizionali, ma anche per la minore capacità di allettamento (Baldoni & Giardini, 1989). Ciò non significa che l'orzo sia esente dalla fusariosi del piede.

Fusarium culmorum

Fusarium culmorum (W.G. Smith) Saccardo (teleomorfo sconosciuto) presenta una grande variabilità genetica a seconda delle aree geografiche, facendo supporre che vi sia un elevato flusso genico su una struttura di popolazione non clonale (Miedaner et al., 2001; Mishra et al., 2003; Toth et al., 2004). Studi di popolazione condotti nell'ambito di aree geografiche ristrette, hanno riportato un'ampia variabilità genetica, mentre differenze relativamente modeste sono state osservate tra le popolazioni ottenute da diverse regioni climatiche (Gargouri et al., 2003; Nicholson et al., 1993). Nonostante questa variabilità, lo stadio teleomorfico di questa specie è ancora sconosciuto (Kerényi et al., 2004; Mishra et al., 2003; Obanor et al., 2010; Toth et al., 2004).

Morfologicamente *F. culmorum* presenta macroconidi con 3-5 setti, dall'aspetto tozzo e con cellula apicale generalmente smussata; la cellula basale ha un piede appena accennato, più marcato in alcuni isolati. I microconidi sono assenti. I conidiofori sono mono-fialidi. *F. culmorum* produce abbondanti spore di resistenza dette clamidospore (singole, a catena, in gruppo sulle ife o derivate dai macroconidi), che presentano parete ispessita e sono ricche di sostanze di riserva. Le clamidospore hanno la capacità di sopravvivere in condizioni ambientali avverse e rimangono quiescenti per lunghi periodi in attesa di condizioni favorevoli (Balmas et al., 2000). Le colonie di *F. culmorum* su terreno agarizzato (PDA) presentano una colorazione rosso carminio (Figura 3.1) (Balmas et al., 2000).

I meccanismi di penetrazione e il processo di infezione di *F. culmorum* sono diversi a seconda dell'organo della pianta ospite. Recenti analisi condotte con il microscopio confocale a scansione laser sulle radici di piante di frumento infette hanno rivelato un iniziale percorso di tipo apoplastico intercellulare delle ife tra le cellule dell'epidermide e quelle della guaina, seguito da un percorso simplastico intracellulare con completa colonizzazione del tessuto della radice. Tuttavia il fungo non è in grado di penetrare nell'endoderma e nello stele della radice (Beccari et al., 2011). Analisi effettuate sul culmo hanno messo in evidenza che *F. culmorum* penetra nella pianta anche attraverso gli stomi delle guaine fogliari che avvolgono la base del culmo così come già osservato nel coleoptile da Malalasekera et al. (1973). Secondo Clement e Parry (1998) l'infezione non si estende oltre i primi due internodi in quanto *F. culmorum* non è un patogeno sistemico.

F. culmorum è spesso presente nei nostri ambienti e si sviluppa maggiormente in climi di tipo continentale, con temperature tra 18,9 e 26,5°C (Xu & Nicholson, 2009), anche se si adatta a temperatura più elevate (Strunnikova et al., 2000).



Figura 3.1: Colonia di *F. culmorum* (F820) su PDA e foto di macroconidi tratta da Pancaldi et al., 2010.

Fusarium graminearum

Fusarium graminearum Schwabe è considerato il patogeno predominante nella fusariosi della spiga dei cereali (Xu & Nicholson, 2009). Il teleomorfo associato è *Gibberella zeae* Schwein (Petch). Per diversi anni *F. graminearum* è stato suddiviso in due *taxa*: *F. graminearum* Gruppo 1 e *F. graminearum* Gruppo 2 (Burgess et al., 1975). Morfologicamente i due gruppi erano indistinguibili, ma vi era una differenza nella ecologia e nel processo di patogenesi. Successivamente Aoki e O'Donnell (1999) hanno descritto la popolazione del Gruppo 1 come appartenente alla specie *F. pseudograminearum*, mentre il Gruppo 2 ha conservato il nome originale *F. graminearum* associato con il teleomorfo *Gibberella zeae*.

Con l'analisi GCPSR (Genealogical Phylogenetic Species Recognition) si è formalmente divisa la specie *F. graminearum* in un complesso, definito *F. graminearum* complex, costituito da 15 linee filogeneticamente distinte (Sarver et al., 2011). La specie *F. graminearum sensu stricto*, associata con la fusariosi della spiga negli USA, in Europa ed in Canada, è inserita nella linea 7. I nomi associati alle restanti linee sono: *F. austroamericanum* (linea 1), *F. meridionale* (linea 2), *F. boothii* (linea 3), *F. mesoamericanum* (linea 4), *F. acaciae-mearnsii* (linea 5), *F. asiaticum* (linea 6), *F. cortaderiae* (linea 8), *F. brasiliicum* (linea 9), *F. ussurianum* (linea 10), *F. gerlachii* (linea 11), *F. nepalense* (linea 12), *F. louisianense* (linea 13), *F. vorosii* (linea 14) e *F. aethiopicum* (linea 15). Nel complesso queste linee sono state suddivise in base alla loro distribuzione geografica e ai diversi chemiotipi (Carter et al., 2002; Qu et al., 2008; Sarver et al., 2011). In futuro eventuali incroci tra le varie linee potrebbero ridurre il numero, anche se fattori legati all'ambiente e all'incompatibilità sessuale potrebbero impedirlo. Ad esempio è stato visto che *F. graminearum* e *F. asiaticum*, presenti in molte regioni in Cina e Giappone, in prove di laboratorio erano in grado di incrociarsi, dando origine ad un ibrido, anche se in natura non è ancora stata trovata alcuna prova di ibridazione tra le due linee (Bowden & Leslie, 1999; Qu et al., 2008; Suga et al., 2008).

A livello morfologico, i macroconidi di *F. graminearum* hanno generalmente 5-6 setti e presentano una parete ventrale praticamente dritta, mentre la parete dorsale è leggermente arcuata. La cellula basale presenta un piede ben formato. La cellula apicale è assottigliata e leggermente a becco. Sono assenti i microconidi ed i conidiofori sono mono-fialidi. Le clamidospore si presentano singole, in gruppo a catena, come trasformazione delle cellule dei macroconidi. Le colonie presentano una colorazione rosso carminio su PDA (Figura 3.2); su terreno CLA (Carnation Leaf Agar), *F. graminearum* produce periteci di *Gibberella zeae* (Balmas et al., 2000).



Figura 3.2: Colonia di *F. graminearum* su PDA (F913) e foto di macroconidi tratta da Pancaldi et al., 2010.

Fusarium pseudograminearum

Dal sequenziamento del genoma di *F. pseudograminearum* Aoki & O'Donnell (teleomorfo *Gibberella coronicola*), in uno studio condotto da Gardiner et al. (2012), è emerso che tra *F. pseudograminearum* e *F. graminearum* vi è un'omologia di sequenza del 94% e che le regioni dove le sequenze differiscono risiedono all'estremità dei cromosomi, in particolare del cromosoma 1 (Cuomo et al., 2007). Inoltre, nel genoma di *F. pseudograminearum* è possibile ritrovare delle omologie di sequenza con regioni provenienti da genomi batterici che codificano per delle ammino-transferasi e che con molta probabilità queste regioni sono state acquisite con eventi di trasferimento orizzontale. Si ritiene possibile che i geni contenuti in queste regioni siano responsabili dei diversi fenotipi che distinguono *F. pseudograminearum* da *F. graminearum*, come la propensione a causare fusariosi del piede rispetto alla fusariosi della spiga ed il suo adattamento ad *habitat* e nicchie ecologiche più o meno ampie (Gardiner et al., 2012). Da un punto di vista morfologico i macroconidi sono dritti o leggermente ricurvi, la cellula apicale è curva e la basale forma il piede; sono costituiti da 1 a 11 setti, ma generalmente ne hanno 5-6. I microconidi sono assenti, mentre le clamidospore sono abbondanti, anche se prive di valore distintivo. Su terreno PDA presentano un micelio che varia tra il rosso, il bianco e il giallo (Figura 3.3). Nell'agar si possono formare dei pigmenti rossi (Leslie & Summerell, 2006).



Figura 3.3: Colonia di *F. pseudograminearum* (F1140) su PDA e foto di macroconidi tratta da Leslie e Summerell, 2006.

MATERIALI E METODI

Coltivazione di piante di orzo

Piante di orzo cv Tunika sono state coltivate in serra. Si tratta di una cultivar di orzo distico impiegata sia nell'industria maltaria, sia nell'alimentazione zootecnica. Tunika è considerata una varietà ad attitudine prevalentemente primaverile per cui per indurre la fioritura non è necessario sottoporre i germinelli ad alcun trattamento di vernalizzazione, tuttavia per agevolare la spigatura, è stato attuato un blando protocollo di vernalizzazione.

I semi di orzo, sono stati prima disinfettati in superficie mediante immersione in ipoclorito di sodio al 2% di sodio attivo per 5 minuti, quindi risciacquati in acqua sterile. I semi sono stati successivamente posti in contenitori sterili e lasciati germogliare per 4 giorni a 25°C al buio. Una volta ottenuti i germinelli, questi sono stati trasferiti a 4°C per 4 giorni, sempre al buio. Trascorso tale periodo, le giovani plantule sono state lasciate acclimatare in serra per 48 ore prima di essere trasferite nei vasetti contenenti un mix di terra, sabbia, torba e agrivermiculite (nel rapporto 1:1:1:1 v/v).

Per l'intera durata della prova di serra, le condizioni ambientali sono state mantenute alla temperatura di 24±2°C di giorno e 18±2°C di notte, umidità relativa del 70% e 14 ore di luce ad intensità di 30.000 lux.

Allo stadio di prima foglia vera (circa 3 giorni dopo il trapianto), è stato applicato alla base delle plantule un collarino di PVC trasparente di 3 cm di altezza, opportunamente tagliato longitudinalmente e posizionato in maniera verticale rispetto al culmo. Il collarino aveva lo scopo di evitare la dispersione dell'inoculo, garantendo il contatto del fungo patogeno con la parte basale delle giovani piante di orzo per un periodo di tempo prolungato Figura 3.4.

Preparazione dell'inoculo

Le specie di *Fusarium* utilizzate sono quelle considerate come principali responsabili della FCR (Beccari et al., 2011; Bottalico & Perrone, 2002; Parry et al., 1995). Sono stati utilizzati i seguenti ceppi: *F. graminearum* (ceppo F913), *F. culmorum* (ceppo F820), e *F. pseudograminearum* (ceppo F1140, CS427 gentilmente fornito dal Prof. D. Gardiner, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation CSIRO, Australia). I ceppi sono conservati nella collezione del laboratorio di Micologia Fitopatologica del DipSA dell'Università di Bologna e sono stati già caratterizzati per patogenicità e presenza del gene per la produzione di DON.

È stata eseguita la stessa procedura di preparazione dell'inoculo già illustrata nel capitolo 2.

Inoculazione

L'inoculazione è stata fatta quando le piante di orzo si trovavano allo stadio di seconda foglia vera (BBCH12).

Per ciascuna specie l'inoculo era costituito da V8 gel (10 g di Bacto Agar, 100 ml V8, 400 ml di acqua sterile) addizionato con la sospensione macroconidica e presentava una concentrazione finale di 1×10^6 macroconidi/ml. Per ogni pianta sono stati inoculati 2 ml, eccetto per la tesi testimone in cui V8 gel non conteneva conidi. Il volume di inoculo contenibile nel collarino era di 2 ml.

La prova è stata organizzata seguendo il disegno del blocco randomizzato, con tre ripetizioni per ciascuna tesi. Il numero totale di piante per tesi erano pari a 48.

	<p>Inoculazione piante di piante di orzo allo stadio di seconda foglia vera. L'inoculo vie applicato all'interno del collarino in PVC.</p>
	<p>Piante inoculate con V8 agar e conidi di <i>Fusarium</i>.</p>
	<p>Immagine di piante randomizzate inoculate al colletto.</p>

Figura 3.4: Fase di inoculazione piante di orzo a livello del colletto.

Le piante e sono state suddivise secondo le seguenti tesi:

- a) Testimone (Test)
- b) Inoculate con *F. graminearum* (ceppo F913) (Fg)
- c) Inoculate con *F. culmorum* (ceppo F820) (Fc)
- d) Inoculate con *F. pseudograminearum* (ceppo F1140) (Fps)

Rilievo fitopatometrico

Il rilievo è stato effettuato su tutte le piante di orzo allo stadio di BBCH89. Le piante sono state estratte dal terreno di coltivazione, è stato quindi rilevato il numero di culmi totali, il numero di culmi necrotici, il segmento del culmo raggiunto dalla necrosi.

Successivamente ogni culmo è stato suddiviso in quattro segmenti di cui i primi tre lunghi 5 cm ed il quarto rappresentato dalla spiga (Figura 3.5 e 3.6):

I segmento: colletto e primo nodo compreso;

II segmento: secondo nodo;

III segmento: ultimo nodo prima della spiga, corrispondente alla foglia a bandiera;

IV segmento: spiga intera.

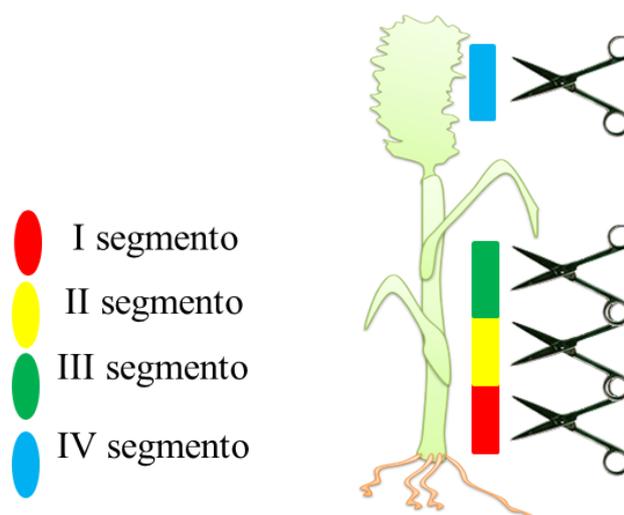


Figura 3.5: Rappresentazione della suddivisione in segmenti delle piante di orzo.

Le porzioni delle piante sono state poste in stufa a 45°C per un giorno. Quindi sono state sminuzzate con un blender disinfettato ad ogni passaggio con alcol, e successivamente con l'ausilio di un pestello unitamente a quarzo (0,3 g per ogni campione) e azoto liquido, in modo da ottenere uno sfarinato quanto più fine possibile. Negli sfarinati è stata effettuata la

quantificazione del DNA e della micotossina DON. Inoltre Per ogni tesi è stata verificata la presenza dei patogeni mediante isolamento di porzioni di pianta su substrato agarizzato (PDA).



Figura 3.6: Rilievo fitopatometrico e taglio dei segmenti.

Estrazione del DNA

Gli sfarinati, ottenuti dalla macinazione dei diversi segmenti di pianta, sono stati pesati e messi in sacchetti di plastica per l'estrazione del DNA. I sacchetti sono stati immersi in azoto liquido e, sotto cappa sterile, si è proceduto all'estrazione del DNA fungino seguendo la metodologia adottata nel protocollo proposto da Brandfass e Karlovsky (2008) lievemente modificata. Questo protocollo si basa sull'utilizzo del detergente CTAB (bromuro di esadeciltrimetilammonio), che in presenza di alte temperature ed elevate concentrazioni saline si lega agli acidi nucleici formando un complesso stabile e solubile in acqua.

Il tampone di estrazione (Grinding Buffer) è stato preparato secondo la seguente composizione:

- 2% CTAB
- 100 mM Tris-HCl, pH 8
- 20 mM EDTA
- 1,4 M NaCl

e successivamente sterilizzato in autoclave.

Il procedimento di estrazione è stato così eseguito:

1) Ad ogni sacchetto contenente 1g di sfarinato sono stati aggiunti 10 ml di CTAB, precedentemente addizionato con Na solfito (10%) e PVP-30 (20%). Ogni campione è stato poi accuratamente frantumato, così da ottenere un composto fluido ed omogeneo che è stato trasferito in Eppendorf da 2 ml.

- 2) Sono stati aggiunti ai campioni 0,2% v/v di EtSH (β -mercaptoetanololo) ed incubati a 75°C per 15 minuti.
- 3) Sono stati aggiunti 0,2 mg/ml di proteinasi K ed incubati per un'ora a 42°C.
- 4) I campioni sono poi stati centrifugati a 14.000 rpm per 10 minuti; poi, 850 μ l di surnatante sono stati trasferiti in una nuova Eppendorf da 2 ml.
- 5) Un primo passaggio di purificazione del DNA è stato effettuato aggiungendo 850 μ l di fenol-cloroformio-IAA. Le Eppendorf sono state capovolte per 3-4 volte e centrifugate nuovamente a 14.000 rpm per 10 minuti.
- 6) Il secondo passaggio di purificazione è stato effettuato prelevando 700 μ l del surnatante e trasferendolo in una nuova Eppendorf da 2 ml, quindi sono stati aggiunti 700 μ l di cloroformio-IAA. I tubi sono stati capovolti per 3-4 volte, quindi centrifugati a 14.000 rpm per 10 minuti.
- 7) La precipitazione è stata ottenuta prelevando 625 μ l di surnatante, trasferito in nuova Eppendorf da 1,5 ml, a questi sono stati aggiunti 500 μ l di isopropanolo e 250 μ l di NaCl. I campioni sono poi stati vortexati per 1 h a 20°C.
- 8) È stata ripetuta un'altra centrifuga a 14.000 rpm per 20 minuti, al termine della quale è stato eliminato l'isopropanolo dal pellet.
- 9) Il pellet è stato lavato con 500 μ l di EtOH 70%, e centrifugato per 10 minuti a 14.000 rpm. Il surnatante è stato poi eliminato dal pellet. Questo passaggio di lavaggio del DNA è stato ripetuto due volte.
- 10) Il pellet è poi stato asciugato mettendo i tubi aperti in una campana sotto-vuoto per circa 5 minuti.
- 11) Infine il DNA è stato risospeso in 50 μ l di acqua ultrapura sterile RNAsi free, e posto a -20°C sino al momento dell'utilizzo.

Quantificazione assoluta del DNA tramite Real Time PCR

La valutazione dell'entità dell'infezione delle piante di orzo è stata effettuata quantificando il DNA fungino estratto dai segmenti con un metodo indiretto. Tale metodo si basa sull'uso della tecnologia per analisi molecolare Real Time PCR AbiPrism 7000 (AppliedBiosystem), 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.

La miscela di amplificazione è stata preparata con GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), in un volume finale di 25 µl con: primer ad una concentrazione 0,3 nM, FluoroforoRox ed 5µl di DNA diluito 1:50 per ciascun campione. I campioni sono stati analizzati in doppio.

I loci di DNA specie-specifici sono stati amplificati dai primer:

F. culmorum: C51ENDF F (5'-AACTGAATTGATCGCAAGC-3')
 C51ENDF R (5'-CCCTTCTTACGCCAATCTC-3')
 (Covarelli L. et al., 2012)

F. graminearum: Fg16N F (5'-CTTTGACATCTGTTCAACCCA-3')
 Fg16N R (5'-ACAGATGACAAGATTCAGGCACA-3')
 (Nicholson P. et al., 1998)

F. pseudograminearum: Fptri3e F (5'-CAAGTTTGATCCAGGGTAATCC-3')
 Fptri3e R (5'-GCTGTTTCTCTTAGTCTTCCTCA-3')
 (Gardiner e Covarelli, comunicazione personale);

Il profilo termico è stato ottimizzato come segue: 10' a 95°C, seguiti da 40 cicli a 94°C per 30'' (fase di denaturazione) ed una fase di *annealing* a 64°C per 45'' per *F. graminearum* e di 60°C per 45'' per *F. pseudograminearum* che per *F. culmorum*. La fluorescenza veniva rilevata nella fase di *annealing*.

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

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 dall'operatore in modo da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale. Per preparare le concentrazioni degli standard, DNA di *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. pseudograminearum* sono stati quantificati nella prima prova con Nanodrop Spectrophotometer ND-1000, mentre per la seconda prova era disponibile nel laboratorio una diversa tecnologia più sensibile del Nanodrop chiamata Qubit® Fluorometer Technical Resources (ThermoFisherScientific). Gli standard fungini sono stati diluiti in maniera seriale da 5.000 pg a 5 pg nella prima prova e da 5.000 pg a 0,5 pg nella seconda prova, in cui la maggiore sensibilità dello strumento adoperato per la quantificazione ha permesso di quantificare accuratamente quantitativi di

DNA inferiori rispetto a quelli considerati nella prima prova. Le seguenti diluizioni sono state scelte dopo varie prove di costruzione della retta di calibrazione effettuate per ognuna delle tre specie fungine oggetto di studio. Per verificare se gli standard diluiti a varie concentrazioni risentissero dell'effetto matrice provocato dal materiale vegetale da cui è stato estratto il DNA, per le tre specie fungine considerate sono state effettuate prove di costruzione delle rette di calibrazione diluendo in maniera seriale i campioni prima in acqua e poi in una matrice ottenuta dall'estratto di semola di orzo non contaminato. I campioni standard non risentivano dell'effetto matrice, in quanto le rette avevano lo stesso coefficiente di regressione lineare.

Il controllo della specificità dell'amplificazione è avvenuto nell'analisi di dissociazione termica degli ampliconi, eseguita al termine di ogni reazione, portando i prodotti a 95°C per 15", 60°C per 20" e 95°C per 30", con letture ogni 0,3°C.

I prodotti dell'amplificazione sono stati controllati su un gel di agarosio 1%, colorati con una soluzione 0,4 µg/ml di bromuro di etidio (EtBr) e visualizzati su un piano di un illuminatore con luce UV.

Quantificazione della micotossina DON

Sono stati prelevati 10 g dai campioni disidratati e sminuzzati ottenuti dalle spighe di orzo (frammenti IV) e 1 g per gli altri segmenti di ogni campione. Su questi campioni sono stati condotti dei saggi immunoenzimatici per quantificare la presenza di micotossina DON utilizzando kit di diagnosi AgraQuant Deoxynivalenol (RomerLabs®). Per la metodologia si rimanda al capitolo 1.

Osservazione al microscopio a scansione (SEM)

Una pianta per ciascuna tesi, con necrosi nel colletto e lungo il culmo, è stata utilizzata per le osservazioni al SEM.

Per ogni segmento di pianta sono state allestite sezioni trasversali e longitudinali di 5-6 mm di lunghezza e fissate in gluteraldeide al 5% in tampone fosfato di potassio 0,1 M a pH 7,2 per 2 ore a 5°C. Dopo la fissazione le sezioni sono state lavate in una soluzione di tampone fosfato per eliminare eventuali residui di fissativo.

I campioni fissati sono stati gradualmente disidratati in una serie di soluzioni di etanolo ed acqua (10, 20, 30, 50, 75 e 95%) ed infine mantenuti in etanolo al 100% a 5°C. Si è proceduto ad una ulteriore disidratazione con anidride carbonica mediante il *critical point drier*

(Emitech Ltd, Ashford, Inghilterra). I campioni, completamente anidri, sono stati montati su porta-campioni di alluminio mediante un biadesivo conduttivo e ricoperti con un film di oro/palladio mediante un *ion sputtering unit* Emitech K500 (Emitech Ltd). I campioni sono stati osservati al microscopio elettronico a scansione (Philips, Eindhoven, Olanda) a 10 kV a vari ingrandimenti (da 300x a 1200x).

Le foto sono state scattate con una Nikon 5400 Coolpix digital (Nikon, Tokyo, Giappone).

Analisi statistica

I dati del rilievo fitopatometrico in serra, della quantificazione assoluta del DNA tramite qPCR e del contenuto di micotossina DON sono stati analizzati mediante il software IBM SPSS 20. La comparazione delle medie, su set di dati multipli, è stata effettuata mediante analisi della varianza (ANOVA) con un livello di significatività di $p \leq 0.05$. I risultati sono stati confrontati con il test *post hoc* di Tukey HDS.

RISULTATI

PROVA 1

Rilievo fitopatometrico

Dal rilievo visivo è stato osservato che la necrosi nella maggior parte dei culmi arrivava fino al I segmento nelle piante inoculate con le tre specie di *Fusarium*, solo in minore percentuale la necrosi risaliva fino al II o oltre il II segmento. Nella Tabella 3.1 sono riportati, per ciascuna tesi, il numero medio dei culmi per pianta, il numero medio dei culmi necrotici, le percentuali di culmi con necrosi al I, al II, e oltre il II segmento.

Si può osservare che, per quanto riguarda il numero di culmi, le piante non hanno mostrato differente grado di accostamento tra tutte le tesi in esame, con valori medi che variavano da 10,38 a 11,89 culmi per pianta. Per quanto riguarda la percentuale dei culmi necrotici, Fc ha presentato un valore medio di 39,85%, significativamente maggiore rispetto a Fg (25,93%) e Fps (22,73%), tra di loro non distinti statisticamente. Nel Test era presente una percentuale di culmi necrotici significativamente più bassa (10,34%).

La tesi Fc si differenzia statisticamente per la più alta percentuale di culmi con necrosi al I segmento rispetto a Fps, riportando rispettivamente valori 33,33 e 20%.

Dal secondo segmento non sono state rilevate differenze significative fra le tesi inoculate con le tre specie di *Fusarium*.

Tabella 3.1: Valori medi ottenuti nel rilievo fitopatometrico (prova 1) Ad eccezione del n. di culmi totali, i valori sono espressi come percentuali.

TESI	n. culmi totali	culmi necrotici %	culmi con necrosi I segmento %	culmi con necrosi II segmento %	culmi con necrosi oltre II segmento %
Fc	10,56	39,85 a	33,33 a	5,33 a	1,33
Fg	10,99	25,93 b	20,66 ab	4,33 a	0,67
Fps	11,89	22,73 b	20,00 b	2,17 ab	0,83
Test	10,38	10,34 c	10,33 c	0,00 b	0,00
p value=	0,074	0,000	0,000	0,000	0,176

Le analisi micologiche effettuate dai segmenti delle diverse tesi hanno evidenziato la presenza dei patogeni inoculati. Dai segmenti della tesi Test non si è sviluppata alcuna colonia fungina.

Quantificazione assoluta del DNA tramite Real Time PCR

Fusarium culmorum

Analisi molecolari con Real Time PCR sono state effettuate sui campioni di orzo inoculati e non inoculati con il fungo *F. culmorum* (ceppo F820).

Nella Figura 3.7 viene riportata la retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. culmorum*, rispettivamente di 5.000 pg, 500 pg, 50 pg e 5 pg, con relativa equazione $y = -1,4148x + 36,249$ e coefficiente di correlazione $R^2 = 0,996$.

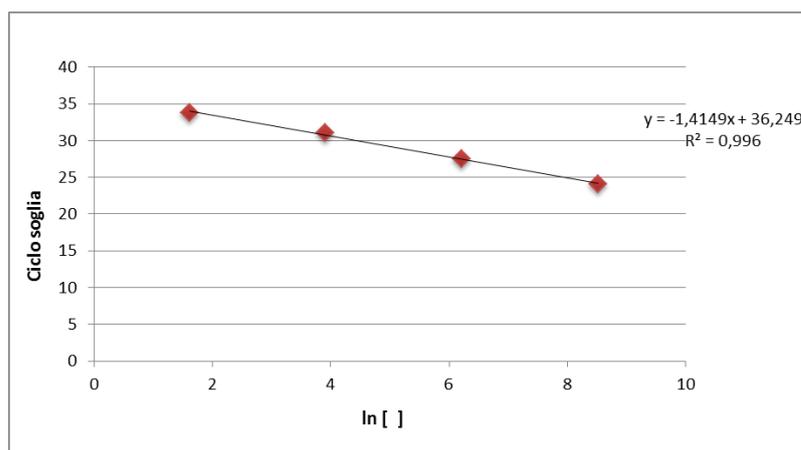


Figura 3.7: Retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. culmorum*.

Nella Tabella 3.2 viene riportato il quantitativo di DNA di *F. culmorum* ritrovato nei campioni espresso in ng/g di sostanza secca. L'amplificazione è risultata specifica, verificata

tramite l'analisi di dissociazione termica. La temperatura di dissociazione per *F. culmorum* è risultata 79,3°C, in linea con i parametri dello strumento (dati non mostrati).

Dai dati in tabella si nota una significativa presenza del fungo al I e II segmento (rispettivamente con 1.464,05 ng e 1.148,28 ng). Nel III e nel IV segmento il fungo era presente in quantità significativamente minore rispetto agli altri segmenti, con valori rispettivamente pari a 17,31 ng e 1,15 ng. Nel Test non è stato ritrovato DNA di *F. culmorum*.

Tabella 3.2: Quantitativo di DNA (ng/g di sostanza secca) nei segmenti delle tesi Fc e Test.

Segmento	Fc	Test
I	1464,05 a	0,00
II	1148,28 a	0,00
III	17,31 b	0,00
IV	1,15 b	0,00
p value=	0,019	n.d.

Fusarium graminearum

Nella Figura 3.8 viene riportata la retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. graminearum* (ceppo F913), alle seguenti concentrazioni: 5.000 pg, 500 pg, 50 pg e 5 pg, con relativa equazione $y = -1,5653x + 32,707$, e coefficiente di correlazione $R^2 = 0,9995$.

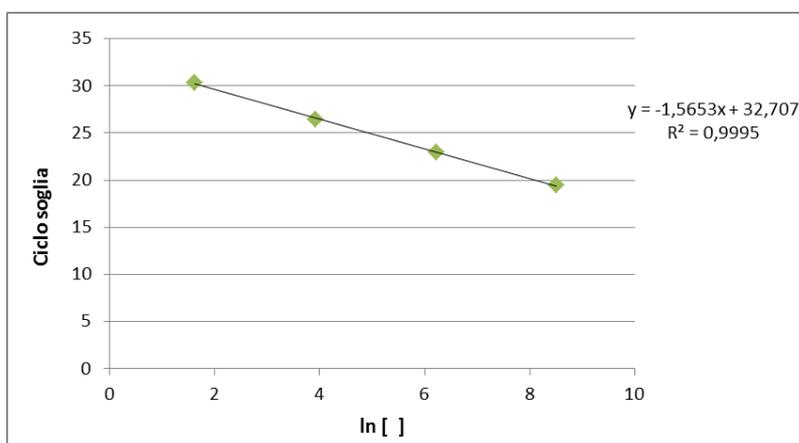


Figura 3.8: Retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. graminearum*.

Nella Tabella 3.3 sono riportati i quantitativi di DNA di *F. graminearum* ritrovati nei campioni espressi in ng/g di sostanza secca. Dalla verifica effettuata tramite l'analisi di dissociazione termica eseguita al termine della reazione, è stato dimostrato che l'amplificazione è avvenuta in modo specifico. La temperatura di dissociazione per il DNA di

F. graminearum è risultata 80,4 °C, in linea con i parametri dello strumento (dati non mostrati).

Dai dati ottenuti si nota che il DNA fungino era presente in maniera significativa tra i segmenti. Il valore più alto è stato ritrovato nel I segmento con 145,68 ng, invece valori più bassi sono stati riscontrati nel III (1,23 ng) ed nel IV segmento (1,15 ng). Nel Test non è apparsa traccia del fungo.

Tabella 3.3: Quantitativo di DNA (ng/g di sostanza secca) nei segmenti delle tesi Fg e Test

Segmento	Fg	Test
I	145,68 a	0,00
II	58,51 ab	0,00
III	1,23 b	0,00
IV	0,59 b	0,00
p value=	0,048	n.d.

Fusarium pseudograminearum

Nella Figura 3.9 è riportata la retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. pseudograminearum* (F1140), rispettivamente di 5.000 pg, 500 pg, 50 pg e 5 pg, con relativa equazione $y = -1,4463x + 34,582$, e coefficiente di correlazione $R^2 = 0,9994$.

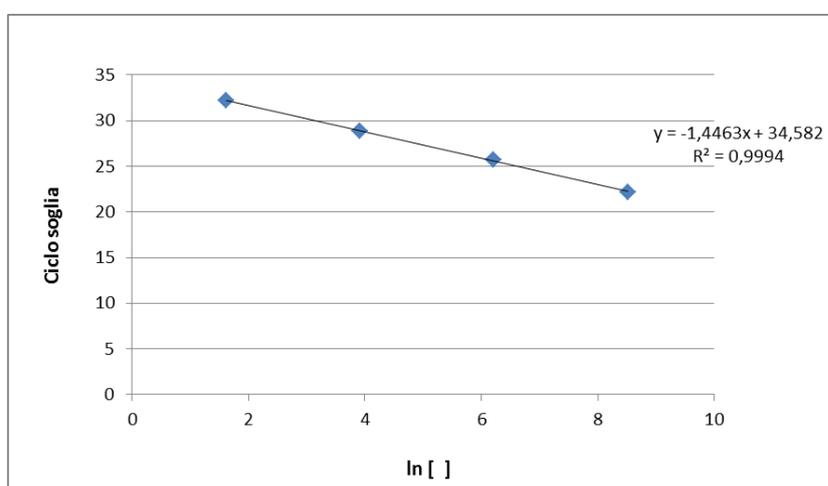


Figura 3.9: Retta di calibrazione ottenuta dagli standard di DNA di *F. pseudograminearum*.

Nella Tabella 3.4 si riporta il quantitativo di DNA di *F. pseudograminearum* ritrovato nei campioni espresso in ng/g di sostanza secca. L'amplificazione è risultata specifica. La temperatura di dissociazione per il DNA di *F. pseudograminearum* è risultata 75,8°C, in linea con i parametri dello strumento (dati non mostrati).

I dati non sono risultati statisticamente significativi tra i segmenti, data la alta variabilità tra le ripetizioni.

Nel Test non è stato riscontrato DNA specifico a *F. pseudograminearum*.

Tabella 3.4: Quantitativo di DNA (ng/g di sostanza secca) nei segmenti delle tesi Fps e Test.

Segmento	Fps	Test
I	492,90	0,00
II	68,56	0,00
III	0,00	0,00
IV	0,00	0,00
p value=	0,188	n.d.

Micotossina DON

Nella Tabella 3.5 sono riportati i valori medi espressi in ppm di micotossina DON nei diversi segmenti delle piante saggiate riportando < 0,2 i valori che cadono al di fuori del limite di determinazione della retta di calibrazione del saggio.

Il valore più alto di DON è stato rilevato nella tesi Fc, dove nel I segmento e II segmento, sono stati ritrovati 12,12 e 8,26 ppm di micotossina, statisticamente non dissimili tra di loro. Valori significativamente più bassi sono stati ritrovati al III e IV segmento (0,71 e 0,28 ppm). Nella tesi Fg non sono stati riscontrati valori significativi tra i segmenti, i valori variavano da 3,53 ppm del I segmento a 0,23 ppm del IV segmento. Discorso analogo vale per la tesi Fps: il valore più alto è stato ritrovato nel II segmento (3,37 ppm) e quello più basso nel III segmento (0,27 ppm).

Nel Test non è stata ritrovata micotossina.

Tabella 3.5: Quantitativo di micotossina DON con test ELISA. I dati si riferiscono alla prima prova. I valori sono riportati come medie ed espressi in ppm.

Segmento	Test	Fc	Fg	Fps
I	< 0,2	12,12 a	3,53	2,87
II	< 0,2	8,26 a	0,44	3,37
III	< 0,2	0,71 b	0,26	0,27
IV	< 0,2	0,28 b	0,23	0,48
p value =	n.d.	0,010	0,067	0,578

Osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)

Nel corso della prova, sono state condotte delle osservazioni e si è rilevato che per tutte le tesi al III e al IV segmento non erano presenti ife (dati non mostrati).

Test

Dalle osservazioni al SEM, ad ingrandimenti di 300x e 600x, è possibile notare, nella sezione longitudinale del culmo, che non vi è alcuna traccia di ife. Inoltre, si è osservato che sia a livello del I internodo (Figura 3.10) che a livello del II internodo (Figura 3.11) l'epidermide del culmo appare integra, con presenza di tricomi e stomi sulla guaina fogliare avvolgente il culmo.

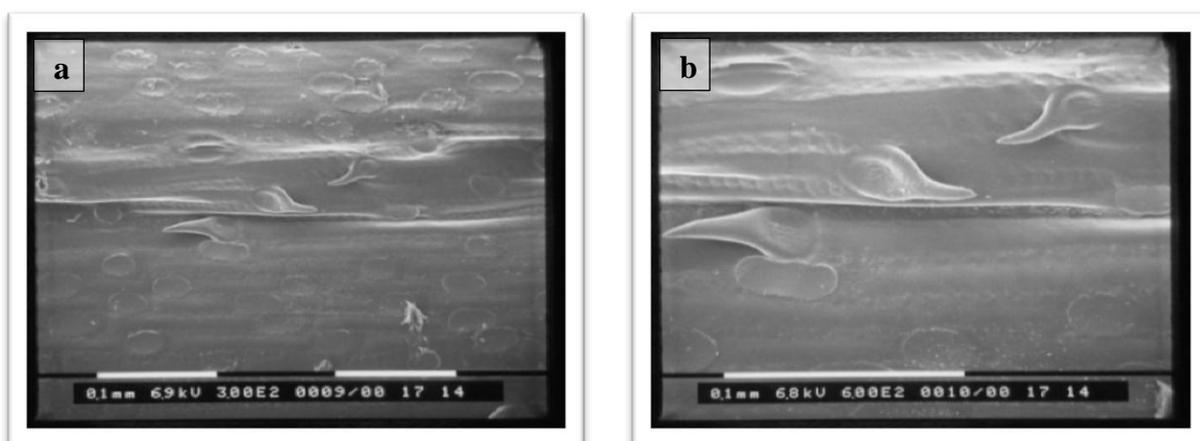


Figura 3.10: Sezione longitudinale della pianta della tesi Test a livello dell'internodo nel I segmento.

Immagine ingrandita a 300x (a) e 600x (b). In entrambe le foto sono visibili i tricomi sull'epidermide della guaina fogliare avvolgente il culmo.

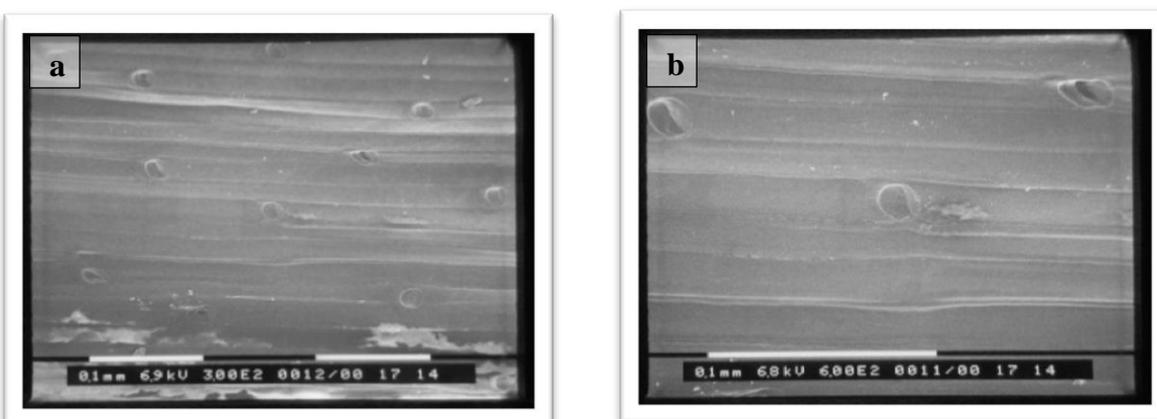


Figura 3.11: Sezione longitudinale della pianta tesi Test a livello dell'internodo nel II segmento.

Immagine ingrandita a 300x (a) e 600x (b). Le foto raffigurano l'epidermide della guaina fogliare che avvolge il culmo. Si possono notare le aperture stomatiche sull'epidermide.

Fusarium culmorum

Nella pianta inoculata con *F. culmorum* si nota che il patogeno ha causato alterazioni all'epidermide, sia a livello del I che del II segmento (Figura 3.12, a e b). Nella sezione trasversale, si osserva la presenza di un'ifa nel lumen del culmo (Figura 3.12, c).

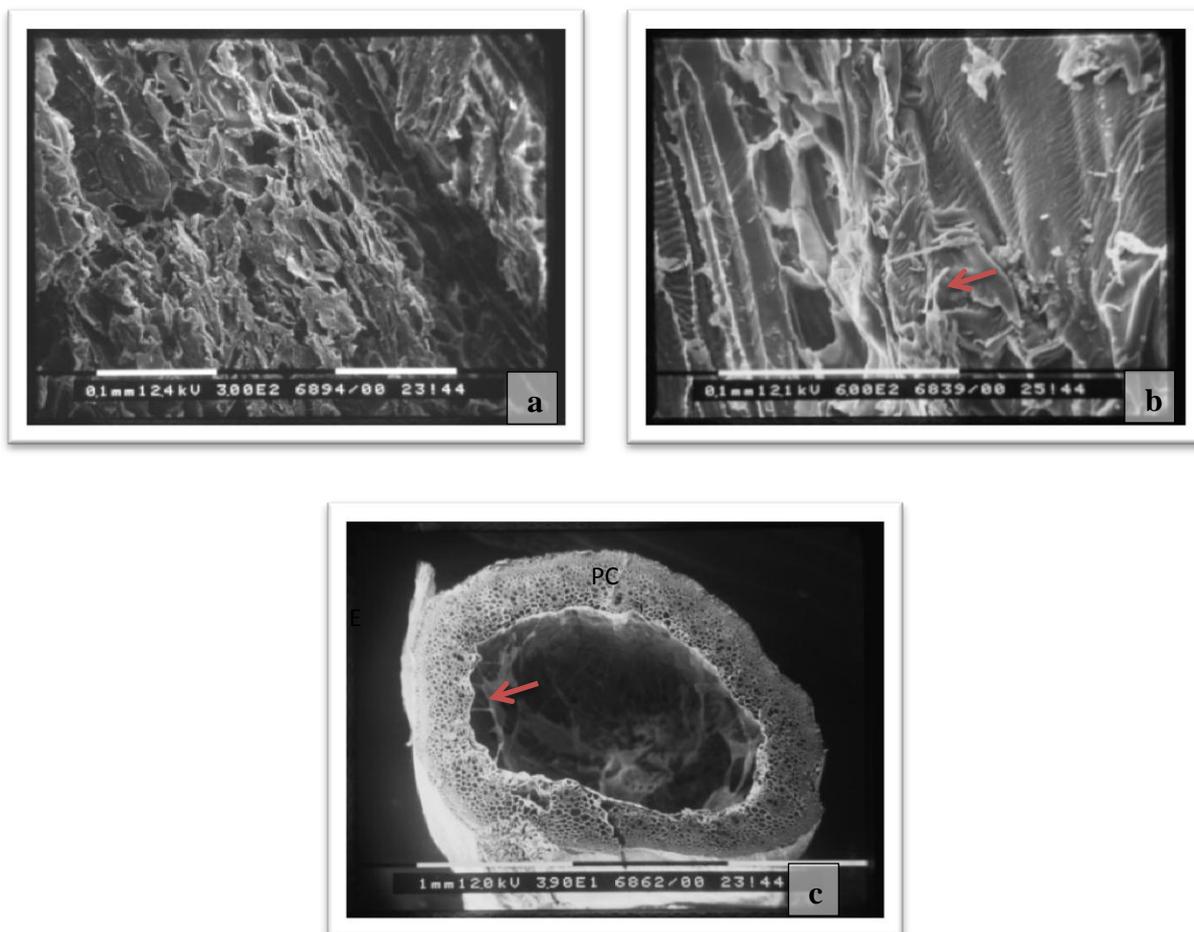


Figura 3.12: Sezioni longitudinale e trasversale della pianta inoculata con *F. culmorum* a livello dell'internodo del II segmento.

Immagini ingrandite a 300x (a), 600x (b) e 390x (c). In a) si osserva il tessuto danneggiato dal fungo; le frecce in b) e c) indicano la presenza di ife. E = epidermide, PC = parenchima corticale.

Fusarium graminearum

Dall'osservazione a diversi ingrandimenti dei tessuti delle piante di orzo infettati con *F. graminearum* si è osservata la presenza di ife sia a livello del I (Figura 3.13, a e b) sia del II segmento (Figura 3.13 c) e all'interno della cavità del culmo (Figura 3.13 d). Il tessuto sembra particolarmente danneggiato soprattutto a livello del I internodo (Figura 3.13 b).

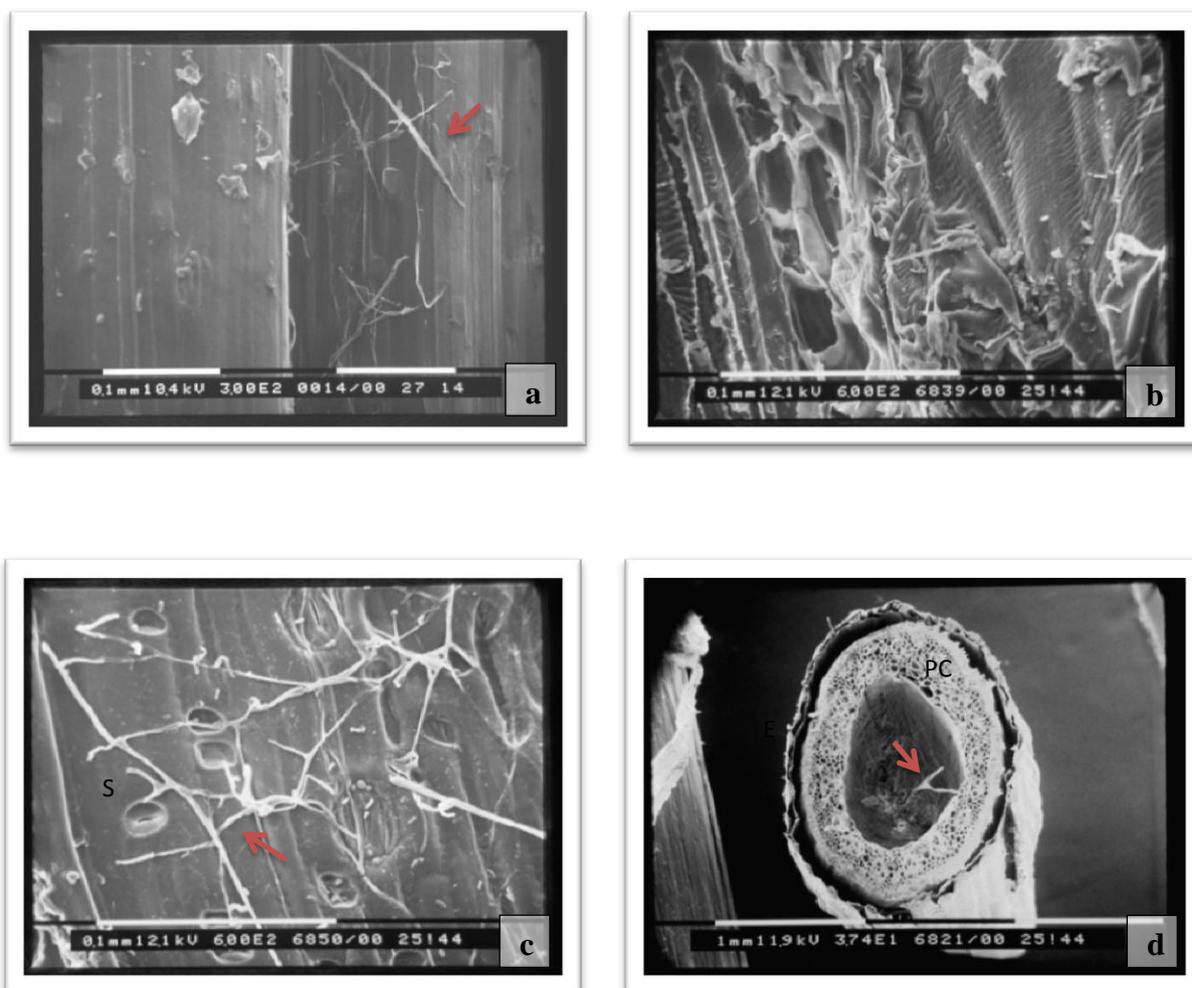


Figura 3.13: Sezioni longitudinali (a, b e c) e trasversale (d) del culmo della pianta inoculata con *F. graminearum*.

Immagine ingrandita a 300x (a), 600x (b e c) e 374x (d). a) e b) mostrano sezioni longitudinali a livello del I segmento. In a) sono ben visibili le ife del fungo. In c) si osservano le ife che colonizzano la superficie dell'epidermide protendendosi verso le aperture stomatiche. In d) si può notare un'ifa all'interno della cavità del culmo. Le frecce indicano le ife. E = epidermide; PC = parenchima corticale, S = stoma.

Fusarium pseudograminearum

Nella porzione di pianta proveniente dalla tesi Fps sono state osservate numerose ife a livello dell'internodo del I segmento (Figura 3.14).

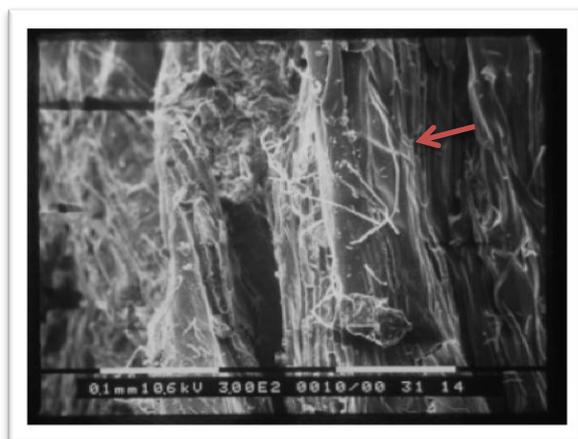


Figura 3.14: Sezione longitudinale della pianta inoculata con *F. pseudograminearum* a livello dell'internodo del I segmento.

Immagine ingrandita a 300x (a). Nella foto sono visibili le ife.

PROVA 2:

Rilievo fitopatometrico

Per ciascuna tesi sono stati considerati gli stessi parametri della prima prova. I dati ottenuti sono riportati nella Tabella 3.6. Da questa si evidenzia che il numero medio di culmi accestiti per pianta non è stato influenzato dai *Fusarium* inoculati, con valori che variavano da 3,47 a 4,56. Per quanto riguarda la percentuale di culmi necrotici, il valore medio significativamente più alto è quello di Fc (92,81%); le tesi Fg e Fps non si discostano per significatività tra di loro con valori pari a 41,77% e 48,48% rispettivamente. Il numero di culmi necrotici della tesi Test è risultato significativamente più basso (12,55%).

Tutti i culmi (100%) della tesi Fc presentavano necrosi al I segmento. Tale valore è risultato significativamente diverso da quello di Fg e Fps (41,08 e 47,14% rispettivamente). Il numero percentuale di culmi con necrosi al II segmento delle piante inoculate con le diverse specie di *Fusarium* sono risultati simili tra loro e significativamente più alti di quelli del testimone. Relativamente ai culmi con necrosi oltre il II segmento non sono state ritrovate differenze significative tra le tesi.

Tabella 3.6: Valori medi ottenuti nel rilievo fitopatometrico, ad eccezione del n. di culmi totali, i valori sono espressi come percentuali.

TESI	n. culmi totali	culmi necrotici %	culmi con necrosi I segmento %	culmi con necrosi II segmento %	culmi con necrosi oltre II segmento %
Fc	3,47	92,81 a	100,00 a	66,18 a	43,55
Fg	3,87	41,77 b	41,08 b	35,84 a	27,69
Fps	4,22	48,48 b	47,14 b	39,77 a	28,38
Test	4,56	12,55 c	12,55 c	0,74 b	0,00
p value=	0,069	0,000	0,000	0,000	0,174

Quantificazione assoluta del DNA tramite Real Time PCR

Fusarium culmorum

In questa seconda prova sono state condotte analisi di qPCR per la quantificazione dei DNA dei funghi inoculati.

Nella Figura 3.15 viene riportata la retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. culmorum* (ceppo F820), rispettivamente di 5.000 pg, 500 pg, 50 pg, 5 pg e 0,5 pg, con relativa equazione $y = -1,427x + 32,622$, e coefficiente di correlazione $R^2 = 0,9992$.

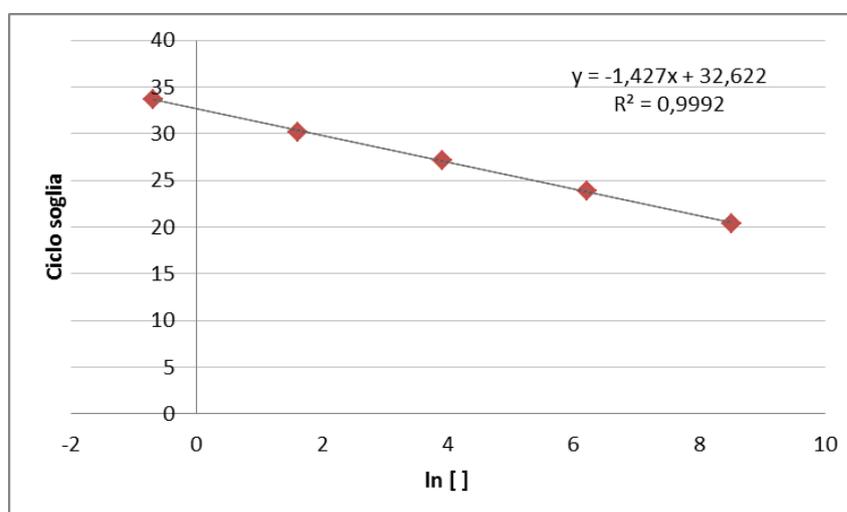


Figura 3.15: Retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. culmorum*.

Nella Tabella 3.7 viene riportato il quantitativo di DNA di *F. culmorum* presente nei campioni ed espresso in ng/g di sostanza secca. L'amplificazione è avvenuta in modo specifico, dimostrato dal fatto che è risultata una temperatura di dissociazione di 79,3°C, in linea con i parametri dello strumento (dati non mostrati).

In questa seconda prova si sono registrati valori di DNA nel loro complesso più bassi rispetto alla prima prova.

I valori di quantificazione del DNA di *F. culmorum* non sono risultati statisticamente significativi tra i segmenti, seppure si è registrata una maggiore presenza del DNA fungino al I segmento (168,46 ng), rispetto ai valori più bassi del II segmenti (30,69 ng) e appena accennati al III segmento e IV segmento (0,19 e 0,02 ng) per la variabilità fra le ripetizioni.

Nel Test non è stato ritrovato DNA di *F. culmorum*.

Tabella 3.7: Contenuto di di DNA (ng/g di sostanza secca) nei segmenti delle tesi Fc e Test.

Segmento	Fc	Test
I	168,46	0,00
II	30,69	0,00
III	0,19	0,00
IV	0,02	0,00
p value=	0,078	n.d.

Fusarium graminearum

Nella Figura 3.16 viene riportata la retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. graminearum* (ceppo F913), alle seguenti concentrazioni: 5.000 pg, 500 pg, 50 pg, 5 pg e 0.5 pg con relativa equazione $y = -1,5851x + 32,659$, e coefficiente di correlazione $R^2 = 0,9976$.

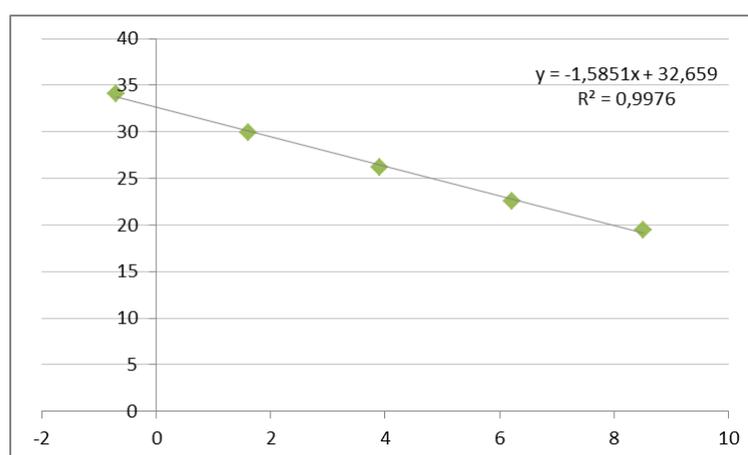


Figura 3.16: Retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. graminearum*.

Nella Tabella 3.8 sono riportati i quantitativi di DNA di *F. graminearum* ritrovati nei campioni espressi in ng/g di sostanza secca. Dalla verifica effettuata tramite l'analisi di dissociazione termica eseguita al termine della reazione, è stato dimostrato che

l'amplificazione è avvenuta in modo specifico. La temperatura di dissociazione per il DNA di *F. graminearum* è risultata 80,4 °C, in linea con i parametri dello strumento (dati non mostrati).

Tra i segmenti della tesi Fg si evidenzia una maggiore presenza, nel I e II segmento (rispettivamente 9,74 ng e 6,47 ng), significativa rispetto al III e IV segmento, dove non è stato ritrovato il fungo.

Nel Test non è stato ritrovato *F. graminearum*.

Tabella 3.8: contenuto di DNA (ng/g di sostanza secca) nei segmenti delle tesi Fg e Test.

Segmento	Fg	Test
I	9,72 a	0,00
II	6,47 a	0,00
III	0,00 b	0,00
IV	0,00 b	0,00
p value=	0,020	n.d.

Fusarium pseudograminearum

Nella Figura 3.17 è riportata la retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. pseudograminearum* (F1140), rispettivamente di 5.000 pg, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 0,5 pg, con relativa equazione $y = -1,5337x + 31,774$, e coefficiente di correlazione $R^2 = 0,9951$

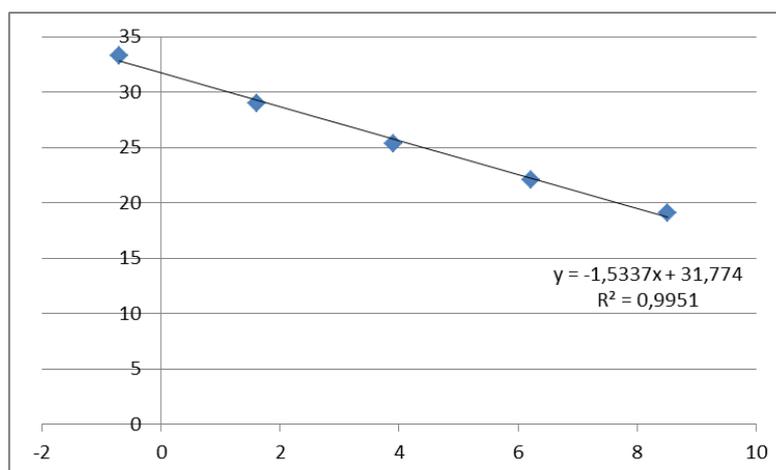


Figura 3.17: Retta di calibrazione ottenuta con gli standard di DNA di *F. pseudograminearum*.

Nella Tabella 3.9 si riporta il quantitativo di DNA di *F. pseudograminearum* ritrovato nei campioni espresso in ng/g di sostanza secca. L'amplificazione è risultata specifica. La temperatura di dissociazione per il DNA di *F. pseudograminearum* è risultata 75,8°C, in linea con i parametri dello strumento (dati non mostrati).

Solo una lieve presenza di DNA fungino è stata ritrovata al I segmento con valore di 0,92 ng, che significativamente si discosta dai valori nulli degli altri segmenti.

Nel Test non è stato riscontrato DNA specifico a *F. pseudograminearum*.

Tabella 3.9: Contenuto di DNA (ng/g di sostanza secca) nei segmenti delle tesi Fps e Test.

Segmento	Fps	Test
I	0,92 a	0,00
II	0,00 b	0,00
III	0,00 b	0,00
IV	0,00 b	0,00
p value=	0,013	n.d.

Micotossina DON

Nella Tabella 3.10 sono riportati i valori medi espressi in ppm di micotossina DON nei diversi segmenti delle piante saggiate riportando < 0,2 per i valori che cadono al di fuori del limite di determinazione della retta di calibrazione del saggio.

In linea con quanto già riscontrato con la quantificazione del DNA, in questa seconda prova i valori di micotossina sono stati inferiori. Però la tesi che riporta il valore significativamente più alto si conferma Fc, dove, al I segmento sono stati quantificati 8,81 ppm di DON. Il valore si discosta da quelli ritrovati negli altri segmenti: II segmento 2,49 ppm, III segmento 0,39 ppm e IV segmento 0,43 ppm. Nella tesi Fg, i dati sono non significativi e sotto al limite di 0,2 nei primi tre segmenti. Solo nel IV segmento è stata quantificata la micotossina presente con 0,45 ppm.

Nella tesi Fps, anch'essa senza significatività statistica, si è determinata una scarsa presenza della micotossina al I segmento (0,32 ppm), al III (0,23) e al IV (0,43 ppm) ed al II segmento era sotto il limite di rilevamento.

Tabella 3.10: Quantificazione micotossina DON con test ELISA. I dati si riferiscono alla seconda prova. I valori sono riportati come medie ed espressi in ppm.

Segmento	Test	Fc	Fg	Fps
I	< 0,2	8,81 a	< 0,2	0,32
II	< 0,2	2,49 b	< 0,2	< 0,2
III	< 0,2	0,39 b	< 0,2	0,23
IV	< 0,2	0,43 b	0,45	0,43
p value =	n.d.	0,022	0,051	0,064

DISCUSSIONE

Lo studio condotto in questo capitolo ha preso in considerazione i principali agenti della fusariosi del piede dell'orzo: *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. pseudograminearum*. Essi sono noti per produrre tricoteceni ed in particolare la micotossina DON, la cui presenza negli alimenti, data la sua pericolosità, è regolata legislativamente in molti Paesi del mondo.

È da sottolineare come su orzo sia esigua la letteratura riguardante la fusariosi del piede, diversi sono invece gli studi su frumento, in particolare frumento tenero, dove sono indagati anche i processi di colonizzazione di *Fusarium* dal culmo alla spiga, correlando la presenza del patogeno con la traslocazione della micotossina DON (Beccari et al., 2011; Covarelli et al., 2012; Mudge et al., 2006; Stephens et al., 2008; Winter et al., 2013). Gli studi citati riguardano principalmente le specie *F. culmorum* e *F. graminearum* e solo il lavoro di Mudge e collaboratori (2006) studia il comportamento di *F. pseudograminearum*, patogeno con diffusione più limitata rispetto alle altre due specie.

Ad oggi questo è il primo lavoro in cui si è studiato, singolarmente su piante di orzo, la colonizzazione di tre funghi tossigeni appartenenti al genere *Fusarium*, *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. pseudograminearum*, correlandola con la traslocazione della micotossina DON. In particolare è stata valutata la patogenicità dei tre ceppi di *Fusarium* in base alla loro capacità di indurre i sintomi di necrosi e di colonizzare porzioni distinte del culmo e la spiga di piante di orzo.

Dalle prove condotte in ambiente controllato è emerso che l'inoculazione dei tre patogeni non ha influenzato l'accestimento delle piante di orzo, in quanto il numero medio di culmi accestiti per ciascuna tesi non si è mai differenziato statisticamente dal Test. Nonostante ciò, tra la prima e la seconda prova si è rilevato un differente accrescimento delle piante. Infatti, il numero dei culmi nella seconda prova era sensibilmente inferiore rispetto alla prima e, nel complesso, anche gli altri parametri, relativi alle tesi inoculate con i patogeni e la micotossina sono risultate inferiori. Tuttavia il comportamento delle specie di *Fusarium* in termini di grado di colonizzazione e di traslocazione è stato e confermato nella seconda prova.

Le necrosi a livello dei culmi sono risultate evidenti per i tre patogeni che hanno causato il sintomo da FCR. Confrontando le percentuali di culmi necrotici, *F. culmorum* è risultata la specie più aggressiva, rispetto a *F. graminearum* e *F. pseudograminearum*. Dai dati ottenuti in questo studio, è emerso che tutti e tre i patogeni hanno causato necrosi oltre il secondo segmento, differenziandosi però in maniera significativa solo fino a tale livello. I valori di tutte le tesi inoculate si sono sempre discostati dal Test. La presenza, seppur scarsa, di culmi necrotici fino al I segmento nelle piante Test è riconducibile ad un effetto "strozzamento" che

il collarino in PVC può aver provocato, in quanto gli isolamenti sono risultati negativi per presenza di funghi. Questa sofferenza fisiologica è stata confermata anche da entrambe le prove di quantificazione del DNA fungino con qPCR che hanno dimostrato l'assenza del fungo nelle piante Test. Si sottolinea che anche le micotossine erano assenti nel Test. I patogeni sono stati inoculati nel culmo principale, ma con l'accrescersi delle piante, si sono poi diffusi successivamente anche nei culmi di accostamento secondari. La colonizzazione da parte dei tre *Fusarium*, a diverse altezze di porzioni di pianta, è stata confermata anche grazie la messa a punto di protocolli di Real Time PCR per il rilevamento delle singole specie. Dai risultati ottenuti è emersa la presenza di DNA di *F. culmorum* *F. graminearum* fino al IV segmento, corrispondente alla porzione della spiga, mentre il DNA di *F. pseudograminearum* era presente fino al secondo. *F. culmorum* è presente con alte concentrazioni fino al II segmento, in accordo con le osservazioni di altri Autori su frumento tenero (Covarelli et al., 2012; Winter et al., 2013). In un'analoga prova sulla fusariosi del piede del frumento tenero, Stephens et al. (2008) hanno descritto tre fasi del meccanismo di penetrazione di *F. graminearum*: la prima definita di penetrazione laterale, la seconda di discesa del fungo attraverso le radici e la terza attraverso il *lumen* del culmo centrale e del parenchima. La capacità di altre specie di *Fusarium* (*F. culmorum* e *F. pseudograminearum*) di muoversi lungo il culmo e nella spiga, partendo dalla base, è stata verificata solo recentemente su frumento tenero (Covarelli et al., 2012; Mudge et al., 2006; Winter et al., 2013) e duro (Moretti et al., 2014). Anche in orzo, così come in frumento, è probabile che *F. culmorum* inizi il processo di colonizzazione dal punto di inserzione della guaina fogliare alla base di culmo (Beccari et al., 2011; Covarelli et al., 2012), danneggiando le cellule dell'epidermide della guaina. In questo lavoro è stato osservato con le immagini al SEM, un danno al parenchima corticale in presenza delle ife del fungo patogeno che indicherebbe il possibile processo di colonizzazione.

F. culmorum in orzo è risultato presente fino al secondo segmento in quantità elevate e la sua risalita nel culmo fino alla spiga è avvenuta presumibilmente tramite la colonizzazione di tessuti vascolari. Ciò trova riscontro in studi di Clement e Parry (1998). Contrariamente, Covarelli et al. (2012) e Winter et al. (2013) sostengono che, nel frumento, *F. culmorum* non sia in grado di colonizzare la spiga per la presenza di uno strato di lignina delle cellule parenchimali del culmo. Tale affermazione è supportata da Mudge et al. (2006) per i patogeni *F. graminearum* e *F. pseudograminearum* su frumento tenero.

I dati di quantificazione del DNA sono risultati in linea con quanto riscontrato visivamente: ad una maggiore presenza di DNA fungino al I segmento corrisponde una maggiore

percentuale di culmi con necrosi. Mudge et al. (2006) hanno evidenziato come *F. graminearum* e *F. pseudograminearum* in frumento tenero colonizzino i tessuti del culmo penetrando attraverso l'epidermide della guaina fogliare in maniera molto simile a quanto riportato per *F. culmorum*. Da qui i due funghi riescono ad invadere i tessuti parenchimatici adiacenti allo strato epidermico e quindi a colonizzare il culmo attraverso un percorso intercellulare. In orzo si è visto però, diversamente da quanto riportato da Mudge et al. (2006), che la colonizzazione di *F. pseudograminearum* è limitata alle porzioni basali. Questo confermerebbe la maggior capacità di *F. pseudograminearum* rispetto a *F. graminearum* di colonizzare principalmente la parte basale del culmo piuttosto che la spiga, come è anche riportato da indagini sulla fusariosi del piede in Australia (Backhouse et al., 2004; Hollaway et al., 2013). Diverso ancora il discorso su frumento duro, dove *F. graminearum* non risale fino alla base della spiga, presumibilmente per una sorta di barriera presente nella spiga (Moretti et al., 2014).

In accordo con quanto riscontrato con l'analisi Real Time PCR, anche la micotossina DON è risultata presente con alte concentrazioni nei segmenti I e II delle piante di orzo inoculate con *F. culmorum*, traslocando, a concentrazioni inferiori, fino alla spiga (segmento IV). Questi dati sono in accordo con gli studi di Covarelli et al. (2012) su frumento tenero, in cui si è rileva una concentrazione decrescente della micotossina DON dal culmo alla spiga. La risalita della micotossina dal culmo alla spiga è stata osservata anche in *F. graminearum* e *F. pseudograminearum* da Mudge e collaboratori (2006), i quali hanno anche dimostrato che ceppi mutanti per il gene *tri5* (responsabile della biosintesi di DON) di *F. graminearum* non erano in grado di colonizzare la zona adiacente la foglia a bandiera in frumento tenero. DON quindi interferisce con il meccanismo di sintesi proteica della pianta, bloccandone i meccanismi di difesa, ciò agevola l'avanzamento del fungo dalla base del culmo fino alla spiga, come evidenziato in questo lavoro su orzo. DON, essendo idrosolubile, viene trasportato a distanza attraverso il flusso di traspirazione nei vasi xilematici accumulandosi anche in elevate quantità a livello della spiga (Berthiller et al., 2013). Il meccanismo di trasporto sistemico di DON dal culmo alla spiga è stato riportato per frumento tenero da Covarelli et al. (2012) e Winter et al. (2013). Nella Figura 3.18 viene sintetizzato quanto è riportato in bibliografia sulla modalità di colonizzazione di *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. pseudograminearum* in frumento duro e tenero, a confronto a quanto riscontrato nel presente studio condotto su piante di orzo.

Winter et al. (2013) hanno osservato che in piante di frumento tenero inoculate con *F. culmorum*, la micotossina DON era presente ad alte concentrazioni alla base della pianta e nel

risalire fin verso le parti apicali attraverso il flusso xilematico, veniva convertita nella sua forma glucosilata D3G (DON-3-glucoside), arrivando fino ai tessuti delle glume e delle reste dove però si fermava senza arrivare alla granella. Covarelli et al. (2012) hanno riscontrato in frumento tenero una maggiore concentrazione di DON nelle glume e nel rachide rispetto alla granella, dato confermato su frumento duro da Moretti et al. (2014), nonostante la mancata infezione da parte di *F. graminearum* a livello della spiga.

Da tutto questo emerge che, come per frumento, per orzo la presenza di *Fusarium* a livello basale può contribuire ad una contaminazione della granella a livello oltre a quella dovuta a FHB. In conclusione, per la prima volta è stata riportata la capacità di colonizzazione del culmo di piante di orzo da parte dei principali agenti della fusariosi del piede *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. pseudograminearum* e la traslocazione della micotossina DON da essi prodotta. Nell'orzo, inoculato a livello del colletto con questi patogeni, si assiste alla traslocazione della micotossina DON a livello della spiga, come accade per il frumento tenero.

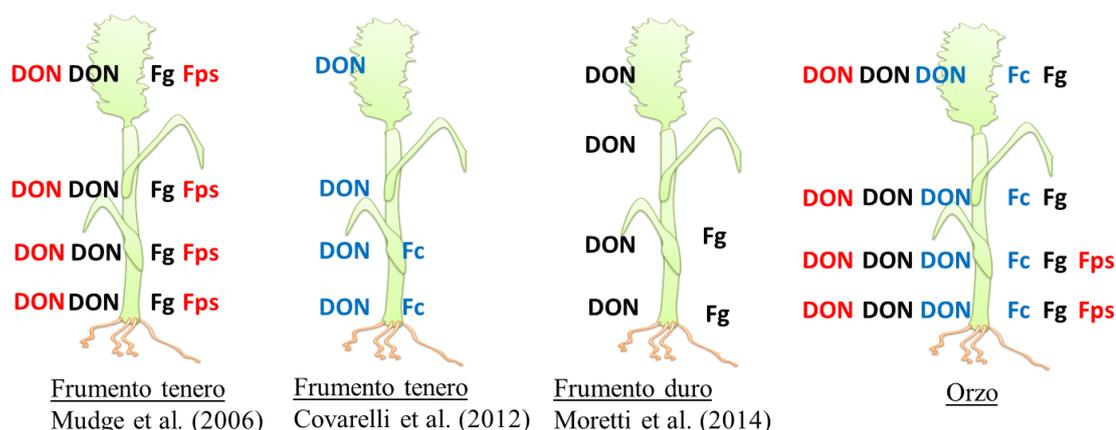


Figura 3.18: Modalità di contaminazione di alcuni *Fusarium* spp e traslocazione micotossina DON in piante di frumento tenero e orzo. Fg = *F. graminearum*, Fps = *F. pseudograminearum*, Fc = *F. culmorum*.

CONCLUSIONI

La fusariosi della spiga (FHB) è un'insidiosa malattia dell'orzo dall'eziologia complessa. La predominanza di una specie di *Fusarium* rispetto ad un'altra nel causare la malattia in un determinato areale, dipende principalmente dal clima e pertanto può cambiare da un anno all'altro, tra le regioni e all'interno di una stessa regione. Con i cambiamenti climatici in corso, sono previsti mutamenti nelle popolazioni fungine come risposta alle diverse condizioni ambientali e alle pratiche colturali (Parikka et al., 2012). Premesso ciò, monitorare le specie fungine presenti in una determinata coltura risulta necessario per fornire indicazioni sull'evoluzione delle popolazioni di funghi tossigeni per prevenire intossicazioni alimentari sia per l'uomo e gli animali.

Questa ricerca presenta i risultati del primo monitoraggio condotto in Italia su granella di orzo, coltivato in diversi areali italiani per identificare le specie di *Fusarium* coinvolte e le relative concentrazioni di micotossine DON e T-2/HT-2. Le specie predominanti sono risultate *F. graminearum*, produttore di DON e ZEA, *F. poae*, produttore di T-2 e HT-2, NIV ed altre micotossine emergenti, *F. tricinctum*, produttore di MON tossina meno studiata rispetto alle altre e *F. culmorum*, anch'esso produttore di DON, NIV e ZEA. Sono risultate presenti, nella granella analizzata, anche *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae*, pericolosi produttori di tossine T-2 e HT-2. Pancaldi et al. (2009) hanno riscontrato in un'indagine decennale (1998-2007) effettuata in Emilia Romagna su frumento duro, che l'incidenza di *F. poae* era notevolmente incrementata durante gli anni di osservazioni. *F. poae* e *F. langsethiae* hanno esigenze ambientali simili e quindi, in uno scenario di cambiamenti climatici, è attesa una loro crescente incidenza sulla granella durante gli anni con clima secco e caldo ed un incremento di *F. graminearum* e *F. culmorum* in condizioni rispettivamente di caldo/umido e fresco/piovoso/umido. Per quanto riguarda la contaminazione da micotossine nei campioni analizzati, questa complessivamente superava i limiti di legge previsti per DON nel 4,5% dei campioni ed era superiore alle raccomandazioni europee per le tossine T-2 e HT-2 nel 3,4%. In futuro è auspicabile continuare il monitoraggio cercando di ampliare non solo il numero di campioni, ma anche quello delle regioni di provenienza, in modo da fornire una sempre più ampia mappatura della distribuzione delle specie di *Fusarium* in orzo nelle regioni italiane che più sono interessate alla coltivazione di questo cereale, con lo scopo di mettere in atto appropriate strategie di controllo e prevenire e/o limitare contaminazioni da micotossine.

In accordo con quanto riportato da vari Autori (Goswami & Kistler, 2004; Linkmeyer et al., 2015; Steffenson, 2003; Tekauz et al., 2000), le infezioni da *Fusarium* spp. sulla spiga di orzo

non sempre sono chiaramente evidenti, poiché gli imbrunimenti o imbiancamenti indotti generalmente rimangono localizzati in piccole aree della spiga e solo un'attenta osservazione li rende visibili e quantificabili. Le prove allestite in ambiente controllato hanno permesso di mettere a punto una scala di valutazione dei sintomi su spighe di orzo distico che prende ispirazione da quella proposta da Parry et al. (1984) per frumento, in base alla sintomatologia determinata da *F. graminearum* e *F. culmorum*. Tale scala, che è stata poi utilizzata nelle prove di campo, si è rivelata pratica e facilmente applicabile da parte di diversi operatori e si ritiene che possa risultare utile nei programmi di breeding laddove vanno valutate numerose parcelle. L'adozione di un'unica scala fitopatometrica faciliterebbe lo scambio di risultati tra i vari gruppi di ricerca.

Il contenuto di DON è risultato correlato, nei due anni di prova di campo, alla frequenza di *F. graminearum* su granella. Questo dato è molto interessante considerando che i parametri fondamentali per la valutazione di FHB in orzo, come riportato anche da Tekauz et al. (2000), risultano FHB *index*, FDK, % di *F. graminearum* nella granella e livelli di DON. Tekauz et al. (2000) affermano che le cariossidi di orzo infette sono leggermente più piccole e leggere delle sane, per questo vengono ugualmente raccolte dalle macchine trebbiatrici, contrariamente a quanto avviene nel frumento dove le cariossidi infette sono molto più leggere e vengono perse durante la fase di raccolta. I dati produttivi delle tesi di orzo infettate artificialmente con ceppi di *Fusarium* non si sono differenziati da quelli delle tesi Test, quindi, si può affermare che la granella infetta e presumibilmente contaminata da micotossine, venga raccolta commercializzata con serie conseguenze per l'industria mangimistica ed alimentare (per la produzione di malto e di birra) (Nielsen et al., 2014; Prom et al., 1996; Tekauz & McCallum, 1998, 1999). Nell'industria maltaria l'utilizzo di cariossidi di orzo infetto desta preoccupazioni non solo per la salute pubblica, ma anche per problematiche di tipo tecnologico, poiché contaminazioni nella granella di orzo da parte di *F. graminearum* possono generare fenomeni di *gushing*.

Recenti studi hanno evidenziato che i tricoteceni sono sintetizzati dal fungo durante il processo di infezione e colonizzazione della pianta (Beccari et al., 2011). Covarelli et al. (2012) hanno dimostrato che in frumento tenero la traslocazione di DON segue l'infezione di *F. culmorum* dalla base del culmo fino alla parte superiore della pianta, concludendo che, questo sistema di trasporto della micotossina, potrebbe spiegare la contaminazione della granella. Infatti, gli stessi patogeni che inducono la fusariosi della spiga possono provocare fusariosi anche nella parte basale della pianta (FCR). Con questo lavoro è stata studiata, per la prima volta su piante di orzo, la colonizzazione di singole specie tossigene di *Fusarium* (*F.*

graminearum, *F. pseudograminearum* e *F. culmorum*), correlandola con la traslocazione della micotossina DON. Confrontando la percentuale di culmi necrotici, *F. culmorum* è risultata la specie più aggressiva tra quelle considerate. Inoltre *F. culmorum* risulta presente in alte concentrazioni fino al II nodo ed è probabile che questo fungo inizi il processo di colonizzazione dal punto di inserzione della guaina fogliare alla base del culmo, danneggiando le cellule dell'epidermide della guaina, come risulta dalle immagini al SEM. La risalita del fungo nel culmo fino alla spiga è avvenuta presumibilmente tramite la colonizzazione di tessuti vascolari, come già descritto in frumento tenero da Covarelli et al. (2012). La micotossina DON è presente con alte concentrazioni nei segmenti I e II, traslocando, seppur a concentrazioni inferiori, fino alla spiga. Come noto in bibliografia, DON interferisce con i meccanismi di sintesi proteica della pianta, bloccando i meccanismi di difesa per così agevolare l'avanzamento del fungo dalla base del culmo fino alla spiga. Da tutto questo emerge che, come per frumento, anche per orzo la presenza di *Fusarium* a livello basale contribuisce ad una contaminazione della granella, oltre a quella dovuta a FHB.

APPENDICE

ALLEGATO I

REGOLAMENTO (CE) N. 1126/2007 DELLA COMMISSIONE

del 28 settembre 2007

[...]

Tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari

[...]

Parte 2: Micotossine

[...]

Prodotti alimentari (1)		Tenori massimi (µg/kg)
2.4	Deossinivalenolo (17)	
2.4.1	Cereali non trasformati (18) (19) diversi da grano duro, avena e granoturco	1 250
2.4.2	Grano duro e avena non trasformati (18) (19)	1 750
2.4.3	Granoturco non trasformato (18), ad eccezione del granoturco non trasformato destinato alla molitura ad umido (37)	1 750 (20)
2.4.4	Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.4.7, 2.4.8 e 2.4.9	750
2.4.5	Pasta (secca) (22)	750
2.4.6	Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500
2.4.7	Alimenti a base di cereali trasformati e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini (3) (7)	200
2.4.8	Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1103 13 o 1103 20 40 e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	750 (20)
2.4.9	Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1102 20 e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	1 250 (20)
2.5	Zearalenone (17)	
2.5.1	Cereali non trasformati (18) (19) diversi dal granoturco	100

Appendice

2.5.2	Granoturco non trasformato ⁽¹⁸⁾ ad eccezione del granturco non trasformato destinato alla molitura ad umido ⁽³⁷⁾	350 ⁽²⁰⁾
2.5.3	Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.5.6, 2.5.7, 2.5.8, 2.5.9 e 2.5.10	75
2.5.4	Olio di granturco raffinato	400 ⁽²⁰⁾
2.5.5	Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione, esclusi le merende a base di granturco e i cereali da colazione a base di granturco	50

[...]

ALLEGATO II

RACCOMANDAZIONE DELLA COMMISSIONE

del 27 marzo 2013

relativa alla presenza di tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(2013/165/UE)

[...]

Livelli indicativi per i cereali e i prodotti a base di cereali (*) (**)

	Livelli indicativi per la somma delle tossine T-2 e HT-2 (µg/kg) a partire dai quali/superati i quali occorre effettuare indagini, soprattutto in caso di riscontri ripetuti (*)
1. Cereali non trasformati (***)	
1.1. orzo (compreso l'orzo da birra) e granturco	200
1.2. avena (non decorticata)	1 000
1.3. frumento, segale e altri cereali	100
2. Grani di cereali destinati al consumo umano diretto (***)	
2.1. avena	200
2.2. granturco	100
2.3. altri cereali	50
3. Prodotti a base di cereali destinati al consumo umano	
3.1. crusca d'avena e fiocchi d'avena	200
3.2. crusche di cereali ad eccezione della crusca d'avena, prodotti di macinazione dell'avena diversi dalla crusca d'avena e dai fiocchi d'avena e prodotti di macinazione del granturco	100
3.3. altri prodotti di macinazione dei cereali	50
3.4. cereali da colazione, anche sotto forma di fiocchi	75
3.5. prodotti di panetteria (compresi i piccoli prodotti da forno), pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali, paste alimentari	25
3.6. alimenti a base di cereali destinati ai lattanti e ai bambini	15

Appendice

4. Prodotti a base di cereali per mangimi e mangimi composti (*****)	
4.1. prodotti di macinazione dell'avena (pula)	2 000
4.2. altri prodotti a base di cereali	500
4.3. mangimi composti, ad eccezione dei mangimi per gatti	250

(*) i livelli di cui al presente allegato sono livelli indicativi superati i quali, soprattutto in caso di riscontri ripetuti, occorre effettuare indagini sui fattori che determinano la presenza delle tossine T-2 e HT-2 o sugli effetti della trasformazione dei mangimi e dei prodotti alimentari. I livelli indicativi si basano sui dati sull'occorrenza disponibili nella banca dati dell'EFSA come da questa illustrato nel suo parere. I livelli indicativi non corrispondono ai livelli di sicurezza dei mangimi e degli alimenti.

(**) Ai fini della presente raccomandazione, il riso non è incluso nei cereali e prodotti a base di riso non sono inclusi nei prodotti a base di cereali.

(***) I cereali non trasformati sono cereali che non hanno subito alcun trattamento fisico o termico ad eccezione dell'essiccazione, della pulitura e della cernita.

(****) I grani di cereali destinati al consumo umano diretto sono i grani di cereali sottoposti ai processi di essiccazione, di pulizia, di decorticazione e di cernita, che non saranno più sottoposti ad altri processi di pulizia e di cernita prima della loro ulteriore trasformazione nella catena alimentare.

(*****) I livelli indicativi per i cereali e i prodotti a base di cereali destinati ai mangimi e ai mangimi composti si riferiscono a mangimi con un tasso di umidità del 12 %.

BIBLIOGRAFIA

- Alberti I., Pancaldi D. (2011). Le principali crittogame del frumento e dell'orzo trasmissibili per seme: loro controllo tramite una concia di qualità. *Dal Seme*, 1, 35-49.
- Alvisi G., Pancaldi D., Cristiani C., Ponti D. (2011). Durata d'azione di protioconazolo contro la fusariosi del grano. *L'Informatore Agrario*, 15, 63-66.
- Aoki T. & O'Donnell K. (1999). Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia*, 597-609.
- Arseniuk E., Foremska E., Chełkowski J. (1999). *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology*, 147(10), 577-590.
- Asan A. (2011). Checklist of *Fusarium* Species Reported from Turkey. *Mycotaxon*, 116:479.
- Backhouse D., Abubakar A.A., Burgess L.W., Dennisc J.I., Holloway G.J., Wildermuth G.B., Wallwork H., Henry F.J. (2004). Survey of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat and barley in eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33(2), 255-261.
- Baffoni L., Gaggia F., Dalanaj N., Prodi A., Nipoti P., Pisi A., Biavati B., Di Gioia D. (2015). Microbial inoculants for the biocontrol of *Fusarium* spp. in durum wheat. *BMC microbiology*, 15(1), 242.
- Bai G. & Shaner G. (2004). Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight 1. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 135-161.
- Baldoni R. & Giardini L. (1989). *Coltivazioni erbacee* (seconda ed.). Bologna, Italy: Pàtron Editore.
- Balmas V., Corazza L., Magnotta A. (1999). Presenza di *Fusarium* spp. in terreni non coltivati in Italia. *Micologia Italiana*, 28, 5-8.
- Balmas V., Santori A., Corazza L. (2000). Le specie di *Fusarium* più comuni in Italia. Suggerimenti per il loro riconoscimento. *Petria*, 10, 1-60.
- Bateman G.L., Murray G., Gutteridge R.J., Coşkun H. (1998). Effects of method of straw disposal and depth of cultivation on populations of *Fusarium* spp. in soil and on brown foot rot in continuous winter wheat. *Annals of Applied Biology*, 132(1), 35-47.
- 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(4), 671-684.
- Bekele B., Makkouk K.M., Yusuf A., Alemayu F., Lencho A. (2001). Occurrence and distribution of barley yellow dwarf virus (BYDV) isolates in central Ethiopia. *International Journal of Pest Management*, 47(2), 115-119.
- Belli G., Casati P., Cortesi P., Faoro F., Iriti M., Saracchi M., Sardi P., Vercesi A. (2012). *Elementi di Patologia Vegetale, seconda edizione*. Padova.: Ed. Piccin Nuova Libreria.
- Berthiller F., Crews C., Dall'Asta C., Saeger S.D., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I.P., Seefelder W., Speijers G., Stroka J. (2013). Masked mycotoxins: A review. *Molecular nutrition & food research*, 57(1), 165-186.

- Bottalico A. (2004). Micotossine. In Cabras P. e Martelli A. (Ed.), *Chimica degli alimenti* (pp. 649-686). Padova: Piccin Nuova Libreria.
- Bottalico A. & Perrone G. (2002). Toxicogenic *Fusarium* species and Mycotoxins Associated with Head Blight in Small-Grain Cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 611-624. doi: 10.1023/A:1020635214971
- Bowden R.L. & Leslie J.F. (1999). Sexual recombination in *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 89(2), 182-188.
- 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 sciences*, 9(11), 2306-2321.
- Briggs D.E. (1978). *Barley*. London, UK: Chapman and Hall.
- Buerstmayr H., Ban T., Anderson J.A. (2009). QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant breeding*, 128(1), 1-26.
- Buiatti S., Sensidoni A., Fontana M. (2006). Il controllo di qualità dell'orzo e del malto. *Tecnica molitoria*, 749-764.
- Burgess L.W., Wearing A.H., Toussoun T.A. (1975). Surveys of *Fusaria* associated with crown rot of wheat in eastern Australia. *Crop and Pasture Science*, 26(5), 791-799.
- Bushnell W.R., Hazen B.E., Pritsch C. (2003). Histology and physiology of *Fusarium* head blight *Fusarium head blight of wheat and barley* (pp. 44-83).
- Caloni F. & Nebbia C. (2009). Micotossine in: Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali (pp. 453-464).
- Carter J.P., Rezanoor H.N., Holden D., Desjardins A.E., Plattner R.D., Nicholson P. (2002). Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108(6), 573-583.
- Cavret S. & Lecoœur S. (2006). Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 444-453.
- Ceccarelli S., Grando S., Shevstov V., Vivar H., Yayaoui A., El-Bhoussini M., Baum M. (1999). The ICARDA strategy for global barley improvement. *Rachis*, 18(2), 3-12.
- Chamarthi S.K., Kumar K., Gunnaiah R., Kushalappa A.C., Dion Y., Choo T.M. (2014). Identification of *fusarium* head blight resistance related metabolites specific to doubled-haploid lines in barley. *European Journal of Plant Pathology*, 138(1), 67-78.
- Choo T.M., Martin R.A., Ho K., Shen Q., Fedak G., Savard M., Voldeng H., Falk D.E., Etienne M., Sperry E. (2004). *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation of barley in eastern Canada: cultivar response and correlation analysis. *Plant disease*, 88(8), 837-844.
- Choo T.M. (2006). Breeding barley for resistance to *fusarium* head blight and mycotoxin accumulation. *Plant Breeding Reviews*, 26, 125.
- Clear R.M., Patrick S.K., Gaba D. (2000). Prevalence of fungi and fusariotoxins on barley seed from western Canada, 1995 to 1997. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(1), 44-50.

- Clement J.A. & Parry D.W. (1998). Stem-base disease and fungal colonisation of winter wheat grown in compost inoculated with *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *Microdochium nivale*. *European Journal of Plant Pathology*, 104(4), 323-330.
- Commission, EC. (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff: 2006R1881-EN-01.09. 2014-014.001-1.
- Commission, EC. (2013). Commission Recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products (2013/165/EU). *Off J Eur Union L*, 91, 12-15.
- Cook R.J. (1980). *Fusarium* foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. *Plant Dis*, 64(12), 1061-1066.
- Covarelli L., Beccari G., Steed A., Nicholson P. (2012). Colonization of soft wheat following infection of the stem base by *Fusarium culmorum* and translocation of deoxynivalenol to the head. *Plant Pathology*, 61(6), 1121-1129.
- Cuomo C.A., Güldener U., Xu J.R., Trail F., Turgeon B.G., Di Pietro A., Walton J.D., Ma L.J., Baker S.E., Rep M. (2007). The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317(5843), 1400-1402.
- 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 and technology*, 80(3), 183-205.
- Dahleen L.S., Morgan W., Mittal S., Bregitzer P., Brown R.H., Hill N.S. (2012). Quantitative trait loci (QTL) for *Fusarium* ELISA compared to QTL for *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol content in barley. *Plant breeding*, 131(2), 237-243.
- Desjardins A.E. (2006). *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology*: American Phytopathological Society (APS Press).
- Dill-Macky R. & Jones R.K. (2000). The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant disease*, 84(1), 71-76.
- Dongyou L. (2009). *Molecular detection of foodborne pathogens*. New South Wales, Australia: CRC Press.
- Doohan F.M., Brennan J., Cooke B.M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi* (pp. 755-768): Springer.
- Doohan F.M., Parry D.W., Jenkinson P., Nicholson P. (1998). The use of species-specific PCR-based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant Pathology*, 47(2), 197-205.
- Dyer A.T., Johnston R.H., Hogg A.C., Johnston J.A. (2009). Comparison of pathogenicity of the *Fusarium* crown rot (FCR) complex (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*) on hard red spring and durum wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 125(3), 387-395.
- Edwards S.G. (2007). *Investigation of Fusarium mycotoxins in UK barley and oat production*. London, UK.
- 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.

- Ellis R.P. (2002). Wild barley as a source of genes for crop improvement. *Barley Science recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality*, 65-83.
- Eriksen G.S. & Pettersson H. (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal feed science and technology*, 114(1), 205-239.
- Eriksen G.S., Pettersson H., Lundh T. (2004). Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology*, 42(4), 619-624.
- Fischbeck G. (2002). Contribution of barley to agriculture: a brief overview. *Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL, Romagosa. Barley Science, Recent advantages from molecular biology to agronomy of yield and quality. Food Products Press, Binghamton, USA*, 1-14.
- Garbe L.A., Nagel R., Rauschmann M., Lamers M., Ehmer A., Tressl R. (2007). Correlation of deoxynivalenol, hydrophobins and gushing. *Proc. Eur. Brew. Congr., Venice*.
- Garbe L.A., Schwarz P.I., Ehmer A. (2008). Beer gushing. *Handbook of Alcoholic Beverages Series, Beer A Quality perspective*, 185-212.
- Gardiner D.M., McDonald M.C., Covarelli L., Solomon P.S., Rusu A.G., Marshall M., Kazan K., Chakraborty S., McDonald B.A., Manners J.M. (2012). Comparative pathogenomics reveals horizontally acquired novel virulence genes in fungi infecting cereal hosts. *PLoS Pathog*, 8(9), e1002952.
- Gardner R.J. (1973). The mechanism of gushing - a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(4), 275-283.
- Gargouri S., Bernier L., Hajlaoui M.R., & Marrakchi M. (2003). Genetic variability and population structure of the wheat foot rot fungus, *Fusarium culmorum*, in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*, 109(8), 807-815.
- Geddes J., Eudes F., Laroche A., Selinger L.B. (2008). Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Hordeum vulgare*. *Proteomics*, 8(3), 545-554.
- Geiser D.M., del Mar Jiménez-Gasco M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.A. O'Donnell K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi* (pp. 473-479): Springer.
- Gennari M.M. & Trevisan M. (2008). *Agrofarmaci - Conoscenze per un uso sostenibile*: Gruppo Perdisa Editore, Bologna.
- Giannini M., Tonti S., Prodi A., Innocenti G., Nipoti P., Pisi A. (2013). *Evaluation scale of Fusarium Head Blight symptoms in barley*. Paper presented at the XIX Convegno Nazionale SIPaV, Padova.
- Gil-Serna J., Mateo E.M., González-Jaén M.T., Jiménez M., Vázquez C., Patiño B. (2013). Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: an integrated approach. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(2), 372-380.
- Gilbert J., Tekauz A., Kaethler R., McCallum B., Mueller E., Kromer U. (1999). Survey of *Fusarium* Head Blight in spring wheat in Manitoba. *Canadian Plant Disease Survey*, 91.
- Gjertsen P. (1967). Gushing in beer: its nature, cause and prevention. *Brew. Dig*, 42(5), 80.

- Goswami R.S. & Kistler H.C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular plant pathology*, 5(6), 515-525.
- Greenhalgh R., Levandier D., Adams W., Miller J.D., Blackwell B.A., McAlees A.J., Taylor A. (1986). Production and characterization of deoxynivalenol and other secondary metabolites of *Fusarium culmorum* (CMI 14764, HLX 1503). *Journal of agricultural and food chemistry*, 34(1), 98-102.
- Harlan J.R. (1995). *Barley. Hordeum vulgare (Gramineae-Triticinae)*. Harlow, UK: Longman Scientific and Technical.
- Hawksworth D.L. & Pitt J.I. (1983). A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. *Australian Journal of Botany*, 31(1), 51-61.
- Hollaway G.J., Evans M.L., Wallwork H., Dyson C.B., McKay A.C. (2013). Yield loss in cereals, caused by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, is related to fungal DNA in soil prior to planting, rainfall, and cereal type. *Plant disease*, 97(7), 977-982.
- Imathiu S.M., Edwards S.G., Ray R.V., Back M. (2013). *Fusarium langsethiae* - a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention. *Journal of Phytopathology*, 161(1), 1-10.
- Infantino A., Santori A., Aureli G., Belocchi A., De Felice S., Tizzani L., Lattanzio V.M.T., Haidukowski M., Pascale M. (2015). Occurrence of *Fusarium langsethiae* Strains Isolated from Durum Wheat in Italy. *Journal of Phytopathology*, 163(7-8), 612-619.
- 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(10), 894-902.
- Joffe A.Z. (1971). Alimentary toxic aleukia. *Microbiol toxins*, 7, 139-189.
- Josephs R, D., Derbyshire M., Stroka J., Emons H., Anklam E. (2004). Trichothecenes: reference materials and method validation. *Toxicology letters*, 153(1), 123-132.
- Kerényi Z., Moretti A., Waalwijk, C., Oláh B., Hornok L. (2004). Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4419-4423.
- Khan M.R. & Doohan F.M. (2009). Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain. *Biological Control*, 48(1), 42-47.
- Khan M.R., Fischer S., Egan D., Doohan F.M. (2006). Biological control of *Fusarium* seedling blight disease of wheat and barley. *Phytopathology*, 96(4), 386-394.
- Koch P. (2004). State of the art of trichothecenes analysis. *Toxicology letters*, 153(1), 109-112.
- Kosiak B., Torp M., Skjerve E., Thrane U. (2003). The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. *Acta Agric Scand (B)*, 53(4), 168-176.
- Kuiper-Goodman T., Scott PeM., Watanabe H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 7(3), 253-306.
- Kumar A., Karre S., Dhokane D., Kage U., Hukkeri S., Kushalappa A.C. (2015). Real-time quantitative PCR based method for the quantification of fungal biomass to discriminate

- quantitative resistance in barley and wheat genotypes to fusarium head blight. *Journal of Cereal Science*, 64, 16-22.
- Leslie J.F. & Summerell B.A. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (Vol. 2): Blackwell.
- Lewandowski S.M., Bushnell W.R., Evans C.K. (2006). Distribution of mycelial colonies and lesions in field-grown barley inoculated with *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 96(6), 567-581.
- Liddell C.M. (1991). Recent advances in *Fusarium* systematics. *Phytopathology*, 81(9), 1044-1067.
- Linkmeyer A., Hofer K., Rychlik M., Herz M., Hausladen H., Hückelhoven R., Hess M. (2015). The influence of inoculum and climatic factors on the severity of *Fusarium* head blight in German spring and winter barley. *Food Additives & Contaminants: Part A*, null-null. doi: 10.1080/19440049.2015.1133932.
- Lodhi M. A., Ye G.-N., Weeden N.F., Reisch B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13.
- Logrieco A., Moretti A., Perrone G., Mulè G. (2007). Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. *International journal of food microbiology*, 119(1), 11-16.
- Maier F.J., Miedaner T., Hadelers B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H., Schaefer W. (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular plant pathology*, 7(6), 449-461.
- Malalasekera R.A.P., Sanderson F.R., Colhoun J. (1973). *Fusarium* diseases of cereals: IX. Penetration and invasion of wheat seedlings by *Fusarium culmorum* and *F. nivale*. *Transactions of the British Mycological Society*, 60(3), 453-IN457.
- Marasas W.F.O., Nelson P.E., Toussoun T.A. (1984). *Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology*: Pennsylvania State University.
- Marchant R. (1966 a). Fine structure and spore germination in *Fusarium culmorum*. *Annals of Botany*, 30(3), 441-445.
- Marchant R. (1966 b). Wall structure and spore germination in *Fusarium culmorum*. *Annals of Botany*, 30(4), 821-830.
- Marchant R. & White M.F. (1966). Spore swelling and germination in *Fusarium culmorum*. *Microbiology*, 42(2), 237-244.
- Massart F., Meucci V., Saggese G., & Soldani G. (2008). High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *The Journal of pediatrics*, 152(5), 690-695. e691.
- McCallum B., Tekauz A., Gilbert J., Mueller E., Kaethler R., Stulzer M., Kromer U. (1999). *Fusarium* head blight of barley in Manitoba in 1998. *Can. Plant Dis. Surv.*, 79, 84-85.
- McMullen M., Bergstrom G., De Wolf E., Dill-Macky R., Hershman D., Shaner G., Van Sanford D. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant disease*, 96(12), 1712-1728.

- McMullen, Marcia, Jones, Roger, Gallenberg, Dale. (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant disease*, 81(12), 1340-1348.
- Meriggi P. & Pradolesi G.F. (2006). La gestione della fusariosi della spiga e del rischio micotossine. *Agronomica*, 2, 4-6.
- Miedaner T., Schilling A.G., Geiger H.H. (2001). Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. *Journal of Phytopathology*, 149(11-12), 641-648.
- Miedaner T., Cumagun C.J.R., Chakraborty S. (2008). Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 156(3), 129-139.
- Miller D.J. & Arnison P.G. (1986). Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8(2), 147-150.
- MiPAAF. (2013). *Dati statistici sulla produzione e superfici coltivate a mais e orzo*.
- Mishra P.K., Fox R.T.V., Culham A. (2003). Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology*, 143(3), 291-301.
- Moretti A. (2009). Taxonomy of *Fusarium* genus: a continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*(117), 7-13.
- Moretti A., Logrieco A., Visconti A., & Bottalico A. (2004). An Overview of Mycotoxins and Toxigenic Fungi in Italy. In Logrieco A. & Visconti A. (Eds.), *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe* (pp. 141-184). Moretti A., Panzarini G., Somma S., Campagna C., Ravaglia S., Logrieco A., & Solfrizzo M. (2014). Systemic growth of *F. graminearum* in wheat plants and related accumulation of deoxynivalenol. *Toxins*, 6(4), 1308-1324.
- Morooka N., Uratsuji N., Yoshizawa T., Yamamoto H. (1972). Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp. *Food Hyg Soc Jap J*.
- Mudge A.M., Dill-Macky R., Dong Y., Gardiner D.M., White R.G., Manner, J.M. (2006). A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(1), 73-85.
- Nicholson P., Jenkinson P., Rezanoor H.N., Parry D.W. (1993). Restriction fragment length polymorphism analysis of variation in *Fusarium* species causing ear blight of cereals. *Plant Pathology*, 42(6), 905-914.
- 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(1), 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. *International journal of food microbiology*, 179, 38-49.

- Nielsen L.K., Jensen J.D., Nielsen G.C., Jensen J.E., Spliid N.H., Thomsen I.K., Justesen A.F., Collinge D.B., Jørgensen L.N. (2011). Fusarium head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology*, 101(8), 960-969.
- Nielsen L.K., Justesen A.F., Jensen J.D., Jørgensen L.N. (2013). *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* in seed samples of Danish small grain cereals. *Crop Protection*, 43, 192-200.
- O'Donnell K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 919-938.
- Obanor F., Erginbas-Orakci G., Tunali B., Nicol J.M., Chakraborty S. (2010). *Fusarium culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis. *Fungal biology*, 114(9), 753-765.
- Obanor F., Neate S., Simpfendorfer S., Sabburg R., Wilson P., Chakraborty S. (2013). *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum* caused the 2010 head blight epidemics in Australia. *Plant Pathology*, 62(1), 79-91.
- Oliveira P.M., Mauch A., Jacob F., Waters D.M., Arendt E.K. (2012). Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. *International journal of food microbiology*, 156(1), 32-43.
- Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Seo E.A., Oh H., Shin M.K., Kim T.H., Kwon T.O., Chung H.T. (2003). Induction of apoptosis by 4-acetyl-12, 13-epoxyl-9-trichothecene-3, 15-diol from *Isaria japonica* Yasuda through intracellular reactive oxygen species formation and caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology in vitro*, 17(1), 49-57.
- 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(2), 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 & Contaminants: Part A*, 29(10), 1543-1555.
- Parry D.W., Bayles R.A., Priestley R.H. (1984). Resistance of winter wheat varieties to ear blight (*Fusarium culmorum*). *Journal of the National Institute of Agricultural Botany*.
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology*, 44(2), 207-238.
- Parry D.W. & Nicholson P. (1996). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*, 45(2), 383-391.
- Paulitz T.C., Smiley R.W., Cook R.J. (2002). Insights into the prevalence and management of soilborne cereal pathogens under direct seeding in the Pacific Northwest, USA. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(4), 416-428.
- Pestka J.J. & Smolinski A.T. (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 8(1), 39-69.
- Petti C., Khan M., Doohan F. (2010). Lipid transfer proteins and protease inhibitors as key factors in the priming of barley responses to *Fusarium* head blight disease by a biocontrol strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Functional & integrative genomics*, 10(4), 619-627.

- Petti C., Reiber K., Ali S.S., Berney M., Doohan F.M. (2012). Auxin as a player in the biocontrol of Fusarium head blight disease of barley and its potential as a disease control agent. *BMC plant biology*, 12(1), 1.
- Pettitt T.R., Parry D.W., Summerell B.A., Backhouse J.F., Bryden D., Burgess L.W. (2001). *Effect of temperature on Fusarium foot rot of wheat*
Paper presented at the Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium.
- 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.
- Prom L.K., Horsley R.D., Steffenson B.J., Schwarz P.B. (1999). Development of Fusarium head blight and accumulation of deoxynivalenol in barley sampled at different growth stages. *Journal of the American Society of brewing chemists*, 57(2), 60-63.
- Prom L.K., Steffenson B.J., Salas B., Fetch Jr T.G., Casper H.H. (1996). *Evaluation of selected barley accessions for resistance to Fusarium head blight and deoxynivalenol concentration*. Paper presented at the Proc. of the V Int. Oat Conf. & VII Int. Barley Symp. Univ. of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.
- Qu B., Li H.P., Zhang J.B., Xu Y.B., Huang T., Wu A.B., Zhao C.S., Carter J., Nicholson P., Liao Y.C. (2008). Geographic distribution and genetic diversity of Fusarium graminearum and F. asiaticum on wheat spikes throughout China. *Plant Pathology*, 57(1), 15-24.
- Rahjoo V., Zad J., Javan-Nikkhah M., Gohari A.M., Okhovvat S.M., Bihamta M.R., Razzaghian J., Klemsdal S.S. (2008). Morphological and molecular identification of Fusarium isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 463-468.
- Reyneri A., Blandino V., Alvisi G., Moretti A., Ponti D., Cristiani C., Somma S. (2013). Proteggere il grano duro dalle "Nuove" micotossine L' *Informatore Agrario, supplemento 08/2013 Cereali Difesa e Nutrizione* (pp. 22-24.).
- Salas B., Steffenson B.J., Casper H.H., Tacke B., Prom L.K., Fetch Jr T.G., Schwarz P.B. (1999). Fusarium species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant disease*, 83(7), 667-674.
- Samson R.A., Hockstra E.S., Frisvad J.C., Filtenburg D. (1995). Introduction to food borne fungi. central bureau. *Voor schimmel culture, Baarn Delft. Printed by Ponsen and Looyen. Wagening, the Netherlands.*
- Sarlin T. (2012). *Detection and characterisation of Fusarium hydrophobins inducing gushing in beer*: VTT Technical Research Centre of Finland.
- Sarlin T., Nakari-Setälä T., Linder M., Penttilä M., Haikara A. (2005). Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(2), 105-111.
- Sarlin T., Vilpola A., Kotaviita E., Olkku J., Haikara A. (2007). Fungal Hydrophobins in the Barley-to-Beer Chain. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(2), 147-153.
- Sarver B.A.J., Ward T.J., Gale L.R., Broz K., Kistler H.C., Aoki T., Nicholson P., Carter J., O'Donnell K. (2011). Novel Fusarium head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology*, 48(12), 1096-1107.

- Scherm B., Balmas V., Spanu F., Pani G., Delogu G., Pasquali M., Migheli Q. (2013). *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular plant pathology*, 14(4), 323-341.
- Scholz U. & Steffenson B.J. (2001). *Effect of Gibberella zeae ascospores and Fusarium graminearum conidia on Fusarium Head Blight severity and Deoxynivalenol production in barley*. Paper presented at the 2001 National Fusarium Head Blight Forum Proceedings.
- Schroeder H.W. & Christensen J, J. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53(7, 1), 831-838.
- Schwarz P.B. (2003). Impact of Fusarium head blight on malting and brewing quality of barley. In Leonard K.J. & Bushnell W.R. (Eds.), *Fusarium head blight of wheat and barley* (pp. 395-419).
- Schwarz P.B., Casper H.H., Beattie S. (1995). Fate and development of naturally occurring Fusarium mycotoxins during malting and brewing. *American Society of Brewing Chemists (USA)*.
- Schwarz P.B., Schwarz J.G., Zhou A., Prom L.K., Steffenson B.J. (2001). Effect of *Fusarium graminearum* and *F. poae* infection on barley and malt quality. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 54(3-4), 55-63.
- Shewry P.R. (1992). *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*: CAB International.
- Singleton L.L., Mihail J., Rush C.M. (1992). *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*: American Phytopathological Society.
- Smiley R.W. & Patterson L.M. (1996). Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest. *Plant disease*, 80(8), 944-949.
- Smith J.E., & Henderson R. (1991). *Mycotoxins and animal foods*: CRC press.
- Smith J.E., & Solomons G.L. (1994). Mycotoxins in human nutrition and health. *EUR (16048 EN)*.
- Stack R.W. (1989). A comparison of the inoculum potential of ascospores and conidia of *Gibberella zeae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11(2), 137-142.
- Stack R.W. (2000). Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. *APSnet Plant Health Reviews*.
- Steffenson B.J. (2003). *Fusarium* head blight of barley: impact, epidemics, management, and strategies for identifying and utilizing genetic resistance. In Bushnell W.R. Leonard K.J. (Ed.), *Fusarium head blight of wheat and barley* (pp. 241-295).
- Stenglein S.A. (2009). *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology*, 25-36.
- Stephens A.E., Gardiner D.M., White R.G., Munn A.L., Manners J.M. (2008). Phases of infection and gene expression of *Fusarium graminearum* during crown rot disease of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1571-1581.
- 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(2), 193-199.

- Strausbaugh C.A., Bradley C.A., Koehn A.C., Forster R.L. (2004). Survey of root diseases of wheat and barley in southeastern Idaho. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26(2), 167-176.
- Strunnikova O.K., Shakhnasarova V.Y., Vishnevskaya N.A. . (2000). Influence of different soil conditions on *Fusarium culmorum*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Landind-Forstwirtschaft*, 377: 76.
- Sudakin D.L. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology letters*, 143(2), 97-107.
- Suga H., Karugia G.W., Ward T., Gale L.R., Tomimura K., Nakajima T., Miyasaka A., Koizumi S., Kageyama K., Hyakumachi, M. (2008). Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology*, 98(2), 159-166.
- Summerell B.A., Salleh B., Leslie J.F. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant disease*, 87(2), 117-128.
- Sutton J.C. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4(2), 195-209.
- Tatsuno T., Saito M., Enomoto M., Tsunoda H. (1968). Nivalenol, a toxic principle of *Fusarium nivale*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 16, 2519-2520.
- Tekauz A. & McCallum B. (1998). *Fusarium head blight, Fusarium species and mycotoxins in adapted and exotic barleys grown in Manitoba Canada*. Paper presented at the Proceedings of the 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland.
- Tekauz A. & McCallum B. (1999). Varietal response in barley to fusarium head blight. *Can. J. Plant Pathol*, 21, 205-206.
- Tekauz A., McCallum B., Gilbert, J. (2000). Review: *Fusarium* head blight of barley in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(1), 9-16.
- Toth B., Mesterhazy A., Nicholson P., Teren J., Varga J. (2004). Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum* *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi* (pp. 587-599): Springer.
- Ueno Y. (1980). Trichothecene mycotoxins mycology, chemistry, and toxicology *Advances in nutritional research* (pp. 301-353): Springer.
- Urry W.H., Wehrmeister H.L., Hodge E.B., Hidy P.H. (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 7(27), 3109-3114.
- Vaag P., Riis P., Knudsen A.D., Pedersen S., Meiling E. (1993). *A simple and rapid test for gushing tendency in brewing materials*. Paper presented at the Proceedings of the European Brewery Convention Congress, IRL Press, Oxford, UK.
- Vesonder R.F., Ciegler A., Jensen A.H. (1973). Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Applied microbiology*, 26(6), 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(2), 265-276.

- Wagacha J.M. & Muthomi J.W. (2007). Fusarium culmorum: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26(7), 877-885.
- Wang H., Hwang S.F., Eudes F., Chang K.F., Howard R.J., Turnbull G.D. (2006). Trichothecenes and aggressiveness of Fusarium graminearum causing seedling blight and root rot in cereals. *Plant Pathology*, 55(2), 224-230.
- Watanabe M., Yonezawa T., Lee K., Kumagai S., Sugita-Konishi Y., Goto K., Hara-Kudo Y. (2011). Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the Fusarium genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 322.
- Watanabe T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi; Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species (pp. 486). Raton, FL, USA: Boca Raton, USA: CRC Press.
- Wessels J.G.H. (1996). Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends in plant science*, 1(1), 9-15.
- Windels C.E. (2000). Economic and social impacts of Fusarium head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 90(1), 17-21.
- Winter M., Koopmann B., Döll K., Karlovsky P., Kropf U., Schlüter K., von Tiedemann A. (2013). Mechanisms regulating grain contamination with trichothecenes translocated from the stem base of wheat (Triticum aestivum) infected with Fusarium culmorum. *Phytopathology*, 103(7), 682-689.
- 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. (2008). Relationship between the fungal complex causing Fusarium head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*, 98(1), 69-78.
- Xu X. (2003). Effects of environmental conditions on the development of Fusarium ear blight. *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 683-689.
- Xue A.G., Butler G., Voldeng H.D., Fedak G., Savard M.E. (2006). Comparison of the influence of inoculum sources on the development of fusarium head blight and the deoxynivalenol content in spring wheat in a disease nursery. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28(1), 152-159.
- Yang G.-H., Jarvis B.B., Chung Y.J., Pestka J.J. (2000). Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicology and applied pharmacology*, 164(2), 149-160.
- Yli-Mattila T. (2010). Ecology and evolution of toxigenic Fusarium species in cereals in northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 7-18.
- Yoshida M., Kawada N., Nakajima T. (2007). Effect of infection timing on Fusarium head blight and mycotoxin accumulation in open-and closed-flowering barley. *Phytopathology*, 97(9), 1054-1062.
- Yoshida M., Kawada N., Tohnooka T. (2005). Effect of row type, flowering type and several other spike characters on resistance to Fusarium head blight in barley. *Euphytica*, 141(3), 217-227.

- Yoshida M., Nakajima T., Arai M., Suzuki F., Tomimura K. (2008). Effect of the timing of fungicide application on Fusarium head blight and mycotoxin accumulation in closed-flowering barley. *Plant disease*, 92(8), 1164-1170.
- Yu G.T., Horsley R.D., Zhang B., Franckowiak J.D. (2010). A new semi-dwarfing gene identified by molecular mapping of quantitative trait loci in barley. *Theoretical and applied genetics*, 120(4), 853-861.
- Zhu H., Briceno G., Dovel R., Hayes P.M., Liu B.H., Liu C.T., Ullrich S.E. (1999). Molecular breeding for grain yield in barley: an evaluation of QTL effects in a spring barley cross. *Theoretical and applied genetics*, 98(5), 772-779.
- Zohary D., Hopf M., Weiss E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*: Oxford University Press on Demand.
- Zöllner P. & Mayer-Helm B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 123-169.

RINGRAZIAMENTI

Prima di tutti ringrazio chi ha reso possibile la realizzazione di questo percorso: Prof. Pancaldi, Dott.ssa Innocenti, l'inesauribile Paola ed Antonio. Ringrazio Dima, Barbara, Stefano, Francesco, Martina, Federico, per il loro supporto, aiuto ed i loro consigli. Grazie alla Dott.ssa Nadia Faccini del CREA GPG di Fiorenzuola d'Arda (PC) che, con la sua ampia competenza nel settore, mi ha dato dei validi consigli.

Ringrazio i miei colleghi del CREA SCS che mi hanno supportata e, perché no, sopportata nei momenti difficili. Ringrazio Alessandra che per prima mi ha spronata ad affrontare questo strada. Ringrazio chi ha vissuto assieme a me la quotidianità in quest'ultimi anni.

Ringrazio tutti i ragazzi del gruppo di virologia con i quali abbiamo condiviso ufficio e laboratori rendendoli ambienti migliori. Ringrazio Stefano Borsari e Lisetta.

Grazie di cuore a tutti voi.