

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali – Sezione Patologia

Tesi di Laurea Triennale in Scienze e Tecnologie Agrarie

**Possibilità di controllo della contaminazione da micotossine nel
mais attraverso la selezione varietale**

Relatore: Prof. Roberto Causin
Correlatore: Dott. Massimiliano Mondin

Laureando: Stefano Zanon
Matricola: 502673

Anno Accademico 2015/2016

*A Massimiliano per l'indispensabile
consulenza tecnica e a Manuele per
l'altrettanto prezioso supporto
informatico*

INDICE

Riassunto.....	1
Abstract.....	3
1. Introduzione.....	5
1.1. Cosa sono le micotossine.....	5
1.2. I differenti tipi di micotossine.....	6
1.2.1. Le fumonisine.....	7
1.2.2. I tricoteceni.....	9
1.2.3. Lo zearalenone.....	13
1.2.4. Le aflatossine.....	15
1.2.5. Le ocratossine.....	18
1.3. Gli aspetti tossicologici.....	20
1.3.1. Le fumonisine	20
1.3.2. I tricoteceni.....	23
1.3.3. Lo zearalenone	26
1.3.4. Le aflatossine.....	28
1.3.5. Le ocratossine.....	29
1.4. Le tossine emergenti.....	31
1.4.1. La moniliformina.....	31
1.4.2. La beauvericina.....	35
1.4.3. Le enniatine.....	37
1.4.4. Il fusarenone-X.....	39
1.4.5. Il nivalenolo.....	40
1.4.6. La fusaproliferina.....	41

1.4.7. L'acido fusarico.....	42
1.4.8. Il diacetossiscirpenolo.....	44
1.4.9. Lo scirpentriolo.....	45
1.4.10. Il neosolaniolo.....	45
1.4.11. Altre micotossine secondarie.....	46
1.5. I funghi micotossigeni.....	48
1.5.1. Il Genere <i>Fusarium</i>	48
1.5.1.1. I principali agenti del Marciume Rosa.....	50
1.5.1.2. I principali agenti del Marciume Rosso.....	56
1.5.1.3. Funghi di minor frequenza nella Pianura Padana.....	63
1.5.2. Il Genere <i>Aspergillus</i>	67
1.5.2.1. <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	69
1.5.2.2. <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus niger</i>	73
1.5.3. Il Genere <i>Penicillium</i>	74
1.5.3.1. <i>Penicillium verrucosum</i>	74
1.6. I fattori che influenzano la sintesi di micotossine.....	76
1.7. Gestione della contaminazione da parte dei funghi micotossigeni.....	78
1.7.1. Le pratiche agronomiche.....	78
1.7.2. La lotta chimica.....	84
1.7.3. La lotta biologica	84
1.7.4. La scelta varietale.....	89
1.7.5. L'utilizzo di piante geneticamente modificate.....	90
2. Materiali e metodi.....	94
2.1. Organizzazione delle prove sperimentali.....	94

2.2. Raccolta e processazione dei campioni.....	96
2.3. Indagini micologiche e chimiche di laboratorio.....	96
2.4. Elaborazioni statistiche.....	98
3. Risultati.....	99
3.1. Risultati della Prova di Campo 1	99
3.2. Risultati della Prova di Campo 2	121
3.3. Risultati della Prova di Campo 3	123
4. Discussioni e conclusioni	126
Allegato 1.....	130
Allegato 2.....	137
Bibliografia.....	138
Sitografia.....	169

ABBREVIAZIONI TECNICHE

AFB₁ = Aflatossina B₁

AFB₂ = Aflatossina B₂

AFG₁ = Aflatossina G₁

AFG₂ = Aflatossina G₂

AFM₁ = Aflatossina M₁

AFM₂ = Aflatossina M₂

AFs = Aflatossine

AUR = Aurofusarina

BEA = Beauvericina

BIK = Bikaverina

BUT = Butelonide

CIT = Citrina

CULM = Culmorina

DAS = Diacetossiscirpenolo

DON = Deossinivalenolo

ENs = Enniatine

EQU = Equisetina

ET = Tossine Emergenti

FA = Acido Fusarico

FB₁ = Fumonisina B₁

FB₂ = Fumonisina B₂

FB₃ = Fumonisina B₃

FB₄ = Fumonisina B₄

FUM = Fumonisine

FUP = Fusaproliferina

FUS-X = Fusarenone-X

MON = Moniliformina

NEO = Neosolaniolo

NIV = Nivalenolo

OTA = Ocratossina A

OTB = Ocratossina B

OTC = Ocratossina C

OTs = Ocratossine

PAT = Patulina

SCT = Scirpentriolo

TRI = Tricoteceni

ZEA = Zearalenone

Riassunto

Ci sono diversi generi fungini tossigeni, quali *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, che attraverso il loro metabolismo secondario sintetizzano metaboliti tossici per l'uomo e per gli animali e la pianta di *Zea mays* è una delle colture maggiormente interessate dalla contaminazione di questi composti tossici.

L'accumulo di queste micotossine all'interno della pianta di mais arriva, nei casi più gravi, a causare la morte di molti individui animali alimentati con mangimi contaminati e ad indurre patologie di carattere acuto e cronico, anche di larga diffusione, tra la specie umana.

Per questo motivo, risulta di vitale importanza, mettere in campo delle strategie atte a controllare le contaminazioni che questi funghi patogeni sono in grado di originare sia nel campo che in post-raccolta (come lo stoccaggio in primis).

I composti che richiamano maggiore attenzione per la loro tossicità e massiccia presenza all'interno delle cariossidi sono le fumonisine, i tricoteceni e lo zearalenone per il genere *Fusarium*, le aflatossine e le ocratossine per il genere *Aspergillus* e le sole ocratossine invece per i funghi del genere *Penicillium*. Per questo motivo sono allo studio diversi metodi d'intervento per arginare le contaminazioni; questi metodi includono la gestione dei sistemi agricoli e la relativa applicazione delle Buone Pratiche Agricole (BPA), la lotta chimica, la lotta biologica, l'impiego di piante geneticamente modificate (anche se in Italia la legislazione attualmente non lo permette, questa strada in altri Paesi è fortemente seguita) ed infine la selezione di varietà resistenti. Proprio su quest'ultimo aspetto si focalizza il lavoro svolto, che ha come obiettivo, quello di saggiare la resistenza delle piante di *Zea mays*, indotta attraverso la selezione varietale.

Sono stati testati otto ibridi (due replicazioni per ogni ibrido) di *Z. mays*.

Questi campioni sono stati suddivisi in diverse parcelle e campi prova dislocati in diverse località site in cinque province italiane in Lombardia e in Veneto: quali Bergamo, Cremona, Pavia, Rovigo e Verona, per verificarne il comportamento e la risposta ai vari microclimi all'interno delle diverse aree maidicole del Nord Italia.

La prova, attraverso analisi chimiche e micologiche, si è posta l'obiettivo di quantificare la presenza di patogeni appartenenti al genere *Fusarium* (come *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*) e le micotossine come deossinivalenolo (DON) e fumonisine (FUM). Sono state condotte, inoltre, anche analisi visive al fine di definire la severità degli attacchi dei funghi patogeni e, se presenti, anche quelli di piralide.

In aggiunta a questa prova, sono state condotte altre due prove (una in comune di Borsea in provincia di Rovigo ed una in comune di Scorzè in provincia di Venezia) con lo scopo di testare due ibridi precocissimi di 85 giorni ponendoli a confronto con un ibrido di controllo classe FAO 600 di 130 giorni.

I risultati indicano che il miglioramento genetico, con il fine di ottenere ibridi resistenti sotto vari aspetti alla contaminazione da micotossine, è una strada percorribile e che può dare senza dubbi risultati soddisfacenti e che anche l'utilizzo di ibridi precocissimi aiuta a controllare la contaminazione da micotossine.

Abstract

There are many types of fungal genres, like *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*, through their secondary metabolism synthesize metabolites toxic for the human species and for the animals, and the *Zea mays* plant is one of the crops mostly interested from the contamination of these toxic compounds.

The accumulation of these mycotoxins into the maize plant can reach, in the most serious cases, to cause the death of many animals fed with contaminated aliments and to induce acute and chronic character pathologies, also widely spread, among the human species.

For this reason is vital to realize valid strategies with the aim of managing the contaminations that these pathogenic fungi are able to cause in the field and in the post-harvest phase (as the storage firstly).

Compounds that need more attention for their toxicity and their massive presence within the maize kernels are fumonisins, trichotecenes and zearalenone about the *Fusarium* genre, aflatoxins and ochratoxins about the *Aspergillus* genre and the only ochratoxins for the fungi of *Penicillium* genre. For this reason many methods of intervention to contain the contaminations are being studied; these methods include the management of the agricultural systems and its application of Good Agricultural Practices (GAP), chemical control, biological control, the use of genetically modified plants (even if in Italy actually the legislation doesn't permit this, in other Countries it's strongly followed) and in the end the selection of resistant varieties.

In fact, precisely on this aspect, is focused this work and its goal is to test *Zea mays* plants' resistance induced through the varietal selection.

Eight genotypes of *Zea mays* were tested (two replications for every genotype).

These samples were divided in many fields, spread in different places, into five Italian cities in Lombardia and Veneto: Bergamo, Cremona, Pavia, Rovigo and Verona, to verify the behavior and the response to the various microclimates in the different maize growing areas of Nord Italy.

This test, through chemical and mycological analysis, had as aim to quantify the pathogens of the *Fusarium* genre (as *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*) and the relatives mycotoxins such as deossinivalenol (DON) and fumonisins (FUM). Further, visual analysis were conducted with the aim to define the attacks severity of the pathogens fungi, and if present, also the borer insects attacks.

In addition to this test, two more test were conducted (one in Borsea in the province of Rovigo and the last one in Scorzè, in the province of Venice) with the aim to test two precocious genotypes (with a cultural cycle of 85 days) comparing them with a control genotype FAO class 600 with a cultural cycle of 130 days.

The obtained results indicate that the genetic improvement, with the aim to gain resistant genotypes under various aspects to the mycotoxins contamination, is a possible way and it can give, without doubts, good results; as well the use of precocious genotypes helps to manage the mycotoxins contamination.

1. Introduzione

1.1. Cosa sono le micotossine

Le micotossine sono delle sostanze del metabolismo secondario, prodotte da funghi filamentosi o da microfunghi.

Questi metaboliti assumono carattere di tossicità sia per l'uomo che per gli animali. L'etimologia della parola *micotossina* è di origine greca e latina; è ottenuta unendo la parola *mykes* che significa fungo, e la parola di origine latina *toxicum* che significa tossico o veleno, ovvero un composto chimico in grado di apportare e dare origine a danni all'organismo con il quale interagisce.

Queste sostanze possono essere classificate in base alla loro azione che svolgono all'interno dell'organismo ove si trovano, e più precisamente, basandosi sugli organi e/o sistemi biologici che esse vanno ad intaccare; nello specifico esse sono suddivise in (Hsieh, 1987):

- *Immunotossine*: sono in grado di interagire con il sistema immunitario, provocando anomalie e problematiche (anche di grave entità) di vario ordine
- *Dermatossine*: interagiscono con il sistema cutaneo danneggiandolo
- *Epatotossine*: interagiscono con il fegato, portando a disturbi e conseguenti danni più o meno gravi, di carattere acuto o cronico
- *Nefrotossine*: arrecano danni ai reni di natura morfologica e funzionale
- *Neurotossine*: queste tossine agiscono sulle cellule del sistema nervoso di solito interagendo con le proteine della membrana dei neuroni quali ad esempio i canali ionici

Gli effetti che questi metaboliti secondari possono produrre risultano essere di tipo acuto in un numero limitato di casi, oppure, possono assumere carattere di tipo cronico se l'interazione è prolungata nel tempo e vi è un accumulo; in questo caso tali sostanze possono essere classificate in base all'effetto che hanno negli organismi interessati, ovvero:

- *Mutagene*: queste molecole sono in grado di indurre mutazioni genetiche, ossia alterare il patrimonio genetico, il quale a sua volta origina una modificazione della sintesi delle proteine e nei caratteri ereditari di un individuo i quali possono risultare devianti.

- Cancerogene: le tossine appartenenti a questo gruppo sono in grado di provocare l'insorgenza del cancro.
- Teratogene: molecole in grado di produrre malformazioni o mostruosità nell'embrione (Krogh, 1974).

In seguito a tutte queste problematiche che questi composti possono arrecare e alla loro massiccia presenza sia in forma quantitativa, che in forma qualitativa, la pianta di *Zea mays* risulta essere una delle specie maggiormente studiate ed esaminate, data la sensibilità e la suscettibilità che questo vegetale manifesta nei confronti dei funghi patogeni aggressori ed al conseguente accumulo di micotossine. Tra i principali micopatogeni produttori di tossine troviamo i funghi dei Generi *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, ed è proprio contro questi che si concentrano i maggiori sforzi di studio e di ricerca.

L'esigenza di sottoporre questo vegetale ad un così intenso ed approfondito studio nell'ambito micopatologico nasce anche dal fatto che esso rappresenta una delle piante di larghissima diffusione e coltivazione a livello planetario. Moltissimi sono i settori d'impiego dei prodotti di questa coltura, partendo da quello alimentare (sia food che feed), sino al farmaceutico ed all'industriale.

1.2. I differenti tipi di micotossine

Nonostante siano state identificate oltre 2000 micotossine diverse, prodotte da circa 1100 specie di funghi (Turner e Alderidge, 1983; CAST, 2003), soltanto una minima parte di esse (circa il 7%) viene ritrovato negli alimenti (ad indirizzo food e feed), derivanti dalle colture contaminate a livelli sufficientemente elevati da rappresentare un pericolo per la salute umana ed animale.

Di seguito saranno trattati i generi fungini di maggiore diffusione ed interesse e le micotossine che rivestono una severa importanza dal punto di vista quantitativo e qualitativo.

I generi fungini interessati alla produzione di queste tossine sono il Genere *Fusarium*, il Genere *Aspergillus* ed il Genere *Penicillium*.

Le micotossine ad essi associati, che ricoprono i ruoli di maggior rilievo per quanto riguarda la frequente presenza nelle colture e la loro tossicità, sono le seguenti:

- Tossine del Genere *Fusarium*: fumonisine (FUM), tricoteceni (TRI) e zearalenone (ZEA)
- Tossine del Genere *Aspergillus*: aflatossine (AFs) e ocratossine (OTs)
- Tossine del Genere *Penicillium*: ocratossine (OTs)

Successivamente a questi composti saranno trattati anche quelli che attualmente vengono soprannominati come tossine emergenti (ET).

1.2.1 Le Fumonisine

Queste tossine (descritte come solidi amorfi) appartengono alla famiglia delle *Fusarium*-tossine. Sono state isolate per la prima volta in Sud Africa da colture di mais contaminate da *F. verticillioides* (Gelderblom et al., 1988); è infatti in questa specie vegetale che si riscontrano principalmente queste tossine, in quanto la pianta di *Z. mays*, risulta particolarmente sensibile e suscettibile all'attacco di questo patogeno.

Questi composti possono essere prodotti anche da altri funghi del Genere *Fusarium* come ad esempio *F. proliferatum* e altre specie di minore importanza come *F. napiforme*, *F. anthophilum*, *F. dlamini* e *F. nygamai*.

Le FUM sono classificabili all'interno della famiglia dei polichetidi, i quali strutturalmente sono diesteri di acidi tricarbossilici, i quali contengono un gruppo ammino disponibile.

Per questo motivo sono molto simili alle sfingosine che sono presenti in qualità di lipidi cerebrali.

Le fumonisine sintetizzate dal Genere *Fusarium* si possono suddividere in 4 gruppi: FUM del gruppo A, del gruppo B, del gruppo C e del gruppo D. Dei 4 gruppi di FUM prodotti, quello che include al proprio interno le molecole di maggior interesse è il B con le tossine FB₁, FB₂ e FB₃. Questi tre composti sono quelli che, da un punto di vista tossicologico, rivestono un ruolo di maggiore importanza in quanto a tossicità ed a quantità rilevabili nelle commodities derivanti da colture interessate dall'attacco di questo Genere fungino.

Quantitativamente parlando la FB₁ rappresenta il 70-80% sul totale delle FUM sintetizzate in natura (Sweeney e Dobson, 1999), la FB₂ il 15-20% e la FB₃ solo il 3-8% (Rheeder, 2002; Fodor et al., 2006). La molecola delle FUM del gruppo B è composta da una struttura lineare di 20 atomi di carbonio, avente un gruppo amminico in posizione C-2, 2 gruppi metilici in C-12 e C-16 e 2 esteri tricarbossilici in posizione C-14 e C-15 (Alexander et al., 2009). Come si osserva, qui di seguito nella figura 1.1, le tossine FB₁, FB₂, FB₃ e FB₄ differiscono tra di loro per la presenza o meno di gruppi ossidrilici in C-4, C-5 e C-10.

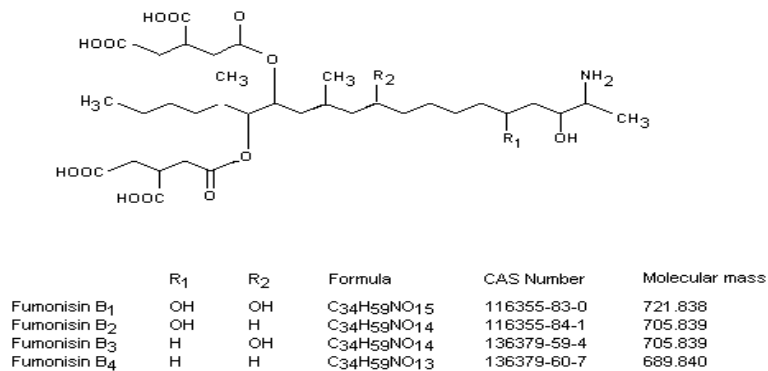


Figure 1. Chemical structures of fumonisins

Figura 1.1. Struttura chimica della molecola delle fumonisine. Fonte: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>

Caratteristica che differenzia le FUM, dalla maggior parte delle altre micotossine, è il fatto di essere idrofiliche, in quanto, trattasi di composti polari; questo significa che essendo molto inclini a solubilizzarsi in acqua, attraverso la molitura umida si possono facilmente eliminare, ottenendo un prodotto con un contenuto in FUM molto basso (CAST, 2003). Diverse prove hanno dimostrato che la lavorazione della granella attraverso la procedura della molitura a secco non è in grado di allontanare in modo ottimale le tossine dal prodotto finale. Le diverse frazioni della molitura come la crusca ed il germe risultano avere un contenuto, in fatto di FUM, superiore rispetto alle altre frazioni. Nonostante queste difficoltà di gestione, è possibile attuare alcune pratiche, come la setacciatura e la pulizia delle cariossidi rotte prima della lavorazione del prodotto le quali possono abbattere la quantità di FUM anche del 70% circa (Sydhenam et al., 1994).

La molecola delle fumonisine possiede una stabilità termica che permette a questi composti di resistere sino a temperature di 100-120°C; grazie a questa peculiarità, queste tossine, sono in grado di resistere ai normali processi di pastorizzazione (62°C per 30 minuti) (Kabak et al., 2009). Temperature maggiori di 190°C per un periodo superiore ai 60 minuti portano ad una degradazione del 60-80% della molecola, mentre temperature di 220°C per un lasso di tempo di 25 minuti sono in grado di dare come risultato la quasi totale degradazione della molecola tossica (Scott e Lawrence, 1994).

I fattori (e le relative interazioni tra di essi) che influenzano l'accumulo di FUM nelle colture in campo sono: la data di semina, gli attacchi parassitari, le condizioni climatiche, la latitudine dell'areale di coltivazione, gli ibridi di mais coltivati (genotipo) e lo stato di salute della coltura (relativo agli stress vissuti dalle piante). L'assenza di fumonisine all'interno delle cariossidi della spiga, nelle prime fasi

di sviluppo, è attribuibile alla composizione chimica delle stesse che non permette di innescare la sintesi dei metaboliti secondari quali le micotossine.

Questo significa che il tasso di accumulo di FB₁ è influenzato dalla fase fenologica della coltura di *Zea mays*; secondo alcuni dati di campo infatti la FB₁ non viene prodotta indicativamente per i primi 15 giorni a partire dal momento dell'impollinazione. La sintetizzazione di FUM inizia, di norma, dopo 30 giorni dall'evento di impollinazione, quando le cariossidi iniziano il processo fisiologico di maturazione cerosa (Warfield e Gilchrist, 1999). Dal momento che le FUM possono essere presenti sia in granello sintomatico che asintomatico, il controllo della presenza di queste tossine ha assunto un ruolo di primaria importanza dal punto di vista della sicurezza alimentare (Brown et al., 2001).

1.2.2. I Tricoteceni

I tricoteceni sono un gruppo di composti prodotti da diversi generi fungini come *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Trichothecium* e *Verticimonosporium* (Heidtmann-Benvenuti et al., 2011). Nel mais, il genere *Fusarium* riveste maggiore importanza, infatti, questi funghi sono degli importanti agenti di fusariosi dei cereali che si sviluppano principalmente in aree temperate aventi temperature relativamente moderate (10-30°C) ed elevata umidità relativa. Questi composti sono ritrovabili principalmente in colture come frumento, orzo, avena, segale e, naturalmente, mais.

Il nome di queste tossine deriva dalla tricotecina, una delle prime molecole identificate da un isolato di *Trichothecium roseum* (Ichinove et al., 1983). I TRI sono molecole polari solubili in solventi organici polari; attualmente sono stati identificati circa 170 composti appartenenti a questa famiglia.

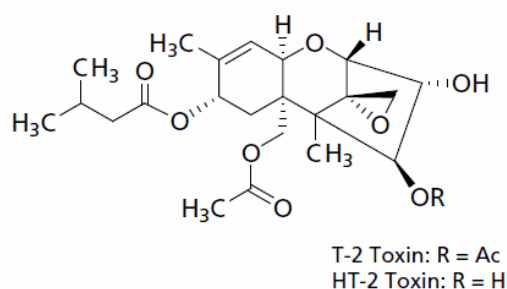


Figura 1.2. Struttura chimica della molecola dei tricoteceni. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/a-new-gc-ms-method.html>

Queste molecole sono tutte caratterizzate da un sistema ad anello tetraciclico sesquiterpenoide 12,13-epossitricotecen-9-ene. Tutti i composti di questa famiglia hanno in comune un nucleo centrale tricyclico detto tricodiene, formato da più anelli cicloesani/tetraidropirani (Foroud e Eudes, 2009), un epossido alle posizioni C12-C13 (Desjardins et al., 1993) e, solitamente, un doppio legame alle posizioni C9-C10, molto importante per la definizione della loro tossicità. La tossicità di queste molecole è conferita dal gruppo epossidico.

I tricoteceni si suddividono in quattro gruppi, i quali vengono identificati con quattro lettere: A, B, C e D. Una prima classificazione può così essere strutturata: i composti appartenenti ai gruppi A e B sono caratterizzati da un legame estere-estere tra le posizioni C4-C15 e sono detti non-macro ciclici, mentre i tricoteceni appartenenti ai gruppi C e D, sono composti definiti macro ciclici in quanto vi è la presenza di un estere macro ciclico. Se si analizzano le differenze che intercorrono tra i quattro gruppi (A, B, C e D), si osserva che i TRI del gruppo A sono caratterizzati dalla presenza di un gruppo chetonico in posizione C8, i composti appartenenti al gruppo B dispongono invece di un gruppo carbonile in posizione C8 (Adejumo et al., 2007). Esaminando la struttura molecolare dei TRI appartenenti ai gruppi C e D si osserva come i composti del primo siano caratterizzati dalla presenza di un gruppo epossidico in posizione C7-C8 (crotocina), o in posizione C9-C10 (bacarina), mentre quelli inclusi nel raggruppamento D contengono un anello macro ciclico in posizione C4-C15 (satratoxina e roridina) (Razzazi-Fazeli et al., 2003; Hussein e Brasel, 2001; Sudakin, 2003).

I tricoteceni non-macro ciclici godono di una diffusione sensibilmente maggiore rispetto ai macro ciclici (Krska, 2001) e per questo motivo, come si vedrà in seguito, sono anche quelli più studiati ed ove si focalizza una grande e sempre crescente attenzione. Della famiglia dei TRI, le tossine di maggior interesse e di maggior rilievo, per la loro generalizzata ed abbondante diffusione, sono la T-2 e la relativa molecola derivata, ovvero la HT-2, ed il DON (deossinivalenolo), rispettivamente racchiusi all'interno dei gruppi A e B.

All'interno del gruppo A, oltre alle già citate molecole T-2 ed HT-2, meritano di essere ricordati anche il neosolaniolo (NEO) ed il diacetossiscirpenolo (DAS), in quanto tossine emergenti; passando invece al gruppo B, insieme al DON meritano attenzione, sempre in merito al fatto che vengono anch'esse incluse all'interno delle tossine emergenti, molecole quali nivalenolo (NIV), fusarenone-x (FUS) e 3-AcDON, 15-AcDON e 3,15-AcDON, che altro non sono dei derivati acetilati del DON.

Tra i TRI, all'interno degli alimenti, i composti maggiormente rilevati sono: T-2, DON ed ultimamente anche DAS, NIV e NEO.

Il deossinivalenolo

Il deossinivalenolo deriva dal tricodiene, un composto non tossico; è sintetizzato essenzialmente da *F. graminearum* e *F. culmorum*; altre specie, anche se di secondaria importanza, produttrici di DON sono *F. crookwellense*, *F. sambucinum* e *F. pseudograminearum* (anche se meno frequentemente) (Vogelgsang et al., 2009).

La maggior sintesi di DON all'interno della granella avviene nel range di temperatura tra i 21 ed i 29,5°C, con umidità maggiore del 20%, meglio se 22-25% (Causin, 2006).

Il deossinivalenolo è facilmente eliminabile durante il processo di produzione dell'amido, tuttavia, permangono dei residui in farine (conseguentemente ritrovabili all'interno di prodotti come pane, snack, prodotti per colazione), fibre e germe.

Un'intensa molitura può abbassare il contenuto di DON sino a rientrare nei limiti dei livelli accettabili (CAST, 2003), mentre all'interno della pasta cotta rimane non più del 25% circa rispetto alla concentrazione iniziale (Visconti et al., 2004).

Il DON è una molecola non volatile a basso peso molecolare (296.32) e potenzia l'azione dello zearalenone. Contiene solitamente due epossidi in posizione C12-C13 ed un doppio legame in posizione C8-C9 (Desjardins et al., 1993). È stato inserito dallo IARC nel 1993 all'interno del gruppo 3.

Con la pulizia della granella si può ridurre la quantità di DON. Il DON ed il NIV sono solubili in solventi polari come ad esempio gli alcoli (Trenholm et al., 1986).

Le tossine T-2 e HT-2

Queste tossine appartengono al gruppo A dei tricoteceni e la molecola T-2 è molto tossica. I principali produttori di T-2 e HT-2 sono *F. langsethiae*, *F. Poae* e *F. sporotrichioides* (quest'ultimo è il maggior produttore). La molecola di queste tossine è caratterizzata da un doppio legame in posizione C9-C10 e da un anello epossidico in posizione C12-C13 (Desjardins et al., 1993). La molecola tossica HT-2 è un derivato deacetilato della tossina T-2; queste sostanze derivano entrambe dalla didecalonecetrina. Nello specifico la molecola T-2 si forma in seguito a reazioni di ossigenazione ed acetilazione.

Esaminando nel dettaglio la molecola T-2, essa possiede un ossigeno in posizione C4 (che è assente nel DON), ed un gruppo isovalerico in posizione C8 (il quale sostituisce il gruppo chetonico del DON)

(Brown et al., 2002). Questo composto risulta essere altamente idrosolubile. In vivo la tossina T-2 viene rapidamente metabolizzata in HT-2 (forma più diffusa negli organismi).

Nel 1974 Ellison e Katsonis incubarono la T-2 in vitro in un liquido omogeneizzato di fegato umano ed uno di fegato bovino; si osservò la metabolizzazione della tossina HT-2. La lavorazione della granella può avere effetto positivo da un lato, in quanto è in grado di portare ad una sensibile diminuzione della tossina, e dall'altro, un effetto negativo in quanto può causare un aumento della concentrazione della stessa negli scarti della lavorazione destinati comunque all'alimentazione umana (Van der Fels-Klerx e Stratakov, 2010).

Per ragioni climatiche i funghi maggiori produttori di queste tossine sono principalmente concentrati negli areali del Nord Europa e del Regno Unito (Divon et al., 2012). Colpiscono in maniera massiccia le colture del Nord Italia (ed in particolare colture poco diffuse come avena ed orzo). Il fatto comunque che, ad oggi, questi composti non abbiano ancora raggiunto livelli di grande emergenza, non costituisce una giustificazione per abbassare la guardia inerente queste micotossine.

La contaminazione da parte di T-2 ed HT-2 è plurifattoriale, ovvero dipende da un insieme di diversi fattori correlati tra di essi, che possono essere così riassunti:

Primo fattore: capacità competitiva tra diverse specie di *Fusarium* (Barrier-Guillot, 2008). La correlazione ed i rapporti di interazione tra i diversi *Fusarium* produttori di TRI-A e TRI-B (l'ospite ed i fattori ambientali) originano il patosistema. Ricopre una certa importanza anche la competizione intra ed inter-specifica tra i patogeni (es. *Fusarium-Fusarium* o *Fusarium-Aspergillus*) (Wagacha et al., 2012). Nei nostri areali, all'interno dei patosistemi, le specie che producono TRI-B e FUM surclassano le specie produttrici di TRI-A, mentre nei paesi del Nord Europa (areale dove è molto diffuso *F. langsethiae*) questa situazione assume una direzione opposta, ovvero i *Fusarium* produttori di TRI-A riescono a sopraffare i *Fusarium* che sintetizzano TRI-B (Nielsen et al., 2011).

Secondo fattore: tipo di coltura. Molto importante è la successione colturale, in quanto la successione a cereali a granella piccola (quali frumento, orzo, segale e avena) origina accumuli di tossina di maggiore entità rispetto alla successione a mais o altre colture (Barrier-Guillot, 2008; Van der Fels-Klerx e Stratakov, 2010), in quanto il mais è uno dei principali ospiti dei *Fusarium* produttori di TRI-A).

Le lavorazioni post raccolta, di pulizia e cernita della granella, possono aiutare a ridurre il contenuto di T-2 e HT-2 dal 70 al 95%, in particolar modo in partite aventi un'alta concentrazione di tossina

(Pettersson, 2009). Le cariossidi che appaiono di un colore più chiaro e sbiancato hanno un contenuto di tossina sino a 10 volte superiore rispetto alle cariossidi che riportano un aspetto, dal punto di vista del colore, “normale” (Hietaniemi, 2009). Grazie a questa peculiarità è possibile effettuare operazioni di cernita e pulizia tramite strumenti ottici che permettono di ottenere anche dei buoni risultati. Gli alimenti che rientrano nel filone alimentare feed (indirizzato agli animali), detengono una concentrazione di questi composti tossici superiore all'alimentare food, con destinazione umana. Essendo le tossine T-2 ed HT-2 altamente idrosolubili, attraverso la molitura ad umido è possibile rimuovere sino ai due terzi delle molecole tossiche, le quali saranno dislocate nelle acque di lavorazione di scarto e nel germe (Patey, 1989).

Data la scarsità di dati scientifici ed informazioni al riguardo, per i composti T-2 ed HT-2, non sono ancora stati fissati dei limiti massimi da un punto di vista normativo anche se è accertata la loro tossicità e pericolosità. La dose giornaliera tollerabile (ADI= Acceptable Daily Intake), della somma tra T-2 ed HT-2, è stata fissata a 0,06 µg/kg (di peso corporeo). Nonostante non siano ancora stati definiti dei limiti ben precisi, l'UE ha sottoposto queste tossine a raccomandazioni, in attesa di emanare una normativa in merito. Questi composti sono stati classificati all'interno del gruppo 3 dello IARC come sostanze non classificabili in relazione alla cancerogenicità per l'uomo (JECFA, 2002).

1.2.3. Lo zearalenone

Questa tossina appartiene alla famiglia dei composti fenolici e conta circa una dozzina di metaboliti appartenenti alla stessa famiglia; possiede una limitata tossicità acuta per l'uomo e per gli animali. E' prodotta da funghi del genere *Fusarium* quali *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. cerealis*, *F. heterosporum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum* e *F. oxysporum* (questi ultimi tre patogeni sono anche i produttori primari).

Da un punto di vista chimico lo ZEA è il lattone dell'acido resorcilico. Da questa molecola, in seguito alle reazioni metaboliche che avvengono nel fegato, derivano due metaboliti come α -ZOL (α -zearalenolo) e β -ZOL (β -zearalenolo), i quali sono due isomeri della molecola di partenza (Bottalico, 1998); il rapporto tra i due metaboliti varia da specie a specie. L' α -ZOL è il metabolita che possiede maggiore attività estrogena, anche se entrambi sono in grado di causare alterazione nei profili riproduttivi (Arukwe et al., 1999; Smith et al., 1995; Sprosen e Towers, 1995). L'azione dello ZEA è potenziata dal deossinivalenolo. Questo composto possiede spiccati effetti estrogenici. Grazie alla

rapida biotrasformazione ed escrezione dello ZEA negli animali, la sua presenza, e quindi ingestione, tramite carne e derivati animali può essere trascurata. Vi è un modesto trasferimento nel latte vaccino, mentre non si verifica nessun fenomeno di carry-over per quanto riguarda le uova; per questo motivo la sua principale assunzione è da considerarsi ad opera dei cereali e loro derivati. L' α -ZOL ed il β -ZOL sono stati ritrovati, in elevate concentrazioni, in colture contaminate da *Fusarium* e molti altri prodotti alimentari di origine vegetale (Bottalico, 1998; Kuiper-Goodman et al., 1987; Muller et al., 1998; Scudamore e Patel, 2000).

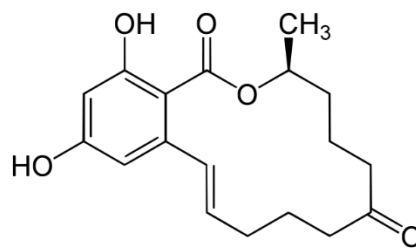


Figura 1.3. Struttura chimica della molecola di zearalenone. Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Zearalenone#/media/File:Zearalenone.svg>

Le condizioni ideali alla biosintesi dello zearalenone sono l'umidità della granella che si deve attestare intorno al 20-22%, l'alternanza tra temperature diurne di 22-25°C e notturne di 12-15°C. I funghi patogeni responsabili della produzione di ZEA possono iniziare la loro attività tossigena nelle colture in campo e proseguire durante la raccolta e la conservazione purché si verifichino le condizioni sopra riportate. Il mais è un cereale particolarmente interessato dai funghi patogeni che attuano la biosintesi dello zearalenone.

La JECFA ha dichiarato che la dose giornaliera tollerabile per quanto riguarda la somma di ZEA, α -ZOL e β -ZOL è di 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo, calcolato su base di livello di sicurezza pari a 200 ed un "No observed effect level, NOEL" di 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo/day (questi indici sono stati ottenuti con ricerche e calcoli effettuati su suini, in quanto specie maggiormente sensibile). Lo zearalenone è stato inserito dallo IARC all'interno del gruppo 3 (IARC, 1993).

1.2.4. Le aflatossine

Le aflatossine sono dei composti bisfuranocumarinici (all'aspetto appaiono come sostanze cristalline), molecole dalla struttura eterociclica altamente ossigenata e sono estremamente pericolose, dall'accertata capacità cancerogena per la specie umana. Sono state isolate per la prima volta nel 1960 nei pressi di Londra, in seguito ad un importante e grave caso di intossicazione alimentare, il primo ad essere documentato, denominato "Turkey X-disease"; questa patologia ha portato alla morte di circa 100.000 tacchini, dovuta alla grande assunzione di mangimi fortemente contaminati. Sono prodotte da funghi del genere *Aspergillus*, come *A. flavus* e *A. parasiticus*. Queste tossine sono classificate in tre gruppi identificate con le lettere B, G ed M. I composti appartenenti al gruppo B sono prodotte sia da *A. flavus* che da *A. parasiticus* e sono le aflatossine B₁ e B₂; quelli del gruppo G sono composti sintetizzati dal solo *A. parasiticus*, (in quanto *A. flavus* non dispone dei primi due geni, *horB* e *cypA*, che sono coinvolti negli steps biosintetici delle AFGs (Ehrlich et al., 2004) e sono denominate aflatossine G₁ e G₂. Per quanto riguarda le molecole del gruppo M (che sono dei metaboliti idrossilati delle AFBs) esse non sono prodotte direttamente dai funghi sopra citati, ma sono il risultato della metabolizzazione da parte degli animali dei composti B₁ (dal quale deriva la tossina M₁) e B₂ (dal quale si origina invece la tossina M₂) (Patterson et al., 1980); la lettera M sta ad indicare la dicitura "Milk", in quanto, i composti del gruppo M sono ritrovabili all'interno del latte. Tra i vari composti che appartengono alla aflatossine ci sono anche molecole di minore importanza come AFP₁, AFQ₁, AFB_{2a} e AFG_{2a}, le quali sono molecole che si originano dopo le complesse reazioni biochimiche che avvengono nel processo di biotrasformazione animale. Tali composti, ovvero le aflatossine, sono in grado di resistere alle temperature di cottura dei cibi e di pastorizzazione.

Il nome che è stato dato ai gruppi di questa famiglia di tossine deriva dal fatto che queste molecole sono fluorescenti alla luce ultravioletta con una lunghezza d'onda di 365 nm (Sargeant, 1963). Infatti, i composti appartenenti al gruppo B, prendono questo nome in quanto, se irrorati con questa luce, emettono una fluorescenza di colore blu, mentre quelli del gruppo G rispondono alla stimolazione delle onde elettromagnetiche a 365 nm emettendo una fluorescenza che assume una colorazione verde (dall'inglese green); l'esposizione alla luce UV degrada la molecola tossica. Inoltre risultano instabili in condizione di pH inferiore a 3 e maggiore di 10, nonché in presenza di agenti ossidanti.

La AFB₁ è la molecola più tossica, possiede una potente azione epatocancerogena (Amaiike e Keller, 2011), ed è stata classificata come sicuramente cancerogena per l'uomo (gruppo 1 della

classificazione IARC). Queste sostanze (in particolare le AFB₁, AFG₁ ed AFM₁) detengono per l'appunto un'azione cancerogena e mutagena grazie alla formazione di un composto chiamato 2,3-epossido, un metabolita intermedio dotato di particolare instabilità e quindi reattivo; esso infatti è in grado di formare legami covalenti con gli acidi nucleici (Bennet e Klich, 2003).

Gli epossidi sono degli eteri ciclici in cui l'ossigeno è uno degli atomi di un anello a tre termini, ma diversamente da questi hanno una reattività del tutto eccezionale e delle sintesi differenti. La loro reattività è causata dalla tensione angolare dell'anello, in quanto l'ibridazione sp³ presuppone angoli di 109° contro i 60° formati dagli epossidi; questo predispone l'anello ad una più facile apertura.

Il percorso biosintetico per arrivare alle AFs è piuttosto complesso e, ad oggi, non tutti i gli steps biochimici sono ben noti e conosciuti. Una stima parla di circa 27 steps enzimatici ed una trentina di geni coinvolti (Yu e Ehrlich, 2011).

Il substrato base stabile, dal quale inizia la biosintesi delle AFs, è l'acido norsolirinic derivante da enzima sintasi degli acidi grassi.

La molecola delle aflatossine del gruppo B ha una struttura ad anello ciclopentanico, mentre nelle aflatossine del gruppo G esso è sostituito da un lattone (Dutton, 1988). Le serie 1 e 2 si differenziano in quanto nelle molecole delle serie 1 è presente un doppio legame su un anello furanico, mentre nella serie 2 questo doppio legame è assente (Dutton, 1988).

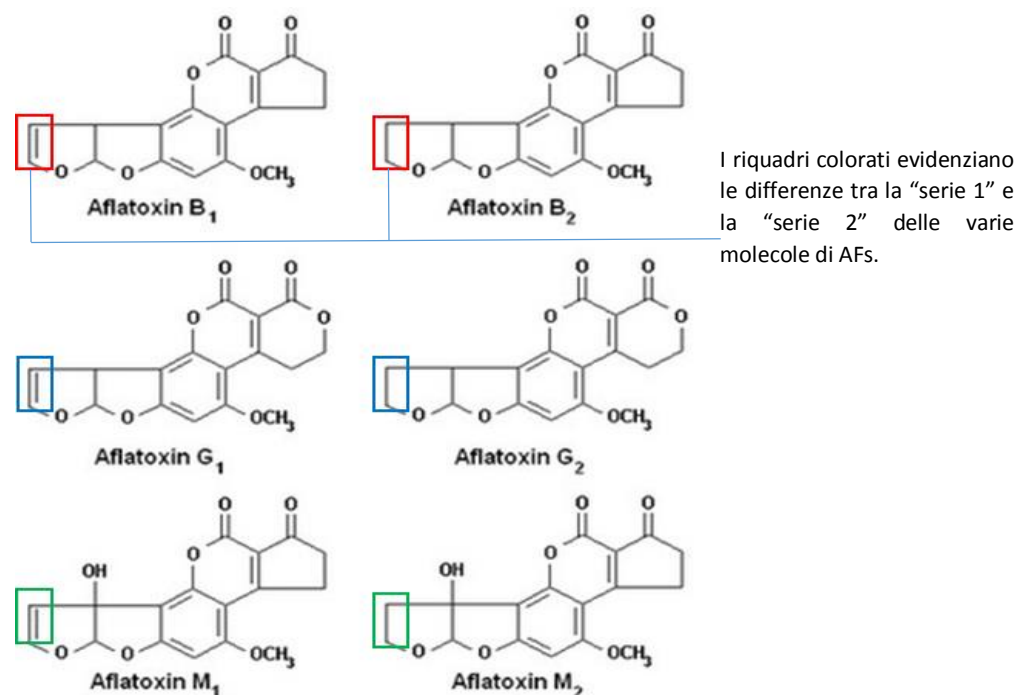


Figura 1.4. Struttura chimica delle molecole delle aflatossine e le loro relative differenze. Fonte: <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/aflatoxin-in-maize-t1974/p0.htm>

Nonostante il mais sia il principale cereale interessato dalla contaminazione e dalla presenza delle aflatossine, esse sono presenti anche su frumento, segale, avena. Possiamo ritrovare questi composti anche all'interno della frutta secca a guscio, nei peperoncini, pepe di cayenna, paprica, noce moscata e curcuma (Klich, 2007). Queste molecole sono dotate di una bassa solubilità in solventi molto polari come l'acqua: sono più solubili in solventi debolmente polari come il cloroformio ed il metanolo e sono dotate di un'elevata lipofilia, in quanto una volta assorbite dall'intestino, si legano alle albumine presenti nell'apparato circolatorio (Leeson et al., 1995; Pompa, 1994).

Nella fase di molitura le sezioni più pregiate e le parti come farine e gritz destinati alla filiera food risultano le meno contaminate, mentre lavorati di minor pregio, i quali hanno un indirizzo alimentare feed, risultano avere una concentrazione di tossina maggiore. Assegnando alla cariosside un contenuto di tossina pari al 100%, si nota che lavorati come farine e gritz a destinazione food hanno un concentrazione di AFs uguale o minore del 30%; tale contenuto, nei prodotti ad indirizzo feed, può variare sino ad arrivare all'interno del germe e delle farinette una concentrazione maggiore del 300%, e all'interno del glume anche del 500% (Brera et al., 2006). Le AFs sono molecole estremamente resistenti in quanto il range di temperatura all'interno del quale si ha una consistente degradazione della molecola tossica si colloca tra i 237 ed i 306°C, con punto di fusione a 268.269°C (Kabak, 2009). Con temperature maggiori di 150°C si ha una prima riduzione della concentrazione: frittura e bollitura portano a perdite di questi composti tossici comprese tra il 28 ed il 34%.

Tra tutti i composti che si formano in seguito all'assunzione di AFBs ed AFGs, le tossine del gruppo M, sono gli unici metaboliti che si ritrovano in quantità rilevanti all'interno del latte (Shreeve et al., 1979). Il fenomeno del carry-over è maggiore ad inizio lattazione e la quantità di AFs ritrovate nel latte varia a seconda della razza animale, al suo stato sanitario, alla dieta assunta, all'entità del metabolismo ed alla presenza o meno di mastiti (Fink-Gremmels, 2008). La quantità di AFM₁ presente all'interno è in rapporto di circa 1-3% rispetto all'ammontare di AFB₁ ingerita. E' stato provato che la tossina M₁ è presente nel sangue già dopo quindici minuti dall'assunzione dell'alimento contaminato e nel latte alla successiva mungitura. Affinché il livello nell'organismo diventi più o meno costante sono necessari due o tre giorni; si presuppone inoltre, che data la rapidità con cui questa molecola viene assimilata, entri in gioco anche l'assorbimento muscolare già a livello di bocca ed esofago (Gallo et al., 2008). Il trasferimento della tossina M₁ al latte è 3,3-3,5 volte maggiore ad inizio lattazione ed è linearmente correlata con il livello produttivo (Pietri et al., 2004). Il fenomeno del carry-over interessa anche l'organismo umano, dove la molecola M₁, arriva

ad assumere concentrazioni anche maggiori di quelle accettabili all'interno del latte di origine animale (Coulter et al., 1984; Abdulrazzaq et al., 2003). Questo evento è osservabile anche in prodotti direttamente derivanti dal latte, dalla sua trasformazione. Nei formaggi, ad esempio, i livelli di AFM₁ possono essere anche superiori a quelli del latte di partenza, in quanto la tossina è in grado di legarsi alla caseina (Brackett e Marth, 1982). Anche l'uovo risulta essere un alimento che viene interessato dal fenomeno del carry-over; esso infatti può accumulare AFs anche se in quantità e concentrazioni minori rispetto al latte (Trucksess et al., 1983). La tossina AFM₁ è stata inserita dallo IARC all'interno del gruppo 2B, come molecola dotata di possibile attività cancerogena per l'uomo. Alcuni studi hanno evidenziato che la cancerogenicità di questo composto corrisponda all'incirca al 2-8% rispetto a quella della molecola da cui deriva; la AFB₁.

I limiti legali comunitari per i cereali, inclusi quelli già lavorati e trasformati, sono di 2 ppb per quanto riguarda il contenuto di tossina B₁, e di 4 ppb per la sommatoria delle aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂. Il mais destinato a trattamenti successivi costituisce un'eccezione e riporta un limite imposto pari a 5 ppb per il contenuto di AFB₁ e di 10 ppb per la sommatoria delle AFs del gruppo B e G, come del resto gli alimenti destinati ai lattanti, i quali non possono superare il limite di 0,10 ppb in contenuto di AFB₁. Per quanto riguarda il contenuto di tossina M₁ nel latte crudo, trattato termicamente e destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte, la soglia limite imposta dai regolamenti comunitari si attesta su un valore di 0,05 ppb (Reg. CE 1881/2006).

1.2.5. Le ocratossine

Le ocratossine sono dei metaboliti secondari prodotti da numerose specie del genere *Aspergillus* e *Penicillium*. All'interno del genere *Aspergillus* le specie produttrici di OTs sono alcuni ceppi di *A. ochraceus* (conosciuto precedentemente come *A. alutaceus*), *A. carbonarius* (di cui la maggior parte dei ceppi sintetizza ocratossine) e *A. niger* (quest'ultimo annovera solo pochi ceppi capaci di produrre queste micotossine), mentre per quanto riguarda invece il genere *Penicillium*, le specie più attive per la sintesi di OTs sono *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. viridicatum* e *P. cyclopium* (Bottalico et al., 2004; D'Mello e MacDonald, 1997; Piva e Pietri, 2006). All'interno del mondo cerealicolo, e nello specifico di quello maidicolo, le specie di maggior interesse sono *A. ochraceus* e *P. verrucosum* (Bennet et al., 2003).

Le OTs vanno a costituire un gruppo di derivati dell'isocumarina, i quali sono strettamente correlati tra di loro. Sono legati al gruppo amminico della L-β-fenilalanina; la loro classificazione basata sulla loro origine biosintetica li pone nell'ambito del gruppo dei polichetidi, chiamandoli pentachetidi.

L'OTA risulta essere la molecola che riveste maggiore importanza tossicologica del gruppo delle OTs, nonché il composto che più massicciamente è presente all'interno delle derrate alimentari interessate dalla contaminazione dei funghi responsabili della sua produzione; venne isolata per la prima volta nel 1965 in Sud Africa da un ceppo di *A. ochraceus* (Bennet et al., 2003). In seguito fu anche ritrovata, all'interno di zone a climi temperati, come metabolita secondario prodotto da specie fungine appartenenti al genere *Penicillium* (Smith e Mass, 1985).

All'interno del gruppo delle ocratossine, oltre all'OTA, ritroviamo anche altri derivati come l'ocratossina B (OTB), l'ocratossina C (OTC), l'ocratossina alfa (α-OTA), la 4-idrossiocratossina (OTA-OH) e l'ocratossina con anello lattone aperto (OP-OTA) (Steyn, 1971, 1984; Xiao et al., 1995, 1996).

Tutte le ocratossine appena citate derivano dall'OTA.

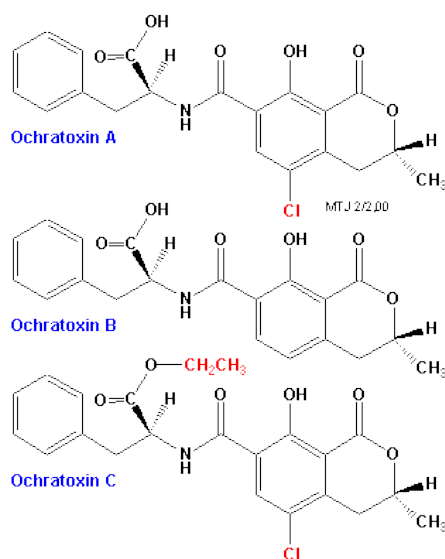


Figura 1.5. Struttura chimica delle molecole delle ocratossine A, B e C e relative differenze. Fonte: <http://www.biosite.dk/leksikon/ochratoxin.htm>

Da un punto di vista del poter tossicologico l'OTC può essere paragonata all'OTA, mentre l'OTB detiene un potere tossicologico dieci volte inferiore dell'OTA. Tossine come α-OTA e OTA-OH non mostrano effetti tossici di particolare rilievo, al contrario di OP-OTA, che invece dimostra una tossicità dieci volte maggiore rispetto alla molecola "madre" OTA (Marquardt e Frohlich, 1992; Xiao et al., 1996).

Tra i prodotti di origine vegetale che più risultano colpiti e contaminati da OTs troviamo i cereali (come mais, orzo, sorgo e frumento), arachidi e legumi in generale, caffè, prodotti da forno (es. pane), mangimi e derivati di uva e vino; quelli di origine animale che sono interessati da questa problematica invece sono siero e rene di suino, gli insaccati e gli altri derivati del suino (Bottalico et al., 2004).

La contaminazione da OTA è data in particolar modo dalle specie del genere *Penicillium* durante lo stoccaggio del prodotto. Il trattamento fisico delle granaglie, come la spazzolatura durante la pulitura del frumento prima della molitura, viene indicato come un processo responsabile dell'abbattimento della quantità di OTA pari al 50%. La molitura non sembra avere un effetto di risanamento importante, ma bensì modesto o nullo. Da questo si intuisce l'importanza, in caso di granella particolarmente contaminata, della necessità di attuare un buon processo di pulitura della stessa, in quanto l'OTA viene distrutta solo parzialmente durante il processo di panificazione (Piva e Pietri, 2006).

Il Comitato Scientifico per l'Alimentazione (SCF), al termine di un'indagine, è giunto alla conclusione che l'esposizione giornaliera (TDI= Tolerable Daily Intake) di OTA deve essere mantenuta su valori inferiori a 5 ng/kg di peso corporeo.

L'Unione Europea tramite il Reg. CE 1881/2006 ha imposto come limite di contenuto di OTs per quanto riguarda i cereali non trasformati pari a 5 ppb, mentre per i prodotti derivati dei cereali non trasformati, un limite di 3 ppb. Per maggiori dettagli a riguardo si rimanda all'Allegato 1.

1.3. Gli aspetti tossicologici

Di seguito verranno trattati gli aspetti tossicologici delle varie micotossine sino a qui considerate, ovvero come questi composti siano in grado di interagire con gli organismi viventi, arrecando loro problematiche e patologie di varia natura più o meno gravi.

1.3.1. Le fumonisine

L'ingestione di questa micotossina, nella specie umana, viene associata al cancro esofageo; è inoltre in grado di interferire con il metabolismo degli sfingolipidi (Marasas, 1995; Merrill et al., 2001) che constano in una serie di lipidi e sono costituiti da una molecola di sfingosina, un aminoalcol, un acido grasso a catena lunga ed una testa polare alcolica. Queste molecole (gli sfingolipidi) hanno un

importante ruolo all'interno dell'organismo quale la trasmissione dei segnali all'interno del sistema nervoso (Nelson e Cox, 2003). L'analogia strutturale posseduta dalle fumonisine con la molecola di sfingosina (che è una componente delle membrana sfingolipidica) rende questi composti in grado di interferire ed alterare la biosintesi degli sfingolipidi, determinandone un incremento della concentrazione che si trova nel sangue e nei tessuti con la conseguente modificazione, all'interno del siero e delle urine, del rapporto sfingonina/sfingosina (Merrill, 1997). Nella figura 1.6 viene illustrata l'azione che svolge la FB₁ nella biosintesi della sfingosina.

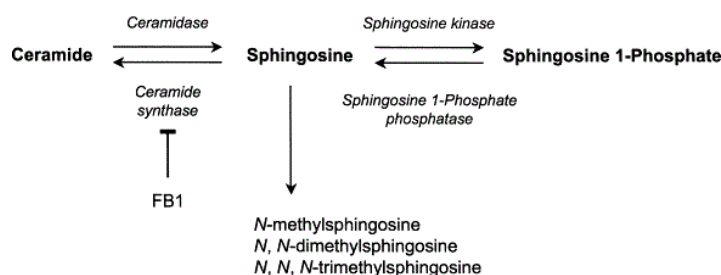


Figura 1.6. Schema della biosintesi della sfingosina. Fonte:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661803000537>

L'interazione di queste micotossine con il metabolismo degli sfingolipidi possono dare origine a gravi danni a carico del sistema nervoso stesso. Tuttavia grazie alla difficoltà con cui queste molecole (le FUM) vengono assorbite ed alla relativa velocità con la quale sono evacuate, esse non vengono accumulate all'interno dell'organismo, scongiurando così il pericolo di contaminazione e deposito delle carni, delle uova e del latte (Peraica e Domijan, 2001).

Gli organi bersaglio maggiormente interessati dall'attacco di queste micotossine sono fegato, cervello, reni e polmoni.

Uno studio condotto su linfociti di bovino ha evidenziato che la FB₁ possiede un'attività genotossica (De Lorenzi et al., 2005); in questa prova infatti, i linfociti sono stati esposti alla FB₁ ad una concentrazione di 50 µM, la quale ha dato origine alla formazione di micronuclei ed ha portato ad una riduzione della capacità da parte delle cellule di riprodursi. Sempre all'interno dello stesso studio è stata effettuata una prova portando la concentrazione di FB₁ da 50 a 100 µM, ed è stato osservato un'incrementare dello scambio dei cromatidi fratelli ed una ridotta capacità, da parte delle cellule linfocitarie, di attenuare la divisione mitotica. Le fumonisine, a livello cellulare, sono in grado di svolgere azione di inibizione della sintesi proteica e possono causare anche la frammentazione del DNA (Doko et al., 1995; Dombrink-Kurtzman, 1994 e 2003; Gelderblom et al.,

1995; Norred et al., 1990). Si riporta al riguardo una sperimentazione nella quale alcune cellule di rene di primate sono state trattate con FB₁; questa prova ha evidenziato come ci sia stata una decisa diminuzione della concentrazione della proteina chinasi C. La riduzione di questa proteina porta ad un'alterazione della normale attività concernente la trasduzione del segnale, la quale, potrebbe dare origine, tra i vari possibili effetti nocivi, a fenomeni di carcinogenesi (Huang et al., 1995). Cosa molto importante è il fatto che la biotrasformazione svolta dal fegato grazie agli enzimi epatici, come la monossigenasi P450, converte la FB₁ in molecole più tossiche (Spotti et al., 2001). Questo è dovuto al fatto che la FB₁ che viene parzialmente o completamente idrolizzata, in seguito alla rimozione di una delle due catene di acidi tricarbossilici, viene scissa in due molecole chiamate aminopoliol-1 e aminopoliol-2 (parzialmente idrolizzate) ed una terza molecola detta aminopentolo-1, completamente idrolizzata: queste molecole hanno una capacità citotossica superiore alla FB₁ dalla quale derivano, ma per contro, in seguito alla perdita delle catene laterali degli acidi tricarbossilici, esse perdono in capacità assimilatoria a livello intestinale (Gelderblom et al., 1993; Hendrich et al., 1993; Hopmans et al., 1997).

A differenza dei primati, nei ruminanti le FUM vengono degradate nel rumine dalla microflora in esso presente e di conseguenza all'interno delle feci di questi animali è possibile ritrovare forme della FB₁ totalmente e/o parzialmente idrolizzate (Caloni et al., 2000; Prelusky et al., 1996b; Rice e Ross, 1994). Altro meccanismo che la FB₁ è in grado di modificare riguarda l'inibizione di un enzima chiave del metabolismo degli sfingolipidi: l'enzima in questione è N-acil-transferasi, il quale catalizza una reazione che in seguito ad altre biotrasformazioni, porta alla sintesi di sfingolipidi complessi. Tale azione inibente di questa tossina sembra essere all'origine degli effetti tossici sia nell'uomo che negli animali (Voss K.A., 2007).

I ruminanti risultano essere i meno sensibili alla tossicità delle fumonisine (Bottalico, 2004; Voss K.A., 2007; Glenn A.E., 2007). Anche le specie aviarie, come i ruminanti, sono dotate di una scarsa sensibilità a queste tossine: a fronte di ciò sono stati osservati dei sintomi minori come diminuzione della crescita, epatomegalia, scarsa efficienza del sistema immunitario e diarrea (Marijanovic et al., 1991; WHO, 2001), nonostante i capi fossero entrati a contatto con dosi di particolare entità comprese tra 75 e 644 mg/kg. In una sperimentazione su capi di pollame è stato evidenziato come, somministrando essi una dose variabile tra i 10 ed i 30 mg/kg, gli effetti tossici riscontrati siano stati limitati alle sole alterazioni ematologiche (Espada et al., 1994). Diversamente, per animali come gli equini e i suini (le specie più sensibili), l'impatto della tossina ha avuto esiti e sintomatologie più gravi e marcate: nell'equino vi è una correlazione tra l'assunzione di mangimi contaminati e molti

casi di ELEM, ovvero leucoencefalomalacia equina (Thiel et al., 1991), mentre i suini sono colpiti da sindrome da edema polmonare e diminuzione della crescita. Si osserva invece in animali come ratto, agnello, vitello e coniglio una certa nefrotossicità.

Passando all'uomo, gli effetti tossici che sortiscono le FUM, sono di carattere neurotossico e citotossico. Si ritiene che l'assunzione da parte degli esseri umani di mais contaminato sia correlato con i tumori all'esofago: nel Nord Italia ad esempio, dove vi è un forte uso della farina di mais per la preparazione della polenta, si osserva una maggiore incidenza all'interno della popolazione del cancro dell'esofago (Franceschi, 1990). Al riguardo sono stati condotti studi anche in altre parti del mondo come in Sud Africa, Cina e nel sud-est degli Stati Uniti. Tutti questi studi hanno portato alle medesime conclusioni. Le molecole delle FUM sono abbastanza resistenti al calore: nonostante ciò è possibile, tramite procedimenti di trasformazione che prevedono l'utilizzo di temperature superiori ai 150°C, degradare e, conseguentemente, portare alla diminuzione del contenuto di queste tossine (Castells et al., 2005; EFSA, 2005).

Tuttavia, ad oggi, il meccanismo d'azione delle fumonisine è conosciuto solo in parte; in attesa che vi siano più dati scientifici al riguardo, lo IARC ha inserito queste tossine all'interno del gruppo 2B, come composti con possibili caratteristiche cancerogene.

Da un punto di vista legislativo i tenori di FUM ammissibili sono regolamentati da normative europee quali il Regolamento CE n° 1881/2006, ed il successivo Regolamento CE n° 1126/2007, che modifica il precedente. Tali limiti sono espressi come la somma di FB₁ ed FB₂: per citare solo alcuni esempi di limiti, il granoturco non trasformato detiene un limite di 4000 ppb, il granoturco destinato al consumo umano diretto e prodotti da esso derivati (con alcune eccezioni) 1000 ppb. Per avere una panoramica completa dei limiti imposti da tali normative si rimanda alla consultazione dell'allegato 1, che riporta le tabelle con le varie tipologie di prodotto ed i relativi tenori massimi ammessi.

1.3.2. I tricoteceni

Dato che le tossine di maggior rilievo appartenenti ai TRI sono le T-2 ed HT-2 del gruppo A, ed il DON del gruppo B, si focalizzerà l'attenzione su questi composti. Data la loro struttura chimica, queste molecole sono in grado di penetrare facilmente attraverso le membrane lipidiche, minandone la permeabilità e di interagire con DNA ed RNA causandone la frammentazione; sono inoltre in grado di inibire la sintesi proteica in quanto interferiscono con gli organi subcellulari quali le unità ribosomiali 60S (Chaudhary et al., 2009).

Un altro comportamento tossico permette a queste molecole di inibire e compromettere la mitosi cellulare ed avere effetti immunosoppressivi, nonché di svolgere attività dermatossica (ovvero causare infiammazioni della pelle delle mucose orali e gastro-intestinali) ed emorragica (causano fragilità capillare ed ecchimosi degli organi interni).

Il deossinivalenolo

Questa tossina conosciuta anche con il nome di vomito-tossina (in quanto il primo sintomo dell'intossicazione è una forte nausea) racchiude in sé proprietà emetiche; infatti quando questa molecola arriva al cervello è in grado di attaccare i recettori dopaminici causando emesi nell'individuo colpito (Sobrova et al., 2010).

Negli animali, la tossicità acuta che questa tossina sortisce, varia da specie a specie in base all'esposizione alla molecola, ovvero la durata e la gravità dell'assunzione (Konigs et al., 2008). Secondo alcuni studi, gli animali che assumono questa molecola in maniera costante attraverso le razioni alimentari giornaliere, manifestano all'inizio dell'esposizione emesi, arrivando ad un graduale rifiuto dell'alimento, che se eccessivamente prolungato nel tempo porta all'anoressia prima, e successivamente alla morte dell'animale (Rotter, 1996). Oltre a questi sintomi, questo composto è in grado di provocare irritazioni cutanee (particolarmente nei suini), modificazione degli organi emopoietici e depressione immunitaria, portando ad una marcata riduzione dei linfociti B e T, nonché delle immunoglobine IgG ed IgM. Nei ruminanti il DON, di solito, non dà origine a problematiche di grave entità, in quanto i microrganismi che si trovano nel rumine svolgono un'azione detossificante nei confronti di questa molecola (King, 1984).

Questa tossina nell'uomo provoca la cosiddetta Sindrome Emetica, ossia una patologia che al suo manifestarsi causa nausea (con conseguente vomito), irritazione alla gola ed infine diarrea emorragica. È stato inoltre dimostrato, in seguito ad episodi di cancro all'esofago in Asia, Africa e altre parti del mondo, come vi sia una stretta correlazione tra questo carcinoma e l'assunzione di DON. Alcuni studi hanno dimostrato che il DON è in grado di passare dal corpo materno al feto, utilizzando come via di passaggio la placenta. Dopo sole 4 ore dall'assunzione di DON da parte della madre, la concentrazione di questa molecola all'interno del feto raggiunge valori intorno al 20% del totale ingerito; sono comunque in corso ulteriori studi e ricerche al fine di estrapolare maggiori dati scientifici al riguardo, ma ciò evidenzia che la tematica inerente a questa micotossina deve essere

trattata con attenzione, in quanto pericolosa proprio per il motivo appena citato (Nielsen et al., 2011).

Il consumo di cereali colpiti da specie del genere *Fusarium*, con conseguente produzione di DON, ha portato più volte ad una patologia chiamata leucopenia tossica, che ha interessato le popolazioni delle Russia Orientale, la quale comporta una riduzione dei leucociti nel sangue. Si reputa inoltre che il deossinivalenolo possa rivestire un ruolo di una certa importanza nella comparsa di gravi patologie quali la leucemia (Haouet et al., 2003).

Le tossine T-2 e HT-2

La tossina T-2 è la molecola appartenente alla famiglia dei tricoteceni che possiede la tossicità maggiore rispetto alle altre molecole (in ordine di tossicità all'interno dei TRI: T-2 --> DAS --> NIV --> DON). Questo composto è sintetizzato principalmente da *F. sporotrichioides*; T-2 non è diffusa come il DON od il NIV, però si riscontra facilmente nelle cariossidi di piante che sono state lasciate in campo durante il periodo autunnale. Il suo areale di maggiore diffusione risulta essere il Nord Europa.

Questa tossina è in grado di inibire la sintesi proteica e la sintesi del DNA, nonché di danneggiare le membrane cellulari. Nell'uomo la T-2 (insieme al DAS) sembra sia la responsabile della cosiddetta "anemia tossica alimentare" (ATA), patologia che ha causato la morte di centinaia di migliaia di persone in Russia nel periodo della seconda Guerra Mondiale, tra il 1942 ed il 1947 (Chu et al., 1979). Questa disfunzione è accompagnata da sintomi quali emesi, infiammazioni cutanee e danni al tessuto emopoietico. All'acutizzarsi, questa patologia porta alla comparsa di necrosi all'interno della cavità orale, danni al sistema nervoso di grave entità ed emorragie (Beardall, 1994).

Lo IARC nel 1993 ha introdotto queste molecole all'interno del gruppo 3 (JECFA, 2002), classificandole come sostanze non classificabili come cancerogene per l'uomo (vedi Allegato 2). Sono, attualmente, in corso diversi studi su questi metaboliti per poter ottenere un quadro d'insieme più nitido al riguardo data la scarsità di dati per quanto riguarda l'uomo.

Come precedentemente riportato, l'UE con la "Raccomandazione CE n° 165/2013 relativa alla presenza di tossine T-2 ed HT-2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali", ha fissato dei valori indicativi con il fine di porre in atto, al verificarsi della situazione, dei controlli e delle indagini sulle partite di derrate alimentari eccessivamente contaminate, in virtù del fatto della forte tossicità di

questi composti e delle loro gravi problematiche che sono in grado di arrecare agli animali ed all'uomo.

1.3.3. Lo zearalenone

Questi composti sono caratterizzati da una bassa tossicità acuta verso gli animali e l'uomo. Possono essere presenti, ad elevate concentrazioni, nelle granaglie di colture colpite da *Fusarium* ed in altri prodotti alimentari (Bottalico, 1998; Kuiper-Goodman et al., 1987; Muller et al., 1998; Scudamore e Patel, 2000).

Una volta ingerito ed assorbito lo ZEA viene dislocato, tramite il sangue, al fegato; qui la molecola di ZEA viene convertita in α -ZOL e β -ZOL (Mirocha et al., 1977-1981). Lo α -ZOL è la molecola che determina la maggiore attività estrogena, tuttavia entrambi i metaboliti (α -ZOL e β -ZOL) sono in grado di svolgere attività ormono-simile, e quindi di causare squilibri al sistema ormonale, dando origine ad alterazioni nel tratto riproduttivo, inibendo la fertilità, causando sviluppi anormali ed aborti: sono anche in grado di causare diarrea ed influire sul sistema ormonale che presiede alla produzione latte, diminuendola (Arukwe et al., 1999; Smith et al., 1995; Sprosen e Towers, 1995). Lo ZEA agisce legandosi ai recettori degli estrogeni, e conseguentemente è dislocato nel nucleo cellulare, ove la coppia composta da recettore e ZEA è in grado di legarsi ai recettori cromatinici; in questo modo viene attivata la trascrizione. In basse concentrazioni lo ZEA origina attività anabolica ed uterotrofica, mentre con il crescendo della concentrazione, questo metabolita svolge un'attività estrogeno-simile (Moretti et al., 2006). Questo perché gli zearalenoni non godono di tossicità acuta, però sono in grado di portare degli squilibri al sistema ormonale dell'individuo, in particolare, simulando l'azione degli estrogeni, vanno ad intaccare la sfera riproduttiva con conseguenti ipofertilità ed iperestrisimo (chiamata anche Sindrome Estrogenica) (Marasas et al., 1984), la quale manifesta i seguenti sintomi: scoli vaginali, estro prolungato, anaestro, iperestrogenismo, infertilità, modificazione della libido, pseudo gravidanze, ingrossamento e sviluppo della ghiandola mammaria e lattazioni anormali.

Le concentrazioni a cui ci si riferisce riguardo l'ipofertilità sono pari a 10 ppb (in suinetti e bovini); con concentrazioni superiori invece, ovvero di 1 ppm (1000 ppb) compaiono i primi sintomi di iperestrisimo (in scrofe) (Malekinejad, 2005).

Gli studi sino ad ora effettuati sembrano escludere che eventi come aborti o morte degli individui esposti a questa tossina siano ad essa imputabili, almeno non direttamente. La specie più sensibile

a questa molecola è il suino, il quale manifesta nello specifico, sintomi come edema vulvare e della mammella (con la comparsa di lesioni dei capezzoli), prolasso vaginale e/o uterino e rettale, aborti, una ridotta natalità e suinetti dal peso sotto dimensionato; altri sintomi sono l'inibizione della secrezione di FSH, la maturazione dei follicoli durante la fase preovulatoria, ipotrofia ovarica ed anaestro. Sempre riguardo la sfera riproduttiva, nel verro, lo zearalenone porterebbe all'inibizione della formazione degli spermatozoi, nonché una ipotrofia testicolare. Le ultime ricerche al riguardo sembrerebbero indicare che questa molecola possiede un'attività carcinogenica e che abbia la capacità di passare nel latte, causando così, nei soggetti che a loro volta entrano a contatto con questi composti, i relativi sintomi. Questa tossina, nella specie bovina invece, a basse concentrazioni, porta ad un prolungamento della fase di estro ed alla diminuzione del concepimento; non sono infrequenti anche vaginiti, un prolungarsi del periodo dei calori, una minore assunzione degli alimenti ed una riduzione della produzione di latte. Questo è riconducibile al fatto che lo ZEA potenzia l'azione tossica del DON, al quale è frequentemente associato. Nonostante tutte queste problematiche e questi disordini anche di grave entità, nei bovini lo ZEA non costituisce una minaccia come invece lo è per i suini, in quanto l'attività detossificante condotta ad opera dei microrganismi contenuti nel rumine, associata all'eliminazione dello ZEA ed i relativi metaboliti (α -ZOL e β -ZOL) a livello della bile per poi essere evacuati attraverso le feci e l'urina, mantiene un basso tenore di ZEA all'interno dell'animale (Biehl et al., 1993; Hidy et al., 1977; Kuiper-Goodman et al., 1987).

Come per i suini e bovini, anche nell'uomo queste molecole tossiche agiscono come sostanze ormono-simili, portando a degli squilibri a carico del sistema ormonale e dando origine, nella femmina, ad ipofertilità ed iperestrisimo. È stato accertato che l'assunzione di alte concentrazioni di zearalenone, protratte nel tempo, è causa del cancro alla cervice uterina. Data la capacità degli animali di degradare questi composti, l'assunzione di ZEA in dosaggi pericolosi per l'uomo è da imputarsi ad alimenti di origine vegetale, quali i cereali, e nello specifico il mais, data la forte sensibilità di questa specie ad accumulare gli zearalenoni in seguito all'attacco dei *Fusarium*. Da segnalare che questi metaboliti tossici non sono stati ritrovati all'interno delle uova.

Il livello massimo giornaliero per l'assunzione di ZEA ed i suoi metaboliti, è stato fissato dal JECFA, ed è pari a 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mentre all'interno delle tabelle del Reg. CE 1126/2007 sono riportati i tenori massimi ammissibili all'interno dei prodotti alimentari, tra cui per i cereali non trasformati diversi dal granoturco, il tenore massimo ammesso è pari a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, per il granoturco non trasformato (ad eccezione di quello destinato alla molitura ad umido) il limite è di 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e per i cereali

destinati al consumo umano (con le dovute eccezioni) vi è una soglia di 75 µg/kg. Per avere una visione completa dei limiti inerenti lo ZEA, si rimanda all'allegato 1.

1.3.4. Le aflatossine

Queste tossine sono in grado di reagire con gli acidi nucleici quali DNA, modificando il processo di sintesi proteica e minando l'integrità della struttura cellulare; sono inoltre in grado di causare carcinomi al fegato (in particolare la tossina AFB₁), in quanto organo bersaglio (Groopman et al., 1992), nonché di svolgere funzione di immuno-soppressione. Oltre agli effetti tossici appena descritti queste molecole possono originare anche tumori a livello dei condotti biliari e causare emorragie al sistema gastrointestinale ed ai reni.

Le popolazioni più a rischio sono quelle che abitano le zone tropicali in quanto in queste aree geografiche il clima favorisce lo sviluppo di funghi del genere *Aspergillus*, all'interno del quale sono contenute le specie di maggior rilievo come *A.flavus* e *A. parasiticus*. Come riportato nei paragrafi precedenti le aflatossine, che sono ritenute più importanti per la loro tossicità e diffusione, sono la B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂. Valutando queste molecole in base alla loro tossicità cronica ed acuta (dalla molecola più tossica a quella con minore tossicità), l'ordine che assume questa classificazione è il seguente: AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂. Come si nota non compaiono le tossine M₁ (più tossica e pericolosa rispetto alla M₂) e M₂, in quanto questi composti non sono direttamente sintetizzati dal fungo, bensì derivano dal metabolismo delle tossine B₁ e B₂ (come prodotti idrossilati) eseguito dal citocromo P450. La tossicità di queste molecole idrossilate rispecchia quella della molecola "madre" da cui originano.

Le tossine B₁, G₁ ed M₁ sono in grado di svolgere un'azione cancerogena e mutagena (l'organo maggiormente colpito è il fegato) grazie alla formazione di un composto metabolico intermedio come il 2,3-epossido, il quale risulta essere molto instabile, comportandosi di conseguenza in maniera molto reattiva che dona a questa molecola la capacità di interagire attraverso la formazione di legami covalenti con gli acidi nucleici (Bennet e Klich, 2003).

L'assunzione di rilevanti quantità di AFs può dare origine ad effetti come mutagenesi, alterazione della coagulazione e fenomeni di necrosi alle cellule del tessuto epatico. Se l'ingestione ed il consumo si protraggono per un periodo di tempo prolungato, l'intossicazione può evolvere e causare apatia, anoressia, diarrea emorragica ed ipertermia (Peraica et al., 2001). Oltre al fegato,

altri organi colpiti da queste tossine sono i polmoni, i reni ed i tessuti intestinali, sia negli animali che nell'uomo.

Tra tutte le AFs, i composti appartenenti al gruppo M hanno la capacità di poter passare, in quantità rilevanti, nel latte; questo fenomeno è conosciuto con il nome di carry-over, che solitamente risulta essere maggiore a inizio lattazione (Fink-Gremmels, 2008). Ciò che desta preoccupazione è il fatto che il carry-over interessa anche l'organismo umano; ciò significa che se un soggetto si trova ad assumere alimenti contaminati da AFB₁ o AFB₂ nel periodo post-parto, i relativi metaboliti che ne derivano si accumulano nel latte (a volte anche in concentrazioni superiori a quelle che vengono accettate nel latte di origine animale) che sarà poi somministrato al neonato (Coulter et al., 1984; Abdulrazzaq et al., 2003). Inoltre, data la capacità delle tossine del gruppo M di legarsi alla caseina, tale fenomeno del carry-over interessa anche i prodotti che derivano dal latte, come i formaggi, con tenori di contaminante superiori a quelli del latte di partenza (Brackett e Marth, 1982). Alcuni studi hanno evidenziato che anche l'uovo è interessato da questo fenomeno, seppur con concentrazioni delle molecole tossiche minori rispetto al latte (Trucksess et al., 1983).

Lo IARC nel 1982 ha incluso queste molecole all'interno del gruppo 1, classificandole come cancerogene per l'uomo e gli animali (Bottalico et al., 2004). Il regolamento CE 1881/2006 definisce i tenori massimi di queste tossine; ad esempio i cereali e relativi prodotti derivati (con alcune eccezioni) riportano una soglia massima di AFs (somma di B₁+B₂+G₁+G₂) pari a 4 µg/kg, mentre l'aflatossina M₁ contenuta all'interno del latte crudo non può superare il limite di 0,05 ppb. Per un quadro maggiormente dettagliato si rimanda all'allegato 1.

1.3.5. Le ocratossine

Di tutte le ocratossine, la più studiata e di maggior interesse per presenza e tossicità, è la OTA (ocratossina A). Questo composto è dotato di proprietà nefrotossiche, cancerogene, teratogene, citotossiche ed immunotossiche e si sospetta sia anche in grado di svolgere attività genotossica e neurotossica. Questa tossina viene associata alla nefropatia endemica balcanica e allo sviluppo di tumori all'apparato urinario umano (Pleština et al., 2000; Schlatter et al., 2005). Gli effetti citotossici di questa tossina sono dovuti al fatto che essa è in grado di inibire il processo respiratorio a livello delle membrane mitocondriali, nonché la sintesi proteica (Castegnaro et al., 1990; Marquardt e Frohlich, 1992; Bunge et al., 1978; Creppy et al., 1983a, b, 1984).

Tra gli effetti genotossici invece, troviamo la frammentazione del DNA, un aumento degli scambi di materiale genetico tra i cromatidi fratelli, stimolazione della cellula alla comparsa di micronuclei ed infine crescenti mutazioni cellulari (Ehrlich et al., 2002; Kamp et al., 2005; Obrecht-Pflumio e Dirheimer, 2000).

L'OTA ricopre principalmente azione nefrotossica, ossia colpisce i reni causando danni di natura morfologica e funzionale, però in base alla specie animale che colpisce ed alla concentrazione assunta, questo composto può svolgere anche attività tossiche di altro genere. Gli animali monogastrici (specie aviarie e suini) sono i più colpiti e sensibili a queste tossine, ove le OTs portano a patologie che colpiscono i reni. Gli animali poligastrici (bovini e ovini) invece sono dotati di una maggiore resistenza, in quanto all'interno del ruminante le molecole tossiche vengono degradate dalla microflora in esso contenuta; qui infatti l'OTA viene trasformata in una molecola inattiva quale l'ocratossina α (Bottalico et al., 2004).

Con dosi attorno ai 200 ppb, è osservabile una sintomatologia generalizzata che si manifesta con diarrea, disidratazione ed anoressia; al crescere del dosaggio (1000 ppb) i sintomi osservabili sono polidipsia (eccessivo bisogno di bere), poliuria (aumento della diuresi) e minore crescita, per passare poi, nel caso di una prolungata esposizione, ad ulcera gastrica e sviluppo deviato dalla normalità anche di grave entità.

Nei bovini, le intossicazioni da ocratossine sono rare, ed i sintomi che questi possono avere sono poliuria, disidratazione, minore sviluppo negli animali in crescita, e a volte degli accenni di enterite ed aborto. Gli organi maggiormente colpiti sono i reni, che possono assumere una colorazione che devia dalla norma (tipicamente colore grigiastro) e riportare danni alle strutture ad essi collegate, tra cui necrosi dei tubuli prossimali e la comparsa di tessuto connettivo interstiziale.

L'azione tossica compiuta dalle ocratossine a carico di altri animali sono: minore ovodeposizione nelle galline, alterazione del normale funzionamento del sistema immunitario in molte specie, infiammazione delle mucose intestinali nei suini, nonché attività teratogena su embrioni di animali come galline, topo, ratto e scimmia. Oltre ai sintomi già riportati le OTs, secondo vari studi, sembra abbiano un ruolo nello sviluppo del cancro all'apparato urinario (Castegnaro et al., 1990; Vukelic et al., 1992) e siano causa della cosiddetta "Nefropatia Endemica dei Balcani" (Sostane e Vukelic, 1991; IARC, 1993; Bottalico et al., 2004), ovvero una patologia a carico del sistema urinario che colpisce l'essere umano. Questa disfunzione colpisce in particolare la popolazione femminile che abita le zone meno sviluppate della regione Balcanica (Krogh, 1974; Marasas e Nelson, 1987).

L'OTA è stata classificata, da parte dello IARC, all'interno del gruppo 2B ovvero come possibile molecola cancerogena per l'essere umano (IARC, 1993). A livello legislativo la presenza negli alimenti e nelle granaglie di OTA sono regolamentati dal Reg. CE 1881/2006. Tra i vari limiti imposti si evidenzia il contenuto di OTA in cereali non trasformati che non deve superare i 5 µg/kg, ed il limite di 0,5 µg/kg fissato per gli alimenti a base di cereali destinati ai lattanti ed ai bambini. Per una dettagliata descrizione dei limiti si rimanda all'allegato 1.

1.4. Le tossine emergenti

Le tossine precedentemente trattate (quali FUM, TRI, ZEA, AFs ed OTs) sono le più importanti e di maggiore presenza all'interno delle granaglie delle colture di mais e non, tuttavia oltre ad esse, assistiamo ad una sempre crescente presenza anche di altre tossine, dette Tossine Emergenti (ET), sintetizzate dagli stessi generi fungini. Tra le principali ET troviamo la moniliformina (MON), la beauvericina (BEA), le enniatine (ENs), il fusarenone-X (FUS-X), il diacetossiscirpenolo (DAS), il nivalenolo (NIV) e la fusaproliferina (FUP); a seguire ci sono altri composti che suscitano interesse nel mondo scientifico della ricerca in quanto, queste molecole, assumono un ruolo di crescente importanza. Queste tossine sono il neosolaniolo (NEO), lo scirpentriolo (SCT), l'acido fusarico (FA), la culmorina (CULM), la patulina (PAT), la citrinina (CIT), la bikaverina (BIK), la equisetina (EQU), l'aurofusarina (AUR) ed il buteloniolo (BUT).

1.4.1. La moniliformina

Questa tossina è rappresentata da una piccola molecola (formula bruta $C_4H_2O_3$, mm 120,04) altamente polare, presente in natura sotto forma di sale di potassio o di sodio del 3-idrossiciclobut-3-1,2-dione, solubile in acqua (Steyn, Thiel & Van Shalkwyk, 1978; Chung et al., 2005).

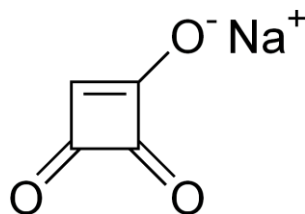


Figura 1.7. Struttura chimica della moniliformina. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Moniliformin_sodium.png

Le specie di *Fusarium* che sono più frequentemente associate alla produzione di MON a livello mondiale sono *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. avenaceum*, *F. chlamydosporum*,

F. oxysporum e *F. tricinctum* (Sanhueza et al., 2004; Morrison et al., 2002). Studi recenti hanno messo in evidenza che anche una nuova specie di *Fusarium* quale *F. temperatum* è in grado di sintetizzare questo composto (Logrieco et al., 2006; Scauflaire et al., 2011, 2012). Altre specie appartenenti a questo genere che sono in grado di produrre MON, anche se con un impatto minore rispetto alle precedenti, sono *F. anthophilum*, *F. fujikuroi*, *F. nygamai*, *F. beomiforme*, *F. napiforme* e *F. accuminatum* (Logrieco et al., 2006). Uno studio condotto dagli autori Scarpino, Reyneri, Vanara, Scopel, Causin e Blandino (2015) ha evidenziato che la produzione di MON è associata alla presenza di FUM, ed è una conseguenza dei danni causati dalla piralide ed altri insetti minatori. Gli attacchi di piralide (*O.nubilalis*) incrementano sia la presenza di *F. proliferatum* che la presenza di *F. subglutinans*, in seguito ai danni che questo insetto arreca alle spighe di mais. Alcune prove riportano che l'attività di *O. nubilalis* è stata in grado di aumentare il contenuto di MON (Scarpino et al., 2013).

La relazione tra il contenuto di MON e le specie *Fusarium* produttrici di questa tossina (*F. proliferatum* e *F. subglutinans* in primis) evidenzia come vi sia una maggiore correlazione tra la produzione di MON e la presenza di *F. proliferatum*, rispetto alla sintetizzazione di questa tossina e la presenza di *F. subglutinans*. Da segnalare che la capacità tossicologica di *F. proliferatum* è maggiore (di circa 3600 volte secondo prove in vitro condotte in laboratorio da Scarpino et al. (2013) rispetto a quella di *F. subglutinans*. Dalle sperimentazioni effettuate risulta inoltre come il legame tra MON e funghi produttori porti alla luce una forte presenza di MON nelle aree maidicole del Nord Italia (in quanto trattasi di micopatogeni favoriti da climi temperati), principalmente dovuta alla presenza di *F. proliferatum*, che a sua volta è strettamente correlato alla presenza ed attacco di *O. nubilalis* (Scarpino et al., 2013); questo insetto infatti ha un impatto economico in diverse aree di produzione (Bode e Calvin, 1990; Szóke et al., 2002).

Papst et al. (2005) e Magg et al. (2003) in studi su piante di mais BT, in aree di coltivazione site in Europa Centrale, hanno riportato una correlazione tra la percentuale di presenza di spighe danneggiate dagli insetti minatori e la concentrazione di MON (Papst et al., 2005; Magg et al., 2003). Attualmente non sono però disponibili dati inerenti a questi studi, ovvero la correlazione che intercorre tra la presenza di questi insetti ed il contenuto di MON, negli areali di coltivazione in zone più calde, dove i danni causati alle spighe ed alle cariossidi da parte di questi insetti sono superiori. Non è ancora chiaro quale specie di *Fusarium* sia la maggior responsabile riguardo la contaminazione da MON nelle aree temperate o quale relazione esista tra queste specie e l'attività degli insetti minatori come la piralide (il legame che intercorre tra questa tossina e questo insetto è

estremamente alta nelle aree temperate). Lo studio portato a termine da Scarpino et al. (2013) dimostra come la contaminazione da MON sia promossa da un complesso ed integrato sistema composto da condizioni metereologiche, la presenza di insetti minatori quale *O. nubilalis* e le specie di *Fusarium* interessate (come *F. proliferatum*, *F. subglutinans* e *F. temperatum*); detti fattori giocano un ruolo molto importante all'interno di questo complesso. Questo composto non è estensivamente presente nei cereali esaminati per contaminazione da micotossine e, quando presente, quest'ultima dimostra concentrazioni estremamente variabili (Jestoi, 2008). La moniliformina è comunque presente a livello mondiale in diverse regioni di interesse cerealicolo (Peltonen, 2010). Recentemente, in campioni di mais coltivato in Nord Italia, sono stati riscontrati livelli di MON sino a 2500 µg/Kg (Scarpino, 2013) con un'incidenza complessiva del 93% di campioni positivi. In Norvegia sono state riscontrate concentrazioni di questa tossina a livelli superiori, in particolar modo in colture di frumento, mentre in quelle di orzo ed avena la presenza di questa molecola era inferiore (Uhlig et al., 2004; Bernhoft, 1999). Altre analisi condotte in Danimarca hanno evidenziato che la moniliformina era presente nel 53% dei campioni analizzati e colpiti da infezioni di *Fusaria*. In Canada, in seguito ad analisi al riguardo, sono stati riscontrati campioni positivi alla contaminazione da MON in percentuale del 75, 56, 33 e 16% per il frumento duro, frumento tenero, segale ed avena rispettivamente, mentre in Inghilterra soltanto il 2% di campioni di orzo che sono stati analizzati, hanno riportato una presenza di MON (Edward, 2009).

Il meccanismo molecolare tramite il quale la molecola di MON agisce è ancora sconosciuto, tuttavia si ritiene, vista la somiglianza strutturale della MON con la molecola del piruvato, che questa tossina sia in grado di intaccare i pathways metabolici che implicano il piruvato, e di portare all'inibizione dell'ossidazione degli acidi tricarbossilici (TCA) dei cicli intermedi, portando ad uno stress respiratorio. Gli effetti dell'esposizione a questa micotossina sono stati largamente studiati, sono stati condotti dei test su batteri, sugli effetti genotossici della MON. Inoltre sono state condotte analisi su epatociti di ratto; le cellule che sono state esposte alla molecola di MON hanno mostrato un forte effetto di aberrazione dei cromosomi, la quale ha causato la modificazione strutturale degli stessi (Knasmüller et al., 1997). Nel 2005 Javed et al., (2005), compararono i cambiamenti patologici in allevamenti di polli che erano stati alimentati con mangimi contaminati con FUM e MON. I risultati dimostrarono che la MON dava origine a fenomeni di ascite (accumulo di liquido nell'addome). Sono stati inoltre condotti degli studi riguardo l'influenza della MON nell'omeostasi cellulare in assenza o presenza di ENs e BEA (Kamyar et al., 2006); i risultati mostrarono che la MON non è in grado di modificare l'attività cardiaca ed il relativo potenziale. Questa micotossina non ha effetti né sulla

concentrazione intracellulare di ioni, né sul pH; è però in grado di ridurre la contrattilità dei muscoli papillari della parte terminale dell'ileo, nonché delle arterie. Non sono state riscontrate relazioni sinergiche tra MON ed altri metaboliti (Kamyar et al., 2006).

Nel 2008 Sharma et al., (2008), condussero delle ricerche sull'impatto che le molecole di MON avevano sui cambiamenti dei processi biochimici all'interno del sangue nei polli, i quali erano stati sottoposti all'esposizione di questa micotossina; furono analizzate le componenti del sangue come la transaminasi siero aspartato (AST), l'alanina transaminasi (ALT), le proteine totali del siero (TSP), l'albumina, il colesterolo e la creatinina, i quali valori riscontrati erano tutti superiori rispetto a quelli della tesi nella quale i capi di pollame non erano stati esposti alla MON. L'alterazione di questi parametri, causata dalla moniliformina, si tradusse in un incremento della mortalità pari al 20%. Inoltre, nel 2012, sono stati studiati da Ficheux et al., (2012), gli effetti inibitori che la molecola di MON ha sulla produzione di cellule dei globuli bianchi, globuli rossi e sulle piastrine: ne è emerso che questa tossina ha un effetto citotossico sulle cellule produttrici di globuli rossi, mentre non dimostra attività citotossica sulle altre linee cellulari. Recentemente Jonsson et al., (2013), ha riportato un'alta tossicità acuta della MON nei ratti, con una dose letale 50 (LD₅₀) pari a quella delle più tossiche *Fusarium*-tossine, come la T-2 e la HT-2. La moniliformina in seguito a tutti gli studi su di essa condotti, risulta essere una molecola dal forte potere tossico, i cui effetti non possono essere messi in discussione, in quanto oggetto di una forte e approfondita attività di ricerca in merito. L'EFSA (European Food Safety Authority) è attualmente al lavoro per arrivare a stabilire un'opinione scientifica riguardo al rischio per la salute pubblica dovuta alla presenza di MON negli alimenti della filiera food e feed (EFSA, 2010).

1.4.2. La beauvericina

La molecola di questa tossina ($C_{45}H_{57}N_3O_9$) ha un elevato peso molecolare, pari a 783,95; essa è composta da tre residui di acido α -idrossiisovalerico alternato con tre fenilalanine N-metilate (Desjardins, 2006), appartiene al gruppo degli esaciclodipeptidi, e la sua struttura è simile alla molecola delle ENs (Dobler et al., 1969).

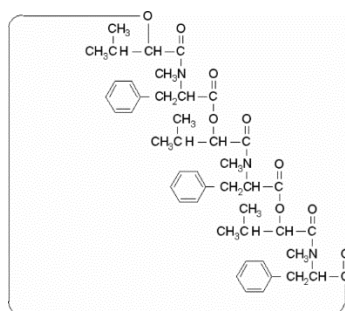


Figura 1.8. Struttura chimica della molecola di beauvericina. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/37012?lang=it®ion=IT>

È una tossina prodotta da funghi appartenenti al genere *Fusarium*; le specie più importanti produttrici di questa micotossina nel mais sono *F. subglutinans*, *F. proliferatum* (questi due sono anche i principali sintetizzatori di tale molecola) (Booth, 1971), *F. semitectum*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum* e *F. culmorum*. Tuttavia ci sono altre specie che producono questo composto attive nel frumento e cereali autunno-vernini quali *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. arthrosporioides* e lo stesso *F. poae*, quest'ultimo di nota importanza oltre che per la produzione di BEA nel mais anche in queste tipologie di cereali (Logrieco et al., 2006; Kokkonen et al., 2010).

La BEA non ha tossicità acuta, ma presenta una elevata citotossicità dovuta all'attività ionoforica e apoptotica (morte cellulare programmata). Questo tipo di attività oltre a causare danni diretti lascia presumere che vi sia una possibilità di interazione con altre *Fusarium*-tossine come DON, MON, FB₁ e FUP (Logrieco et al., 2006). La BEA induce la morte programmata delle cellule, simile all'apoptosi e causa citolisi accompagnata dalla frammentazione del DNA internucleosale. Questa tossina è conosciuta anche per le sue proprietà ionoforiche; questo le permette di interagire con le membrane lipidiche dei miociti ventricolari, creando dei canali cationici che possono interferire negativamente con la omeostasi ionica cellulare (Kouri et al., 2003). Questa molecola può essere facilmente incorporata all'interno delle membrane cellulari (Kouri et al., 2003a-2003b; Kamyar et al., 2004) e disturbare l'equilibrio ionico ed il pH cellulari (Kamyar et al., 2004 e 2006; Kouri et al.,

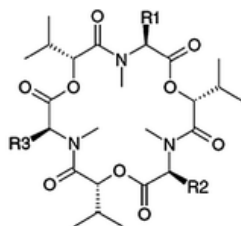
2003b e 2005), nonché danneggiare i mitocondri cellulari (Jow et al., 2004; Wätjen et al., 2009; Tonshin, 2010).

Nel 2002, Wu et al. (2002), esaminarono il meccanismo ionico attraverso il quale la molecola di BEA interagisce con i canali ionici nelle cellule neurali NG 108-15. I risultati mostrarono che questa molecola era in grado di inibire il flusso di corrente L-tipo del Ca^{++} (Wu et al., 2002), e di incrementare la quantità di ioni calcio intracellulare aumentando la formazione di canali cationici selettivi nelle membrane lipidiche. Nel 2003, Caló et al. (2004), studiarono gli effetti citotossici della molecola di BEA sulle cellule di mammifero. Furono usati due tipi di cellule, il tipo linfoma monocitico U-937 e le cellule della leucemia promielocitica HL-60; i risultati ottenuti mostrarono che queste cellule manifestarono un decremento di vitalità dopo un'esposizione della durata di 24 ore, confermando così, l'effetto citotossico (Caló et al., 2004). Furono condotte anche altre prove di laboratorio; ad esempio i linfociti contenuti nel sangue di tacchino furono esposti a varie micotossine, tra le quali anche la BEA, e dopo 72 ore si poteva osservare una diminuzione della proliferazione cellulare. Anche altri effetti tossici quali la frammentazione del DNA internucleosomale e la variazione nel processo morfologico di apoptosi sono imputabili a questo composto tossico che può portare alla soppressione della proliferazione cellulare e indurre l'apoptosi dei linfociti (Dombrink-Kurtzman, 2003). Inoltre la beauvericina presenta anche proprietà antibiotiche (Dobler et al., 1969), insetticide (Grove e Pople, 1980; Gupta et al., 1991), oltre alle già citate caratteristiche citotossiche (Ojcious et al., 1991; Caló et al., 2004; Jow et al., 2004; Ivanova et al., 2006).

Questa tossina è stata trovata come contaminante del mais in Italia, Austria, Polonia, Sud Africa e USA (Krska et al., 1997; Logrieco et al., 1993; Munkvold et al., 1998; Ritieni et al., 1997; Shephard et al., 1999). Tra i principali produttori citiamo il *F. poae*, anche se bisogna segnalare una certa importanza, nei cereali autunno-vernini, del *F. avenaceum* (Bottalico e Perrone, 2002; Jestoi et al., 2008; Logrieco et al., 2002; Somma et al., 2010; Thrane et al., 2004; Uhlig et al., 2006). Nonostante la bibliografia scientifica sia ricca di molti studi che dimostrano gli effetti nocivi di questa tossina, attualmente essa non è ancora stata sottoposta a normative che ne regolino i limiti massimi di esposizione.

1.4.3. Le enniatine

Queste tossine sono prodotte da diverse specie del genere *Fusarium*. La specie di maggior importanza sembra essere *F. avenaceum* per quanto riguarda i cereali autunno-vernini, mentre quella di maggior interesse per il mais sembra essere *F. poae*. Queste molecole (C₃₃H₅₇N₃O₉) sono dei depsipeptidi esa-ciclici (Zhukhlistova, Tishchenko, Tolstykh e Zenkova, 1999) e contengono tre residui di acido α -idrossiisovalerico, alternato con tre catene ramificate di amminoacidi N-metilati (Desjardins, 2006).



Enniatin	R1	R2	R3
A	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
A ₁	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
B	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
B ₁	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

Figura 1.9. Struttura chimica delle varie molecole delle enniatine e relative differenze tra di esse. Fonte: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/fo/c2fo00004k/unauth#!divAbstract>

La famiglia delle ENs annovera al suo interno almeno 23 differenti composti (Feifel et al., 2007), tra i quali quelli che più comunemente vengono ritrovati, sono le enniatine del gruppo B (EN-B) e del gruppo A (EN-A). Tra di esse le più studiate sono ENA, ENA₁, ENB, ENB₁, ENB₂, ENB₃ ed ENB₄; ENB₁ ed ENA₁ sono le molecole che con maggior frequenza vengono identificate nelle colture contaminate.

L'areale mediterraneo ed i paesi del Nord Africa sono caratterizzati da un clima che favorisce la crescita e lo sviluppo dei funghi tossigeni produttori di queste tossine. Analisi condotte su cereali coltivati in Spagna hanno portato alla luce che la frequenza di contaminazione da ENs si attestava all'89% per il mais, 62% per il frumento ed il 50% per l'orzo (Meca, 2010); incidenze similari sono state riscontrate anche in Marocco (Zinedine, 2011) ed in Tunisia (Oueslati, 2011).

Le specie responsabili della sintesi di queste tossine sono *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* e *F. temperatum* per quanto riguarda i maggiori produttori del mais. Altri funghi sintetizzatori di ENs che interessano le piante di mais e non solo sono *F. tricinctum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. arthrosporioides*, *F. auminatum* e *F. lateritium*.

Sono stati condotti differenti studi al fine di analizzare gli effetti delle ENs. Ivanova et al., (2006), hanno estratto e purificato alcune molecole come ENA, ENA₁, ENB, ENB₁, ENB₂ ed ENB₃ da colture

di riso colpite da *F. avenaceum*, testandone la tossicità su diversi tipi di cellule di origine umana. I risultati dimostrarono che la tossicità delle ENs è simile a quella del DON in un tipo di cellule sulle quali furono effettuati questi test. Inoltre la tossina ENB fu oggetto di test condotti su cellule (di tipo V79) di polmone prelevate dal maschio del criceto cinese, ed i risultati ottenuti, indicavano che questa molecola era in grado di incrementare il numero delle mutazioni cellulari e di produrre effetti genotossici (Föllmann et al., 2009). Altri studi effettuati su mitocondri isolati, dimostrarono che le ENs sono in grado di aggredire questi organelli e di compromettere l'omeostasi cellulare, modificandone l'equilibrio e la quantità di ioni potassio (Tonshin et al., 2010).

La citotossicità delle molecole ENA, ENA₁, ENA₂, ENB, ENB₁, ENB₄ ed ENJ₃ è stata comparata con cellule tumorali di tre patologie come l'adenocarcinoma dell'epitelio colon-rettale umano (CaCo-2), il carcinoma al colon umano (HT-29) ed il carcinoma al fegato umano (Hep-G2); i risultati mostrarono che le ENs possono esercitare effetti citotossici sulle cellule (Meca et al., 2011).

Queste tossine sono dotate anche di proprietà fungicide; sono stati condotti studi su ENs purificate estratte da *F. tricinctum*, contro altri funghi quali *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. proliferatum*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* e *Penicillium expansum*, ed i risultati evidenziarono che la tossina ENB era in grado di promuovere l'inibizione di alcuni generi, mentre le molecole ENB₁, ENA ed ENA₁ risultarono non tossiche sugli isolati ove furono testate (Meca et al., 2010a). Nel 2008 fu sviluppato un metodo di rilevamento delle tossine ENA, ENA₁, ENB ed ENB₁, basato sull'HPLC per esaminare il mais; fu dimostrato che la molecola tossica prevalente era la ENB e che quest'ultima risultava stabile nella fase di insilamento del mais (Sorensen et al., 2008). Nel 2010 Rasmussen et al. arrivarono alla stessa conclusione quando analizzarono 27 campioni di mais insilato. Negli anni 2004 e 2005 furono condotti dei test su campioni di uova finlandesi: fu dimostrato che tali uova erano state contaminate da ENs e BEA. Le enniatine ritrovate all'interno delle uova furono le sole ENB ed ENB₁ (che sono molto comuni in questo prodotto finlandese), mentre non fu trovata nessuna traccia di ENA ed ENA₁ (Jestoi et al., 2009).

Un'alta incidenza della contaminazione da ENs, in particolar modo di ENA₁, fu riscontrata in mais, frumento ed orzo coltivati in Spagna (Meca et al., 2010b), mentre Mahnine et al., (2011), riscontrarono una prevalenza di ENA₁ all'interno dei cereali da colazione in Marocco.

Le proprietà di queste tossine sono state largamente studiate e, nonostante siano a disposizione numerosi strumenti e metodi per l'individuazione di questi composti tossici nei vari substrati, ad oggi non esiste ancora una normativa atta al controllo della presenza negli alimenti delle enniatine.

1.4.4. Il fusarenone-X

Il fusarenone-x è una tossina che appartiene alla famiglia dei tricoteceni del gruppo B. La sua formula chimica è $C_{17}H_{22}O_8$ (massa molare 354,35), ed è identificata come 4-acetilnivalenolo (Thrane et al., 2004).

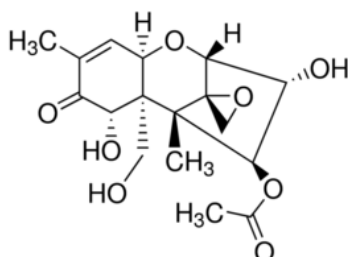


Figura 1.10. Struttura chimica della molecola di fusarenone-X. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/33438?lang=it®ion=IT>

Questo composto è sintetizzato attraverso il metabolismo secondario da alcune specie di funghi del genere *Fusarium* come *F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum* ed *F. equiseti*. Le prime due specie fungine sono anche quelle che rivestono un ruolo di primaria importanza per quanto riguarda la contaminazione delle colture di mais.

In uno studio condotto da Miura et al., (1998), fu iniettato del FUS-X intraperitonealmente su un topo, ed in seguito furono analizzati il timo e le relative cellule; fu osservato che questa molecola causava atrofia e la scomparsa dei timociti all'interno della corteccia timica. Nel 2003 Poapolathep et al., valutarono l'escrezione e la distribuzione all'interno dei tessuti, da parte del topo, delle tossine H3-NIV e H3-FUS-X; analizzandone la radioattività essi determinarono che la molecola di FUS-X è più tossica del NIV, in quanto il FUS-X è assorbito più facilmente dal tratto gastrointestinale rispetto al NIV, e dal fatto che la molecola di nivalenolo viene rapidamente convertita in FUS-X da parte del fegato e dei reni nei topi.

In seguito ai risultati ottenuti in queste prove, Poapolathep et al., (2008), incubarono la tossina FUS-X con frazioni di fegato e reni, globuli rossi e plasma di galli ed anatre. I risultati mostrarono che gli omogeneizzati di fegato e reni di anatra erano in grado di convertire il FUS-X in NIV in alti valori (98,95% il fegato e 94,32% i reni), mentre gli stessi organi dei galletti dimostrarono un tasso di conversione della molecola di FUS-X a NIV pari al 70,12% ad opera del fegato e del 94,39% dei reni (Poapolathep et al., 2008).

Nel 2006, 220 campioni composti da cereali di provenienza tedesca, cereali per prodotti alimentari, piante cerealicole, mais insilato e prodotti non cereali, furono analizzati e fu riscontrato un basso

grado di contaminazione all'interno degli stessi. Nei prodotti non cereali non è stata riscontrata la presenza di FUS-X (Schollenberger et al., 2006).

Nonostante i molteplici studi al riguardo sono necessarie ulteriori indagini di carattere scientifico per comprendere gli effetti che questa tossina ha sulla popolazione animale che si alimenta con prodotti contaminati da questo composto. Non esistono, a livello legislativo, delle normative che regolamentino i limiti per questa tossina.

1.4.5. Il nivalenolo

Questa tossina è una delle molecole più studiate ed appartiene ai tricoteceni del gruppo B. la sua formula chimica bruta è $C_{15}H_{20}O_7$, ed ha un peso molecolare pari a 312,32.

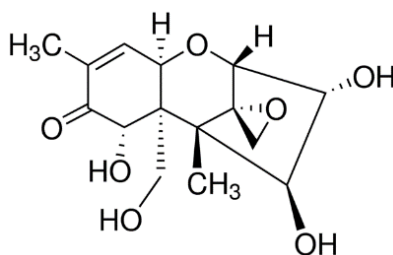


Figura 1.11. Struttura chimica della molecola di nivalenolo. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/34131?lang=it®ion=IT>

Questo composto è prodotto da alcune specie del genere *Fusarium* come *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. poae*. Delle specie appena citate le ultime tre rivestono un ruolo di assoluta importanza per quanto riguarda la produzione di NIV nelle colture di mais. Recentemente diversi studi e prove di campo hanno dimostrato la sempre crescente importanza che sta assumendo *F. poae* riguardo la capacità di sintetizzare questa molecola e la forte presenza che questo micopatogeno ha in diverse parti del pianeta.

Gli effetti tossici di questa molecola possono portare all'inibizione dello sviluppo delle cellule di tipo B e T (Forsell & Petska, 1985). Choi et al., (2000), dimostrarono che la molecola di NIV, nel siero del topo, potrebbe portare alla totale inibizione dell'antigene specifico IgE (anticorpo effettore nell'allergia). Inoltre questo composto è in grado di causare problematiche alla proliferazione cellulare e di indurre apoptosi nelle cellule tipo HL60 della leucemia promielocitica umana (Nagashima et al., 2006). Gli effetti di questa tossina furono studiati anche sulle cellule dei monociti

macrofagi del murino ed i risultati dimostrarono che questo metabolita esibì un forte effetto citotossico che porta ad un'accelerazione del percorso apoptico (Marzocco et al., 2009).

Il NIV è una tossina che è stata, ed è tutt'ora, largamente studiata; nonostante le note proprietà tossiche e le conseguenze a cui porta il suo consumo alimentare, ad oggi non ci sono normative che ne regolamentano i limiti massimi assumibili con la dieta.

1.4.6. La fusaproliferina

La fusaproliferina è un sesterterpene biciclico (formula bruta $C_{13}H_{14}O_5$ e peso molecolare pari a 250,25) che deriva da cinque unità isopreniche che contengono diversi centri chirali nella molecola (Santini et al., 1996). Questo composto tossico è di recente scoperta, infatti la sua identificazione e purificazione risale al 1997, ad opera di Ritieni e collaboratori (Ritieni et al., 1997).

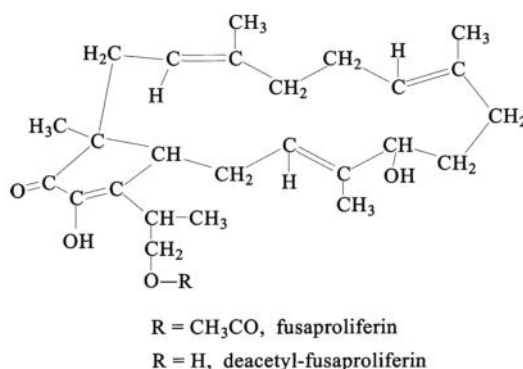


Figura 1.12. Struttura chimica della molecola di fusaproliferina. Fonte: WU X. AND SCOTT SMITH J.; (2007); A Gas Chromatography-Flame Ionization Detection Method for Detection of Fusaproliferin in Corn; J. Agric. Food Chem.,55, pp 3211-3216.

La concentrazione letale (LC₅₀) della FUP è pari a 53,4 μ M nei gamberetti di mare (*Artemia salina*), mentre la concentrazione citotossica sul 50% degli individui (CC₅₀) è di circa 70 μ M, testata su cellule di lepidottero (*Spodoptera frugiperda*) tipo SF-9 e 55 μ M su cellule linfociti-B non neoplastiche (tipo IARC/LCL 17) per l'essere umano (Logrieco et al., 1996).

Questa tossina è prodotta da alcune specie del genere *Fusarium* come *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *F. globosum*, *F. pseudocircinatum*, *F. pseudonygamai* e *F. guttiforme* (Wu et al., 2003). Essendo *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. subglutinans* molto comuni nelle colture contaminate del mais ed associati al marciume della spiga, questo composto è facilmente ritrovabile all'interno delle commodities derivanti da questo cereale (Logrieco et al., 2002). Come altre tossine anche la FUP ha degli effetti tossici sulle cellule vegetali. Essa infatti è in grado di

compromettere e danneggiare l'integrità e la funzionalità cellulare intaccando i processi biochimici. Uno studio condotto *in vivo* ed *in vitro* ha dimostrato che le cellule vegetali di mais trattate con FUP soffrono un decremento del trasporto degli elettroni, dando origine ad un'alterazione del potenziale di membrana, con conseguente diminuzione del contenuto di clorofilla (Nadubinská et al., 2003). Lo studio dimostrò che la quantità di clorofilla era leggermente diminuita nelle cellule trattate *in vitro* con FUP, mentre il contenuto di clorofilla-b era aumentato. Altre ricerche condotte su banana e mais, infettati con *F. verticillioides*, dimostrarono che lo sviluppo endofitico di questo patogeno porta ad una diminuzione della capacità fotosintetica dovuta alla riduzione del contenuto di clorofilla all'interno dei cloroplasti, nonché un peggioramento del trasporto degli elettroni nelle membrane tilaicoidali (Pinto et al., 2000), disturbando il corretto funzionamento del fotosistema II. Questa tossina può anche ricoprire un ruolo importante nello sviluppo di malattie attraverso l'interazione tra la molecola tossica della FUP e gli acidi nucleici durante il primo step della divisione cellulare nel meristema o durante lo sviluppo delle foglie.

Sugli animali la FUP induce effetti teratogeni, dicotomia cefalica, macrocefalia e può causare asimmetria negli embrioni di pollo (Ritieni et al., 1997). Questa tossina è stata riscontrata in commodities e colture di paesi europei come Italia e Slovacchia (Ritieni et al., 1997; Srobarova et al., 2002), in Sud Africa (Shephard et al., 1999) e negli USA (Placinta et al., 1999).

La fusaproliferina è una tossina che è tutt'ora in fase di studio, e come per altre tossine emergenti, in attesa di ulteriore materiale scientifico a riguardo; proprio per questo motivo non è regolamentata da apposite normative.

1.4.7. L'acido fusarico

L'acido fusarico ($C_{10}H_{13}NO_2$, peso molecolare 179,22) è conosciuto anche con il nome di acido 5-butilpicolinico. Recenti studi dimostrano che l'FA non è l'unica molecola del suo genere ad essere prodotta da funghi del genere *Fusarium*. Infatti la sintesi dell'acido fusarico è affiancata anche dalla produzione di altri composti quali l'acido fusarinolico (acido 10-idrossi fusarico) e l'acido deidrofusarico, descritti rispettivamente in passato, da Braun nel 1960 (e confermato successivamente da Pitel e Vining nel 1970) e da Stoll nel 1954.

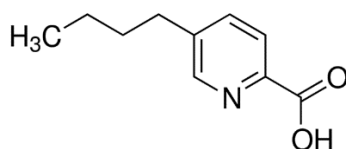


Figura 1.13. Struttura chimica della molecola dell'acido fusarico. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f6513?lang=it®ion=IT>

Questa micotossina è un metabolita secondario prodotto da diversi funghi del genere *Fusarium*, come *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. crookwellense*, *F. sambucinum*, *F. heterosporum*, *F. oxysporum* e *F. solani* (Bacon et al., 1996).

Questa molecola ha una bassa tossicità per gli animali e gli uomini, ma è dotata di alte proprietà fitotossiche. Infatti questo metabolita è tossico per varie piante, funghi, batteri e protozoi; nonostante tutto ciò, l'acido fusarico svolge anche attività farmacologiche (Wang e Ng, 1999).

Tra gli effetti tossici che questo composto ha, vi è ad esempio la capacità di inibire la dopamina- β -idrossilasi (Hidaka et al., 1969), causando effetti iposensitivi in differenti animali tra cui l'uomo (all'occorrenza questa proprietà può essere usata, a scopo farmacologico, contro la depressione, in virtù delle attività antidepressive dimostrate negli studi) (Wang e Ng, 1999), ed effetti negativi sui neurotrasmettitori del cervello e dell'epifisi (Porter et al., 1995). Tra gli effetti benefici invece che questa molecola può avere si riscontra l'efficacia contro l'*Acanthamoeba* (genere di amebe che possono provocare nell'uomo patologie a carico del sistema nervoso centrale e della cornea dell'occhio) (Booman et al., 2012) e contro la demenza HIV-1 (Ramautar et al., 2012); l'acido fusarico ha mostrato anche una marcata attività antitumorale contro l'adenocarcinoma del colon (Song e Yee, 2001).

1.4.8. Il diacetossiscirpenolo

Il DAS ($C_{19}H_{26}O_7$, peso molecolare 366,41), anche conosciuto con il nome di anguidina, è una tossina che appartiene ai tricoteceni del gruppo A (Omurtag et al., 2007).

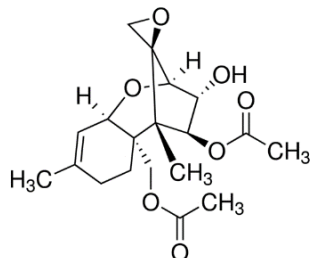


Figura 1.14. Struttura chimica della molecola di diacetossiscirpenolo. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/34137?lang=it®ion=IT>

Questo metabolita secondario è prodotto da diverse specie del genere *Fusarium* come *F. sambucinum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* e *F. poae*; quest'ultima probabilmente è la maggior specie produttrice di questo composto tossico.

Sono stati condotti numerosi studi con lo scopo di definire i maggiori effetti di questa tossina. Lautraite et al., (1997), studiarono la risposta delle cellule del cordone ombelicale umano e del midollo del ratto alla presenza del DAS. I risultati mostrarono che il sistema ematopoietico umano è estremamente sensibile a questa tossina (Lautraite et al., 1997). Inoltre, Ayril et al., (1992), esaminarono gli effetti in vitro della molecola di DAS su alcune funzioni dei macrofagi peritoneali del murino (specie di lemure) e determinarono, usando differenti concentrazioni di DAS e DON, che il DAS era in grado di sopprimere funzioni dei macrofagi peritoneali (Ayril et al., 1992).

Nel 1997, alcuni ricercatori dimostrarono che la tossicità del DAS è dovuta alla morte apoptotica delle cellule, inoltre viene arrestato il ciclo cellulare delle cellule umane Jurkat (linfoblasti T) (Jun et al., 2007).

Tutti questi studi dimostrano la tossicità e le conseguenze a cui sono sottoposti gli animali e gli esseri umani. Nonostante questo, ad oggi, non ci sono legislazioni a riguardo che regolamentino l'assunzione di alimenti contaminati da questa molecola.

1.4.9. Lo scirpentriolo

Questa molecola ($C_{15}H_{22}O_5$) appartiene ai tricoteceni del gruppo A ed uno dei produttori di questa tossina è *F. poae*.

Ademoyero e Hamilton, (1991a), studiarono gli effetti dello SCT e di altre micotossine nei maschi dei galletti, i quali erano stati alimentati con differenti dosi di micotossine per 21 giorni dopo la nascita. I risultati ottenuti mostrarono che le lesioni alla bocca causate da ogni micotossina erano dose-dipendenti, e le parti più colpite dallo SCT erano gli angli, le parti superiori ed inferiori del becco e la lingua; fu inoltre sviluppata una migliore conoscenza della tossicità dello scirpentriolo nel percorso dietetico dei galletti.

Un altro studio, condotto su questa specie animale riguardo il regime dietetico, prevedeva di somministrare a quattro gruppi di galletti dell'età di 10 giorni la tossina per una durata temporale di tre settimane in differenti dosi. Ne risultò che la dose minima effettiva per ridurre il tasso di crescita era pari a $4 \mu\text{g/g}$. Questa dose era sufficiente anche per alterare alcuni valori del sangue come la quantità di deidrogenasi lattica (LDH), le proteine totali dell'albumina, gli ioni Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{++} ed il colesterolo per citarne alcuni (Ademoyero e Hamilton, 1991b).

Nonostante ci siano molte ricerche che studiano la presenza di questo composto tossico in diversi substrati, è ancora necessario molto lavoro al fine di definire con maggiore certezza e precisione gli effetti derivanti dal consumo di alimenti contaminati dallo SCT; proprio in virtù del fatto che le conoscenze scientifiche sino ad oggi acquisite non soddisfano completamente, non è stata emanata alcuna legislazione che regolamenti l'esposizione a questa tossina.

1.4.10. Il neosolaniolo

Il NEO ($C_{19}H_{26}O_8$, peso molecolare pari a 382,4) è una tossina che appartiene ai tricoteceni del gruppo A.

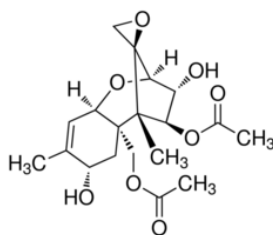


Figura 1.15. Struttura chimica della molecola di neosolaniolo. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/32932?lang=it®ion=IT>

È un metabolita secondario sintetizzato da specie fungine del genere *Fusarium*, ed i principali produttori sono *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* e *F. poae* (Logrieco et al., 2006).

Gli effetti di questa tossina sono stati studiati in piante ed animali che sono stati esposti al NEO in differenti concentrazioni. Nelle piante questa tossina ha mostrato effetti citotossici quando presente in alte concentrazioni (5000 ng/g), mentre negli animali questa tossina ha causato la morte di tutti gli uccelli che sono stati alimentati con mangimi contaminati entro 7 giorni o meno dall'esposizione stessa, con differenti livelli di NEO compresi tra 310 e 2060 ng/g (Lamprecht et al., 1989).

Anche questa micotossina non è sottoposta a normative che ne regolamentino l'esposizione ed il consumo.

1.4.11. Altre micotossine secondarie

Tra le varie tossine emergenti, oltre a quelle precedentemente riportate e di maggior importanza, ve ne sono altre di meritevole attenzione: esse sono il Butelonide (BUT), la culmorina (CULM), il ciclonerodiolo e la Fusarina-C.

Butelonide

Questo composto ($C_4H_4O_2$, peso molecolare 84,07) è un lattone dell'acido 4-acetamido-4-idrossi-2-butenico.

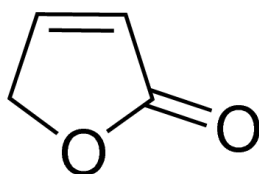


Figura 1.16. Struttura chimica della molecola di butelonide. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/283754?lang=it®ion=IT>

Il BUT è stato associato ad una patologia del bestiame caratterizzata da edema, zoppia e perdita delle estremità degli arti per cancrena (Desjardins, 2006; Desjardins e Proctor, 2007). Questa tossina è dotata di una tossicità moderata sui topi, con una dose letale 50% (LD₅₀) di 44 mg per kg di peso corporeo tramite iniezione intraperitoneale, ed una tossicità orale (LD₅₀) di 275 mg/kg di peso corporeo (Yates et al., 1969).

Culmorina (CULM)

Questa tossina ($C_{15}H_{26}O_2$ e peso molecolare 283,37) è un diolo sesquiterpene, e *F. poae* è un produttore di questa molecola (De Nijs et al., 1996; Desjardins, 2006).

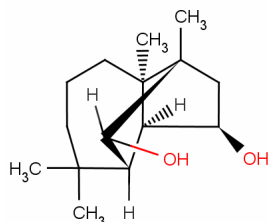


Figura 1.17. Struttura chimica della molecola di culmorina. Fonte: <http://www.chemnet.com/cas/en/18374-83-9/culmorin.html>

Studi condotti in campo hanno dimostrato che la culmorina è in grado di inibire l'allungamento del coleoptile di diverse cultivar di frumento, ma solo a concentrazioni che variano da 100 μ M a 1 mM (Wang e Miller, 1988).

Ciclonerodiolo

Questo composto ($C_{15}H_{28}O_2$) è prodotto da *F. poae* ed è un diolo sesquiterpene, la cui tossicità è sconosciuta (Desjardins, 2006).

Fusarina-C

Il consumo di granaglie contaminate con questa micotossina è stata associata a patologie nell'essere umano (Desjardins, 2006). Diversi studi hanno dimostrato che la fusarina-C ($C_{23}H_{29}NO_7$) è un metabolita mutagenico la cui tossicità è comparabile con altri composti mutageni come ad esempio l'aflatossina B₁ e la sterigmatocistina (Gelderblom et al., 1984).

Altre micotossine da citare e di recente interesse sono la patulina, la citrinina, la bikaverina ($C_{20}H_{14}O_8$, mm 382,32), l'equisetina ($C_{22}H_{31}NO_4$, mm 373,5) e l'aurofusarina ($C_{30}H_{18}O_{12}$, mm 570,5). Ad oggi queste tossine emergenti non sono state studiate in maniera così approfondita; molte altre ricerche devono essere eseguite al riguardo, al fine di appurare la loro tossicità e pericolosità per gli

animali e gli esseri umani. Questo perché, nonostante tutti questi composti non suscitino un interesse immediato nel prossimo futuro, come dimostrano studi e ricerche del presente, saranno sempre più presenti e la loro incidenza sarà sempre maggiore nelle nostre colture e nei prodotti alimentari che da esse si ricavano; sarà quindi necessario avere a disposizione una nutrita conoscenza scientifica a riguardo, che ci permetterà di arginare le contaminazioni che i patogeni responsabili della sintesi di questi metaboliti apporteranno alle specie vegetali di nostro interesse.

1.5. I funghi micotossigeni

1.5.1. Il Genere *Fusarium*

La classificazione di questo genere fungino, da un punto di vista tassonomico è così strutturata: phylum *Ascomycota* >> classe *Sordariomycetes* >> ordine *Hypocreales* >> famiglia *Nectriaceae* >> genere *Fusarium*. All'interno di questo genere sono racchiuse numerose specie, patologicamente interessanti e studiate, in quanto artefici di attacchi e di danni che esse arrecano a molte specie vegetali tra cui *Zea mays*. Nello specifico verranno presi in considerazione tutti quegli aspetti che interessano le piante coltivate dall'uomo, e che esso sfrutta come fonte di alimentazione e di materie prime per la produzione industriale.

I danni e le alterazioni che questi patogeni sono in grado di causare negli individui colpiti, interessano gli apparati radicali, il fusto (e conseguentemente il sistema xilematico), le parti erbacee nonché, di vitale importanza, le strutture riproduttive: è proprio sotto questo aspetto che vengono presi in considerazione quei funghi che, nel mais, attaccano la spiga e le cariossidi (questa patologia prende il nome di fusariosi della spiga o FHB, che significa *Fusarium Head Blight*, utilizzando una terminologia anglosassone).

Essa si sviluppa particolarmente in aree umide e semi-umide (Schroeder e Christensen, 1963). La FHB è una patologia che colpisce la pianta quando questa si trova in campo, tuttavia essa può proseguire anche a raccolta avvenuta se la granella non viene asciugata prima dello stoccaggio. Questa malattia colpendo la spiga è in grado, oltre a causare l'accumulo di metaboliti tossici, di arrecare danni come la riduzione del peso delle cariossidi portando ad una conseguente diminuzione della resa. Se attaccate allo stadio di giovani plantule, i danni che ne derivano in seguito all'infezione da questi patogeni è una minore vigoria vegetativa o una riduzione della germinazione qualora le cariossidi seminate fossero infette. In Argentina, durante la fine degli anni '60, diverse

epidemie di FHB, di differente severità, hanno colpito l'area di produzione del frumento del Centro-Nord del Paese, dove la media delle perdite è stata stimata tra il 20 ed il 50%. In Cina questa patologia ha colpito più di 7 milioni di ettari di frumento causando perdite di prodotto per più di un milione di tonnellate nel momento di maggiore gravità dell'epidemia (Leonard e Bushnell, 2003), mentre negli Stati Uniti le perdite stimate sono state di 70 milioni di tonnellate durante la sola epidemia del 1993. Inoltre nel periodo compreso tra il 1998 ed il 2002, si verificò una seconda epidemia nella fascia di coltivazione nel nord del Paese e negli Stati Uniti centrali, durante la quale i danni apportati dalle perdite a tutti i raccolti, sono arrivati alla cifra di 2,7 miliardi di dollari (Nganje et al., 2002; Leonard e Bushnell, 2003). L'importanza delle specie di *Fusarium* che causano la FHB è incrementata specialmente nelle regioni temperate, creando grandi problemi economici (Parry et al., 1995; Langseth et al., 1999; Placinta et al., 1999).

Ogni specie di *Fusarium* richiede esigenze climatiche ben precise per poter portare a termine l'intero ciclo ed esprimere il massimo potenziale tossicologico. Questo fa sì che la presenza di questi patogeni sia praticamente ubiquitaria, ovvero siano presenti in tutte le zone del globo ove vi siano aree di interesse maidicolo. Ad esempio, nel nostro Paese, ed in particolare in Italia Settentrionale, le specie di maggior diffusione sono *F. verticillioides* e *F. graminearum*, seguiti da *F. culmorum*, *F. poae* e *F. sporotrichioides* (Blandino et al., 2010).

I patogeni del genere *Fusarium* non tollerano la siccità e le alte temperature; prediligono climi temperati, in quanto il range di temperatura varia indicativamente dai 4 ai 36°C, con una fascia all'interno della quale si colloca l'optimum di crescita compresa tra i 22 ed i 28°C e condizioni di forte umidità (superiore al 90%), mentre i valori di aw^1 minimi sono pari a 0,87, con un optimum intorno a 0,96-0,98 (Causin, 2006). Questi funghi sono presenti nel suolo (per questo motivo sono definiti soil-borne) e sono in grado di vivere, anche per diversi mesi, all'interno dei residui colturali di piante precedentemente infettate, comportandosi come saprofiti, ovvero cibandosi di tessuti morti ed in via di decomposizione (Parry et al., 1995). Anche se l'ambiente è noto per giocare un ruolo di primaria importanza nello sviluppo della FHB, questa relazione è complessa e solo parzialmente compresa (Xu, 2003). Si pensa che la distribuzione e la predominanza delle specie di

¹ Aw significa "activity water", ed è un coefficiente che misura "l'attività dell'acqua", ovvero intendibile come la quantificazione della disponibilità dell'acqua per lo sviluppo dei microrganismi. $Aw=1$ significa che tutta l'acqua presente è disponibile, $aw<1$ significa che parte dell'acqua è "impegnata" per trattenere in soluzione sostanze come zuccheri, sali, ecc...; si parla quindi di legame osmotico. Tale acqua può anche però essere trattenuta per l'effetto di superficie dalla matrice in cui si sviluppa il microrganismo ed è chiamata "legame di matrice". Solitamente con $aw<0,70$ lo sviluppo dei funghi si arresta, con $aw=0,6$ si ha una forte inibizione dell'azione enzimatica, mentre la stessa si arresta con aw prossime allo 0,3. Per i batteri invece vi è necessità di una aw minima maggiore, vale a dirsi pari allo 0,8 (Causin, 2006).

Fusarium in una regione sia determinata da un'interazione tra fattori climatici (es. temperature e umidità), competizione tra le varie specie di *Fusarium*, uso di fertilizzanti, sequenza di rotazione colturale e le lavorazioni del terreno utilizzate (Snyder e Nash, 1968; Nelson et al., 1981; Saremi et al., 1999; Doohan et al., 2003).

L'impatto che le infezioni di questi patogeni hanno, assumono importanza non solo per i danni diretti che esse apportano come minare produttività e resa delle colture, ma rivestono una fortissima importanza in quanto questi funghi sono produttori di tossine, sostanze pericolose per gli animali e gli uomini. Tra le molecole tossiche di maggior importanza, che i funghi appartenenti a questo genere sintetizzano, ci sono le fumonisine (FUM), i tricoteceni (TRI) e gli zearalenoni (ZEA) (Desjardins e Proctor, 2007).

1.5.1.1. I principali agenti del Marciume Rosa

F. verticillioides

Lo sviluppo di *F. verticillioides* (in precedenza noto anche come *F. moniliforme*) è favorito da temperature miti, anche se non troppo fresche; l'optimum di crescita viene individuato tra i 22,5 ed i 27,5°C, mentre la temperatura minima di crescita oscilla tra i 2,5 ed i 5°C, quella massima arriva a valori di 32-37°C, limite oltre il quale lo sviluppo del fungo è fortemente compromesso. Tuttavia in base all'areale di provenienza, sono stati riscontrati sensibili differenze; ad esempio i ceppi isolati all'interno di climi più caldi hanno un optimum di sviluppo che si aggira sui 30°C (Causin, 2006).

Come tutti i funghi patogeni del genere *Fusarium*, *F. verticillioides* necessita di una forte umidità relativa dell'aria, intorno al 90% ed è molto esigente anche per quanto riguarda l'aw, infatti sebbene riesca comunque a sopravvivere con valori di aw di 0,87-0,88, il massimo accrescimento si verifica con indici compresi tra 0,96 e 0,98.

La germinazione delle spore avviene tra i 4 ed i 37°C, con una temperatura ottimale che si attesta sui 25°C circa. L'umidità relativa dell'aria, affinché si verifichi la germinazione delle spore, deve essere maggiore dell'87%, con un optimum di quasi il 100%, mentre l'aw minima richiesta è di 0,88, anche se la massima efficienza germinativa si ha con coefficienti di aw di circa 1 (Torres et al., 2003). Per quanto riguarda invece la produzione di fumonisine, le condizioni termiche ideali si hanno all'interno dell'intervallo tra i 15 ed i 30°C, con un indice di aw di 0,98.

Modalità d'infezione di *F. verticillioides*

Questo patogeno dispone sostanzialmente di quattro modalità per infettare le piante di *Zea mays*. Esse sono (Munkvold, 2003):

- *Seme endofiticamente infetto*: le cariossidi che vengono utilizzate per la semina apparentemente risultano di aspetto strano, ma al loro interno invece è presente *F. verticillioides*. Una volta seminate le cariossidi, il fungo proseguirà il suo sviluppo endofitico sino ad arrivare a colonizzare, sempre per via endofitica, la spiga e le relative cariossidi. Questo fenomeno si verifica in maniera del tutto asintomatica in piante prive di stress ed in buone condizioni vegetative, in quanto *F. verticillioides*, essendo dotato di scarsa virulenza, non dà origine a strutture visibili. In questa situazione il patogeno sintetizza ugualmente FUM e di conseguenza la granella prodotta, anche se apparentemente sana, contiene tossine con livelli sempre maggiori man mano che la pianta si viene a trovare in condizioni vegetative di crescente stress o non ottimali.
- *Inoculo*: la presenza nel terreno di propaguli che si conservano nei residui colturali e che possono poi dare origine a infezioni di carattere endofitico attraverso le radichette delle plantule. *F. verticillioides* per diffondersi, utilizza principalmente macroconidi, i quali hanno dimensioni ridotte rispetto ad altri propaguli e sono prodotti in quantità molto elevate, nonché di facile trasporto (Munkvold, 2003).
- *Attraverso le sete*: l'infezione è causata dai conidi che si sono sviluppati sui residui colturali infetti, presenti nel terreno dalle precedenti colture. I conidi vengono liberati nell'aria e da essa trasportati sino alle infiorescenze femminili. Si tratta di una delle principali vie d'ingresso del patogeno. *F. verticillioides* è dotato di ottime capacità saprofitarie, di conseguenza, maggiore sarà lo stato di senescenza delle sete e maggiore sarà la facilità con cui il fungo sarà in grado di penetrarvi, accrescendosi all'interno, diffondendosi poi sino ad arrivare alla spiga ed alle cariossidi, dando così origine ad un'infezione di carattere endofitico (Headrick et al., 1990; Causin et al., 2009; Mazzoni et al., 2011). La spiga risulterà, a prima vista sana, ma in realtà conterrà fumonisine in quantità tanto superiore quanto la pianta avrà attraversato periodi di condizioni fitness non ottimali, quali stress idrici, nutrizionali e

climatici. Qualora la pianta fosse sottoposta a considerevoli stress, vi siano lesioni alle cariossidi o si presentino condizioni ambientali particolarmente favorevoli per il fungo e sfavorevoli alla pianta, il patogeno può dare origine a sintomi visibili quali marciumi rosa della spiga denominata fusariosi (conosciuta anche con l'acronimo inglese FHB ovvero *Fusarium Head Blight*). Alcuni studiosi pensano che proprio le sete costituiscano le principali vie d'ingresso a d'infezione per *F. verticillioides* (Causin, 2006). Il periodo più delicato per gli attacchi da parte di questo patogeno è quello che viene indicato come tarda fioritura.

- *Ad opera della piralide*: come conseguenza agli attacchi degli insetti minatori (*O. nubilalis* è la maggior responsabile nei nostri areali), i quali provocando danni e rosure alla pianta offrono un ottimo veicolo d'infezione, in quanto *F. verticillioides* sfrutta proprio queste vie d'entrata per penetrare ed aggredire la pianta. Inoltre le larve di questi insetti trasportano direttamente sul proprio corpo i conidi del patogeno garantendone un'ampia diffusione. L'attacco di questo insetto è anche origine di forti stress alla pianta, e questo facilita l'azione aggressiva del patogeno e la produzione di FUM, in quanto l'individuo vegetale di *Zea mays* oppone meno resistenza (Causin, 2006).

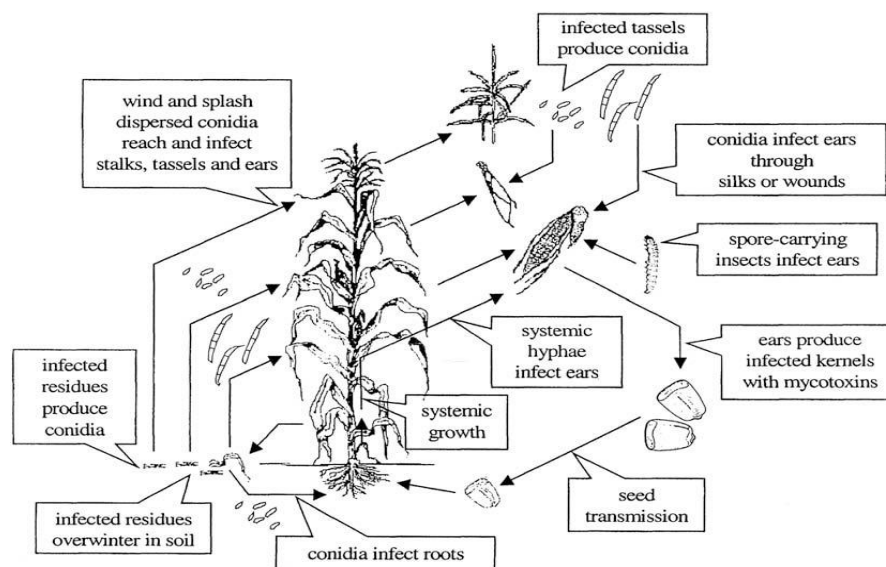


Figura 1.18. Sistema Patologico Mais- *F. verticillioides* - Piralide (*Ostrinia nubilalis*) (Battilani et al., 2003)

Si stima che questo insetto sia responsabile del 50% ed oltre delle FUM presenti nella granella. Le infezioni di *F. verticillioides* possono verificarsi anche in periodi temporali che succedono alla fioritura, sino al momento della raccolta compresa, in quanto le larve di questo insetto causano, come detto in precedenza, fori e rosure le quali sono ottime vie

d'ingresso per il fungo. Tuttavia anche la presenza di lesioni causate da eventi atmosferici come la grandine, e dagli uccelli, costituiscono una via d'ingresso per il patogeno. Combattere la piralide e gli insetti minatori in generale è di fondamentale importanza per riuscire a controllare le infezioni e la diffusione di *F. verticillioides*.

Sintomi del marciume rosa

Questa patologia colpisce più frequentemente la parte apicale della spiga, tuttavia non sono rari anche attacchi alla parte centrale o basale e, nei casi più gravi, viene interessata l'intera spiga.

La muffa si sviluppa sia sulle cariossidi che tra di loro, e può colpire porzioni più o meno estese o essere concentrata, coprendo una superficie che interessa anche solo poche cariossidi (Causin, 2006).

Il colore che essa assume è inizialmente bianco, per evolversi successivamente e virare ai colori rosato-bianco o salmone con il passare del tempo, sino a presentare anche sfumature di color lavanda.



Figura 1.19. a) micelio di *F. verticillioides* su spiga di mais. Fonte: http://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/MAIS_SICUREZZA_ALIMENTARE/Mais_Cap.%201.pdf **b) cariossidi colpite da *F. verticillioides*.** Fonte: http://tesi.cab.unipd.it/44234/1/Gemetto_Elisa.pdf

Qualora le cariossidi non manifestino muffa, possono presentare un altro sintomo chiamato starburst; visibilmente si osservano dipartire, dal punto in cui la seta era inserita nella cariosside, delle striature di color bianco.



Figura 1.20. Sintomo cosiddetto “starburst” che colpisce le cariossidi di mais. Fonte: http://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/MAIS_SICUREZZA_ALIMENTARE/Mais_Cap.%201.pdf

Esse rappresentano le vie di accrescimento del fungo penetrato e sviluppatosi dalla seta sino all'interno della cariosside. Il fungo crescendo interrompe l'endosperma vitreo della cariosside, che solcato da piccoli cunicoli contenenti aria, dà origine a questa diramazione a stella di color biancastro (Causin, 2006). La presenza di aria interrompe la trasparenza del pericarpo, precludendo così, la possibilità di vedere lo strato di aleurone di colore giallo al di sotto del pericarpo stesso (Causin, 2006). Questo sintomo si osserva soprattutto in campi di mais irriguo ed indica che vi è un importante accumulo di micotossine, in particolar modo di FUM.

Ritardare la raccolta è negativo, in quanto le spighe permangono in campo a ciclo vegetativo ultimato, situazione che rende la coltura facilmente attaccabile da *F. verticillioides* grazie alle condizioni climatiche. Questo favorisce un accumulo di fumonisine continuo, sino a quando l'umidità della granella non si assesterà a valori al di sotto del 20% almeno.

È stato notato che anticipare l'epoca di semina porta a vantaggi non indifferenti, in quanto si anticipa così tutto il ciclo vegetativo evitando anche una permanenza in campo con condizioni ambientali favorevoli al patogeno. Al contrario, situazioni che allungano il ciclo, così come ibridi classi FAO elevate, sono da evitare.

F. verticillioides è rilevabile nelle cariossidi già nella fase di maturazione lattea e con un'umidità della granella di circa il 20%.

F. proliferatum

Il *F. proliferatum* è, insieme a *F. verticillioides*, a *F. subglutinans* (anche se quest'ultimo in maniera minore) ed a *F. temperatum*, uno dei principali agenti del marciume rosa della spiga (Causin, 2006). Come per *F. verticillioides*, anche per *F. proliferatum* le condizioni di sviluppo sono quelle di un clima

temperato-umido, con temperature ottimali comprese tra 22,5 e 27,5°C, un'umidità relativa dell'aria pari al 91% ed una aw che varia da 0,87 a 0,99.

Tuttavia il range di sviluppo di questo patogeno è compreso tra 2-5°C e 32-37°C, a seconda dell'areale di origine del ceppo e di altri fattori concorrenziali all'instaurarsi del patosistema. Per quanto riguarda le varie modalità d'ingresso e le sintomatologie che esso provoca vale quanto detto per *F. verticillioides*.

F. temperatum

Questo patogeno è stato isolato per la prima volta in Belgio. Esso è morfologicamente simile e filogeneticamente strettamente correlato con *F. subglutinans* ed appartiene al complesso delle specie *Gibberella fujikuroi*. *F. temperatum* è in grado di causare malformazioni delle pianticelle e marciume degli stocchi, in condizioni controllate, come ad esempio quelle che si trovano in serra. Questo fungo entra a far parte del complesso fungino che dà origine al cosiddetto marciume rosa della spiga o PER. Studi hanno dimostrato come questo patogeno sia in grado di produrre diverse micotossine come MON, BEA, ENs e FB₁ (Scauflaire et al., 2012).

F. temperatum è stata una delle cinque specie di *Fusarium* maggiormente attiva nell'infezione alle colture di mais in Belgio, avendo colpito ed infettato sino al 10% delle piante al termine della stagione di crescita (Scauflaire et al., 2011b). All'interno di questo studio fu riscontrato che il rapporto tra *F. temperatum* e *F. subglutinans* era indicativamente di 30:1; questo lascia presumere che *F. temperatum* sia in grado di competere con *F. subglutinans* per poter predominare all'interno della coltivazione. Questo fatto tende a supportare l'ipotesi di Moretti et al., (2008), secondo la quale fu osservato che in Europa, *F. subglutinans* tende ad essere presente in regioni più calde ed asciutte, mentre *F. temperatum* tenderebbe a mostrare una maggiore presenza in aree che riportano un clima moderatamente fresco ed umido (Moretti et al., 2008). Infatti la maggior parte dei ceppi di *F. temperatum* non-europei sono stati trovati in regioni temperate del Sud Africa, USA, Messico e Guatemala (Scauflaire et al., 2011a).

Questo patogeno, come accennato in precedenza, può dar origine a visibili lesioni necrotiche degli stocchi, con sviluppo di micelio; inoltre *F. temperatum* è in grado di inibire la crescita della pianticella e l'allungamento dei germogli e di causare sintomi di clorosi.

Questo fungo ricopre quindi un'importante ruolo nello sviluppo di patologie necrotiche, nonché sotto il profilo tossicologico, per quanto riguarda la contaminazione delle cariossidi. Uno studio

condotto da Scauflaire et al., (2012), mette in evidenza come *F. temperatum* sia un forte produttore di BEA e MON principalmente ed in minor quantità di ENs e FB₁.

F. temperatum appartiene alla famiglia dei miceti cosiddetti soil-borne in quanto è in grado di mantenersi attivo, attraverso le strutture di conservazione, nei residui colturali infetti.

Una forte presenza ed importanti attacchi condotti da questo patogeno sono stati riscontrati in Spagna, in Polonia e nel nord della Cina (Pintos Varela et al., 2013; Czembor et al., 2014; Zhang et al., 2014).

F.subglutinans

Anche questo fungo fa parte di quei miceti che sono responsabili della patologia denominata marciume rosa della spiga.

Come *F. temperatum*, anche *F. subglutinans* appartiene al complesso *Gibberella fujikuroi* (Desjardins, 2000). Questo patogeno è in grado di sintetizzare diverse micotossine, tra le quali le principali sono la MON (Logrieco et al., 2002), la BEA (Logrieco et al., 1993; Moretti et al., 1995 e 1997) e la FUP (Logrieco et al., 2002).

F. subglutinans predilige un intervallo di temperatura che è compreso tra i 18 ed i 24°C (SIGA INTA, 2014; Torres et al., 2001).

1.5.1.2. I principali agenti del Marciume Rosso

F. graminearum* e *F. culmorum

Questi due funghi del genere *Fusarium* sono i principali agenti del marciume rosso della spiga di mais (RER= red ear rot); essi sono inclusi tra i più importanti produttori di tricoteceni quali DON e NIV per citare i più studiati e conosciuti, e di zearalenoni.

F. graminearum

F. graminearum, rispetto a *F. verticillioides*, preferisce temperature leggermente più fresche, anche se i valori non si discostano molto da *F. verticillioides*, infatti l'optimum di crescita si attesta tra i 24 e 26°C (mentre la crescita è fortemente compromessa al di sopra dei 35°C), e una percentuale di

umidità relativa dell'aria che si attesta sul 94%, nonché una aw minima dello 0,9, al fine di poter avviare il processo di sviluppo.

Il presente micete è considerato un patogeno principale del mais in quanto è in grado di causare il marciume dello stocco causando una patologia denominata “mal del piede”, tipico marciume del culmo, con striature e venature rosso intenso dovute alla presenza di muffa. Questo causa l'indebolimento e la disgregazione del culmo della pianta che diventa così soggetta ad allettamento.



Figura 1.21. Stocco di mais colpito dagli agenti patogeni responsabili del marciume rosso. Fonte: <http://www.omafr.gov.on.ca/english/crops/pub811/14corn.htm>

F. graminearum può attaccare la pianta anche se non sono presenti evidenti stati di stress indotti da deficit, traendo vantaggio da quegli individui vegetali che si trovano in uno stato particolarmente rigoglioso, quindi con tessuti succulenti protetti da cuticole ed epidermide non troppo spessi (tipica condizione che si instaura in colture soggette ad una eccessiva concimazione azotata).

Come *F. verticillioides*, anche *F. graminearum* presenta importanti capacità saprofitarie, ed è in grado di conservarsi sui residui vegetali infetti (questo fungo è in grado di sopravvivere anche su residui vegetali di soia, coltura per la quale comunque non rappresenta una grossa problematica; va però considerato questo aspetto per quanto riguarda la strutturazione degli avvicendamenti colturali). Interrando tali residui, il beneficio che si ottiene è una forte diminuzione del potenziale inoculo, senza tuttavia riuscire a causarne la completa scomparsa od una forte devitalizzazione dei propaguli² in modo tale da non costituire un pericolo in quanto fonte d'inoculo per le successive colture di mais; solitamente questo avviene in un periodo di tempo compreso tra uno e tre anni. Per questo motivo in aree fortemente interessate dalla presenza di questo patogeno è consigliabile

² Trattasi di periteci, ovvero fruttificazioni gamiche contenenti ascospore (prodotte dalla forma sessuata di *F. graminearum* che prende il nome di *Gibberella zae*), già presenti in autunno, anche se quest'ultime non sono mature, che però con l'arrivo della stagione favorevole, tali ascospore maturano. Queste strutture possono essere affiancate dalla presenza di macro e microconidi.

eseguire operazioni colturali che garantiscano un buon interrimento dei residui vegetali (sono quindi assolutamente sconsigliate lavorazioni quali minimum-tillage o no-tillage) ed attuare un processo di avvicendamento che non preveda il ritorno del mais su tali terreni per almeno tre anni (Causin, 2006), in quanto *F. graminearum* sopravvive in condizioni saprofitiche tramite i periteci che possono permanere vitali sulle cariossidi in campo sino a 16 mesi e per 23 mesi sulla paglia (Pereyra et al., 2004). Anche i macroconidi permangono per lunghi periodi, sino a 3 anni, su tali residui (Konga e Sutton, 1988).

I propaguli che si trovano nei residui colturali sono dispersi nell'ambiente grazie all'aria ed alla pioggia tramite gli schizzi (denominato "effetto splash"). Una volta giunti sulle setole, queste strutture di conservazione germinano dando origine a delle ife, le quali, accrescendosi all'interno delle setole stesse (che essendo giovani e succulente si trovano in uno stato particolarmente suscettibile), arrivano poi ad infettare le cariossidi che si stanno formando. Anche le condizioni ambientali aiutano *F. graminearum* ad infettare l'ospite; esse infatti essendo caratterizzate, dato il periodo stagionale, da temperature fresche e piogge frequenti di ridotta entità ed intensità, creano le condizioni di umidità ideali. I macroconidi vengono prodotti per via asessuale da strutture che prendono il nome di sporodochi, che si trovano sui residui colturali e su spighe infette (Parry et al., 1995); questi poi sono dispersi ad opera della pioggia ed interessano l'infezione secondaria delle spighe. I periteci si formano in primavera grazie a piogge che superano i 5 mm sui residui colturali che sono infetti (Inch e Gilbert, 2003). La temperatura richiesta per la formazione di queste strutture è di 29°C, invece la temperatura ideale per la formazione e la maturazione delle ascospore oscilla tra i 25 ed i 28°C (Doohan et al., 2003). Con l'aumentare dell'umidità relativa e l'abbassamento delle temperature queste ascospore vengono liberate (Doohan et al., 2003). L'optimum termico che favorisce il rilascio delle ascospore è racchiuso in un intervallo compreso tra i 10 ed i 30°C; il vento poi provvede alla diffusa dispersione. Questo processo e le relative ascospore possono essere considerati la più significativa fonte di inoculo primario (Trail et al., 2002), in quanto essendo trasportate dal vento anche a grosse distanze, esse assumono un ruolo di maggiore importanza rispetto ai macroconidi che sono invece dispersi, come visto, dalla pioggia (Trail et al., 2002). Le ascospore così giunte sulle setole germinano; esse per germinare hanno bisogno di un'umidità relativa inferiore rispetto a quella di cui necessitano i macroconidi, ovvero pari al 53% minimo, mentre quest'ultimi (i macroconidi) richiedono un'umidità minima pari all'80% (Beyer et al., 2005). Il procedimento di germinazione delle ascospore segue un andamento proporzionale all'aumentare del tasso di umidità relativa; esse infatti iniziano a germinare con un valore di UR pari al 53% (al di sotto di esso non si avvia il processo

di germinazione), poi con l'aumentare del valore di UR sino all'84%, si assiste ad una sempre crescente germinazione, per arrivare alla quasi totalità di spore germinate una volta superato tale valore (Beyer et al., 2005). Per quanto riguarda la temperatura, essa interessa per il tempo che le spore impiegano a germinare; Beyer et al., evidenziano come, durante i loro studi, a temperature di 4°, 14°, 20° e 30°C, il 50% delle ascospore germi rispettivamente in 26,9 ore, 10,4 ore, 3,44 ore e 3,31 ore. Tramite successivi studi hanno anche dimostrato che le infezioni causate da macroconidi sono responsabili di un accumulo di DON maggiore rispetto alle infezioni derivanti da ascospore; questo perché esse sono prodotte in quantità numericamente minori rispetto ai conidi, i quali in condizioni di alta umidità, sono in grado di dare origine ad un'infezione di massa di maggiore severità e gravità, originando conseguentemente una maggiore biosintesi ed accumulo di DON all'interno della granella.

La fase dell'antesi è quella in cui l'infezione è massima, infatti all'interno di questa finestra temporale le temperature sono favorevoli alla germinazione delle ascospore. Il *F. graminearum* è un fungo monociclico, ciò significa che sostiene solo un ciclo sessuale, mentre gli altri sono asessuali e danno origine a soli macroconidi (Dill-Macky e Jones, 2000). Anche la patologia da esso generata compie un solo ciclo all'anno (con maggiore impatto all'antesi, periodo di massima produzione delle ascospore). Anche i conidi possono dare origine all'infezione solo se si presentano le condizioni ambientali ideali, in particolar modo per quanto riguarda il tasso di umidità relativa. Con l'evolversi, poi questa infezione si trasforma in marciume rosso, e qualora le condizioni ambientali sopra descritte si protraggano sino alla fioritura e oltre, vi sarà una forte incidenza di questa patologia (Causin, 2006).

Sintomi del Marciume Rosso

La sintomatologia del marciume rosso si manifesta con lo sviluppo di una muffa che varia da una tonalità di rosa carico, ad un molto più frequente e tipico rosso intenso quasi vinoso. Questa muffa si manifesta preferibilmente, come del resto per il marciume rosa, all'apice della spiga; tuttavia non sono comunque infrequenti casi in cui esso colpisce maggiormente la parte basale o intermedia della struttura riproduttiva (Causin, 2006).

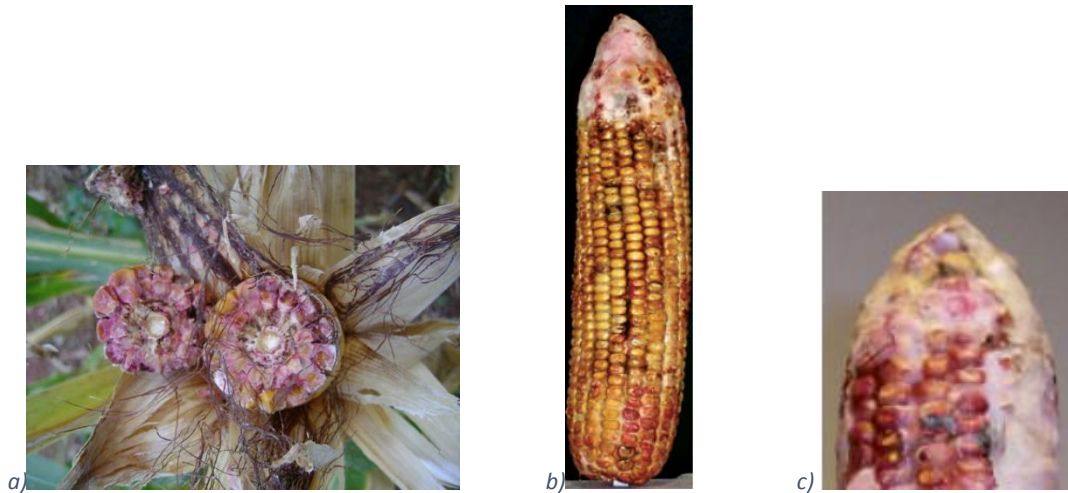


Figura 1.22. Spiga di mais colpita da marciume rosso. Fonte:
a) http://fitopatologia1.blogspot.it/2012_10_01_archive.html,
b),c) www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/MAIS_SICUREZZA_ALIMENTARE/Mais_Cap.%201.pdf

Questa situazione si osserva particolarmente nel caso di infezioni tardive, le quali si stabiliscono di norma, sulla parte basale della spiga. Le infezioni tardive hanno luogo quando si verificano intensi eventi piovosi, verso il termine della stagione; molto colpiti risultano quegli ibridi che non reclmano la spiga al termine della fase di maturazione. Infatti l'acqua, penetrando dall'apice della spiga, viene "accompagnata" dalle brattee verso la parte basale della stessa, ove si instaura un micro-ambiente molto favorevole allo sviluppo di questa patologia (Causin, 2006).

Qualora l'infezione iniziasse il suo decorso evolutivo precocemente, la spiga può risultare interamente colpita e ricoperta di muffa. Tale micelio cresce sulle cariossidi e tra di esse, nonché tra la spiga e le brattee che la racchiudono, dando origine ad un unico ammasso, sulla cui superficie si possono formare le strutture di fruttificazione gamiche, ovvero i periteci; essi appaiono come strutture rotondeggianti molto piccole e di colore nero.

Nel caso la coltura permanesse in campo oltre il tempo utile alla chiusura del ciclo, essa è fortemente suscettibile all'attacco di *F. graminearum*, in particolar modo nel caso si verificassero degli autunni con temperature non eccessivamente rigide e piovosi, grazie alle condizioni favorevoli che si vengono a creare e che il patogeno sfrutta. In questo periodo stagionale il forte sviluppo di *F. graminearum* porta ad un notevole accumulo di tossine, quali DON e ZEA. Queste infezioni possono continuare a produrre ed accumulare tossine anche a raccolta avvenuta; ciò si verifica nel caso non sia attuata una buona gestione del prodotto in post-raccolta. Sono infatti da evitare, durante lo stoccaggio, eccessivi tempi morti quali le soste prolungate del prodotto che precedono la fase di essiccazione, e la conservazione delle granaglie ad un'umidità superiore al 18%, in quanto già a valori leggermente superiori a questo limite i *Fusarium* possono condurre attacchi. Un forte aiuto alla

salubrità del prodotto in post-raccolta è dato anche dal fatto che sono da evitare delle trebbiature che per vari motivi (come ad esempio un'errata configurazione della macchina trebbiatrice) creino lesioni e danneggino la granella (Causin, 2006).

Sintesi delle tossine

Per quanto riguarda la sintesi di tossine, DON principalmente, essa avviene in un range di temperatura compreso tra i 21 ed i 29,5°C; l'umidità della granella si deve attestare ad un valore superiore al 20%, con un optimum che si colloca tra il 22 ed il 25%. Studi hanno dimostrato che anche cicli di temperature variabili (per esempio 14-15 gg a 25-28°C, seguiti da 20-28 gg a 12-15°C) svolgono un'azione positiva per quanto riguarda la sintesi di DON. La sintesi di ZEA invece, pur avvalendosi degli stessi indici di umidità (20% con optimum compreso tra 22 e 25%), richiede un intervallo di temperature che si attesta su valori minori, ovvero tra i 18 ed i 29,5°C (Causin, 2006).

I processi evolutivi che interessano ogni specie hanno portato *F. graminearum* a suddividere la propria popolazione in diversi ceppi, i quali si differenziano tra di loro per la sintesi di differenti micotossine. Sono stati infatti isolati ceppi produttori di DON, NIV (e dei rispettivi derivati) e ZEA. I ceppi produttori di DON sono più diffusi di quelli che producono NIV (Hestbjerg et al., 2002); a loro volta i produttori di DON sono suddivisi in due sottoclassi che sintetizzano, una DON e 3-AcDON, e l'altra che produce DON e 15-AcDON.

F. culmorum

Questa specie, come *F. graminearum* viene chiamata in causa quando si parla del marciume rosso. Esso, differentemente da *F. graminearum* (il quale è massicciamente presente in ambienti caldi e temperati), riveste una particolare importanza in areali che presentano climi non eccessivamente caldi, quali sono quelli del Centro-Ovest e Nord Europa (Yli-Mattila, 2010). In queste zone infatti esso può sostituirsi a *F. graminearum* per quanto riguarda la fusariosi della spiga che origina il marciume rosso; in Italia *F. culmorum*, nonostante abbia una forte e diffusa presenza, solitamente è presente congiuntamente ad altre specie di *Fusarium* (*F. graminearum* principalmente).

F. culmorum è considerato un fungo con spiccate capacità saprofitiche in quanto è in grado di portare a termine il proprio ciclo sui residui colturali e nel terreno; è comunque capace di completare tale ciclo anche sulla pianta, ed in questo caso, è definito come parassita facoltativo

(Wagacha e Muthomi, 2006). Questo fungo attua un meccanismo di riproduzione unicamente asessuato, in quanto non dispone della possibilità di riprodursi per via sessuale (Wagacha e Muthomi, 2006). Esso produce macroconidi che sono la forma di inoculo più importante che il patogeno utilizza; quest'ultimi sono dispersi sia attraverso il vento, sia per mezzo della pioggia tramite il cosiddetto "effetto splash" (Jenkinson e Parry, 1994).

Questi conidi sono in grado di infettare la pianta durante l'antesi che è la fase fenologica in cui l'individuo vegetale è maggiormente suscettibile. I macroconidi sono in grado di germinare, qualora si verifichino le condizioni ambientali ideali, in media già dopo 6-12 ore dall'arrivo sul tessuto della pianta (Kang e Buchenauer, 2000 e 2002). Una volta avvenuta la germinazione, iniziano a svilupparsi le ife che si accrescono su tessuti come glume, lemma e palee; terminata questa fase di accrescimento ed espansione miceliare può avere inizio la penetrazione all'interno della pianta (Kang e Buchenauer, 2000) attraverso la spighetta. Affinché la penetrazione avvenga è necessario che si verifichino condizioni ambientali che prevedono una forte umidità con temperature comprese tra i 15 ed i 25 °C, nonché l'instaurarsi di un sottile film d'acqua sulla superficie della spighetta in fioritura; questa pellicola d'acqua è necessaria per la germinazione dei macroconidi e l'accrescimento delle ife (Hope et al., 2005). Una volta colonizzata la pianta, la sintomatologia si evolve tramite l'accrescimento del micelio, dando origine alla formazione della classica muffa avente colorazione variabile tra il biancastro ed il rosa carico/rosso vinoso.

Condizioni ambientali che prevedono temperature maggiori di 25°C e periodi di umidità relativa prolungati, sortiscono effetti positivi sul patogeno, incrementando la severità degli attacchi, nonché la sintesi delle tossine (Mentewab et al., 2000). Alcuni studi hanno evidenziato quali siano gli elementi di maggiore importanza nei processi d'infezione e produzione di tossine (in particolar modo DON): ne è emerso che essi sono la temperatura, la presenza e la disponibilità d'acqua ed il periodo d'incubazione del patogeno. Prendendo in considerazione i fattori appena citati, una temperatura di 25°C, un'umidità relativa che sia maggiore od uguale al 55% ed un periodo d'incubazione di 40 giorni, sono le condizioni ideali per ottenere l'optimum di crescita e la massima sintesi di tossine da parte di *F. culmorum* (Hope et al., 2005).

F. culmorum, nonostante sia un forte produttore di DON, questa non è la sola molecola che riesce a sintetizzare; infatti esso può produrre anche ZEA, fumonisine e moniliformina (Snijders e Perkowski, 1990). I vari ceppi di *F. culmorum* sono stati suddivisi in tre chemotipi in base alle tossine prodotte; questa classificazione li suddivide come ceppi produttori di 3-AcDON, 15-AcDON e NIV (Chandler et al., 2003). Essa è simile a quella a cui sono stati sottoposti i ceppi di *F. graminearum*, infatti questi

due patogeni sono simili sia per quanto riguarda la produzione di tossine, sia per i geni che codificano tali sintesi.

1.5.1.3. I funghi di minor frequenza nella Pianura Padana

F. poae

Questo fungo del genere *Fusarium* con il passare del tempo ha acquistato sempre una crescente importanza. È associato a tossicosi che interessano sia gli esseri umani che gli animali; questo perché *F. poae* è in grado di produrre una grande quantità di differenti tossine (Stenglein, 2009).

I composti che questa specie è in grado di sintetizzare sono: aurofusarina (AUS), beauvericina (BEA), buteloniide (BUT), culmorina (CULM), ciclone radiolo, enniatine (ENs), fusarina, moniliformina (MON) e tricoteceni dei gruppi A (quali neosolaniolo, T-2 ed HT-2, monoacetossiscirpenolo, diacetossiscirpenolo e scirpentriolo, di cui gli ultimi tre sono sintetizzati in quantità maggiori) e tricoteceni del gruppo B come nivalenolo (NIV), deossinivalenolo (DON) e fusarenone-X (FUS-X), anch'essi prodotti in notevoli quantità (Stenglein, 2009). L'esteso range di micotossine prodotte da questo fungo impone una particolare attenzione in quanto causa di diversi problemi di natura tossicologica.

F. poae è interessato nella patologia definita con l'acronimo inglese FHB (Fusarium Head Blight, ovvero fusariosi della spiga), la quale, oltre a colpire le piante di mais, interessa anche altri cereali tra i quali il frumento e l'orzo per citare solo i più importanti. In termini generali, se comparato con *F. graminearum* e *F. culmorum*, questo patogeno è relativamente debole, ma nonostante questo la sua pericolosità è data dal fatto che esso è appunto in grado di produrre un grande numero di micotossine (Stenglein, 2009). Da un punto di vista morfologico *F. poae*, in substrato di coltivazione PDA (Potato Dextrose Agar), produce un denso micelio dalla colorazione biancastro-rosa che può variare a rossastra-marrone nelle colture di età maggiore. Il colore della parte inferiore delle colonie può variare dal bianco al giallo sino ad un intenso rosso carmine. *F. poae* sviluppa delle strutture a grappolo di corte ramificazioni e monofialidi non ramificati (i monofialidi sono le cime dilatate dei conidiofori a forma di vescicola tondeggianti) di 5-18 μm.

I microconidi sono prodotti in abbondanza, sono globosi od ovali, sino ad assumere una struttura piriforme delle dimensioni di 5-10 x 5-8 μm. I macroconidi sono rari, tipicamente a forma di falce, di dimensioni 18-38 x 3,5-7 μm ed hanno una cellula basale a forma di piede (Boot, 1971; Nelson et

al., 1983; Desjardins, 2006; Leslie e Summerell, 2006). L'assenza di poliphialidi e clamidospore distinguono *F. poae* da *F. sporotrichioides* e *F. chlamydosporum*, e di caratteristici phialidi di *F. poae* lo differenziano da *F. tricinctum* (Nelson et al., 1983; Leslie e Summerell, 2006).

Il fungo si dimostra stabile in coltura e qualche volta produce un caratteristico aroma fruttato simile all'amilacetato (Stenglein, 2009). I tradizionali metodi di rilevamento ed identificazione delle specie di *Fusarium* spesso possono essere inadeguati al fine di distinguere specie che hanno caratteristiche morfologicamente simili, come ad esempio *F. poae* e *F. langsethiae*. In questi casi, per non incorrere in grossolani errori, ci si può affidare alla PCR, la quale offre un rapido e preciso metodo di identificazione per la maggior parte dei patogeni associati alla FHB (Parry e Nicholson, 1996; Konstantinova e Yli-Mattila, 2004; Jurado et al., 2005). *F. poae* non è conosciuto per produrre ascospore (fase telomorfa), ma produce spore asessuali, che sono il principale mezzo di diffusione che questo fungo utilizza (Stenglein, 2009). Rossi et al., (2002), dimostrarono che la pioggia è il più importante agente della dispersione di *Fusarium*. Hörberg, (2002), provò che la dispersione dei macroconidi ad opera dell'effetto splash ricopre un ruolo essenziale per *F. poae* e *F. culmorum* (Rossi et al., 2002; Hörberg, 2002).

Diverse ricerche hanno riportato la presenza di *F. poae* in diverse aree del pianeta. In Canada nel 1993 e 1994, prove di laboratorio che prevedevano di identificare le specie fungine in isolati provenienti da campioni di orzo e avena, dimostrarono che *F. graminearum* era il fungo più comune e *F. poae* a seguire era il secondo patogeno più abbondante (Bourdages et al., 2006). Questa specie è anche una delle più frequenti isolate in granaglie coltivate in Finlandia, Giappone, Norvegia e Svezia (Sugiura et al., 1993; Pettersson et al., 1995; Liu et al., 1998; Yli-Mattila et al., 2008). Inoltre l'alta incidenza di *F. poae* in campioni di cereali fu associata con la contaminazione da NIV in Giappone, nel Nord America, in Svezia ed in Finlandia (Sugiura et al., 1993; Pettersson et al., 1995; Salas et al., 1999; Yli-Mattila et al., 2008).

F. poae fu la specie predominante anche negli isolati provenienti da campioni in Inghilterra e Galles nel 1989 e 1990, ed in Polonia nel 1997 (Logrieco et al., 2002); inoltre questo fungo si confermò la specie più comune trovata in Inghilterra, Irlanda ed Ungheria nel 2001 e 2002 (Xu et al., 2005). *F. graminearum* e *F. poae* sono state anche le specie più frequenti riscontrate in campioni di frumento raccolto nel 2004 in nove località a nord della provincia di Buenos Aires in Argentina (González et al., 2008). In Slovacchia, *F. poae* è stato confermato come patogeno prevalente in tutte le zone esaminate in quattro anni di osservazioni (Rohácik e Hudec, 2005). Nonostante tutto, la popolazione dei *Fusaria* può ampiamente fluttuare all'interno e tra le stagioni colturali (Bateman e Murray,

2001); di conseguenza l'incidenza delle specie di *Fusarium* può variare da un anno all'altro e da una regione all'altra.

In generale *F. graminearum* è favorito da climi più caldi, mentre *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *F. poae* sono maggiormente adattati a regioni più fresche (Doohan et al., 2003).

Anche se esistono delle generalizzazioni geografiche, le variazioni annuali delle condizioni climatiche e/o altri fattori precedentemente citati, influenzano la relativa abbondanza od il rapporto tra le differenti specie di *Fusarium*. Sono quindi necessarie più indagini a riguardo per determinare gli effetti diretti ed indiretti che le condizioni climatiche hanno sull'incidenza di *F. poae* (Stenglein, 2009).

F. langsethiae

Questo fungo è stato solo recentemente identificato come una specie a sé stante (Torp e Nirenberg, 2004), in quanto in precedenza, esso veniva confuso con il *F. poae*. Infatti alcuni isolati identificati da Torp e Langseth, (1999), nonostante assomigliassero a *F. poae*, avevano un aspetto più soffice e polverulento e per questo motivo venivano chiamati "powdery *F. poae*" (Torp e Langseth, 1999). In seguito ad analisi che studiavano e confrontavano i tratti delle micotossine prodotte ci si accorse che i metaboliti sintetizzati da *F. poae* non riflettevano quelli prodotti dai "powdery *F. poae*"; questi risultati furono confrontati con altri simili condotti in altre strutture d'Europa e nel 2004 è stata formalmente riconosciuta la specie *F. langsethiae* (Torp e Nirenberg, 2004).

Questo patogeno è un forte sintetizzatore di tossine T-2 ed HT-2 e di altri composti come NEO, MAS, DAS, BEA ed ENs (Thrane et al., 2004), ed il tratto tossicologico è estremamente simile a quello di *F. sporotrichioides*, anche se quest'ultimo è morfologicamente diverso.

I primi campioni di *F. langsethiae* isolati in Italia furono ottenuti nel 2006, esaminando cariossidi di grano duro coltivate in differenti regioni come Marche, Puglia e Sicilia (Infantino et al., 2007). In uno studio condotto nel 2011, Medina e Magan hanno notato che la metabolizzazione di composti tossici in vitro avveniva in differenti condizioni termiche e di disponibilità idrica; le più alte e maggiori quantità di T-2 ed HT-2 erano state sintetizzate con bassi indici di aw ed in condizione di stress termici.

Un lavoro portato a termine da Parikka et al., su granella di orzo ed avena che aveva l'obiettivo di valutare la quantità di micotossine prodotte da *F. langsethiae* in base alla tipologia di interventi eseguiti sui terreni che ospitavano le colture, evidenziò che c'erano delle importanti discrepanze

riguardo la quantità di cariossidi colpite dal fungo e confermò che gli appezzamenti dove erano stati eseguiti interventi di semina diretta, erano più soggetti a contaminazioni da parte di *F. langsethiae*, rispetto a terreni che avevano subito lavorazioni agronomiche tradizionali (Medina e Magan et al., 2010; Parikka et al., 2007).

Nel 2008 Imathiu osservò che la specie *F. langsethiae* è vastamente diffusa all'interno del Regno Unito, in particolar modo sulle coltivazioni di avena e che le infezioni di questo fungo molto spesso non danno origine ad alcun sintomo e non intaccano le rese in termini quantitativi. Nonostante l'infezione fungina sia asintomatica, vi è una fortissima produzione di tossine, arrivando anche a picchi di 2500 ppb; questi livelli sono di estrema gravità, ed è necessario quindi studiare a fondo questa specie la cui diffusione è in continuo accrescimento (Imathiu, 2008), in quanto, essendo di recente identificazione, la bibliografia scientifica che riguarda questo patogeno è tutt'ora in fase di strutturazione.

F. sporotrichioides

Questo fungo è un forte produttore di composti tossici appartenenti alla famiglia dei tricoteceni del gruppo A ed è ritenuta essere la maggior specie sintetizzatrice di tossine T-2 ed HT-2. Il range termico di crescita e sviluppo di *F. sporotrichioides* è compreso tra i 2 ed i 35°C, mentre l'*a*_w deve essere maggiore di 0,88 (Wiśniewska et al., 2011).

Questo patogeno, come *F. langsethiae*, non causa perdite quantitative; è però responsabile della sintesi che origina un forte accumulo di tossine T-2 ed HT-2 (Vargo e Baumer, 1996), oltre ad altri tricoteceni del gruppo A tra i quali il NEO ed il DAS (Moretti et al., 2006). *F. sporotrichioides* è estremamente diffuso negli areali del Nord Europa, come *F. langsethiae*, nell'estremo continente orientale e nord asiatico (Yli-Mattila, 2010).

F. sporotrichioides, data la somiglianza e l'affinità con *F. poae* e *F. langsethiae*, può con essi interagire formando un complesso che opera sinergicamente. Vargo e Baumer osservarono che questo fungo può interagire anche con *F. graminearum*, il quale provocando lesioni e ferite nella pianta colpita, facilita ulteriormente l'ingresso a *F. sporotrichioides*, il quale sarà responsabile di forti accumuli di T-2 ed HT-2 (Vargo e Baumer, 1996).

1.5.2. Il genere *Aspergillus*

Il genere *Aspergillus* racchiude in sé circa 250 specie (Geiser et al., 2008); tra di esse ve ne sono solo alcune che svolgono ruoli che richiamano una certa attenzione da parte dell'uomo, in quanto trattasi di funghi utili (ad esempio nelle fermentazioni industriali) o di patogeni dannosi per la salute umana od animale (come i miceti che sintetizzano composti tossici, quali aflatossine ed ocratossine principalmente) (Perrone et al., 2007). Le specie appartenenti a questo genere ricoprono ruoli sia come saprofiti, sia come parassiti (Amaike e Keller, 2011).

Grazie a questa loro capacità di svilupparsi ed accrescersi in svariate condizioni e substrati, gli *Aspergilli* sono presenti in ogni ambiente (Tomee e van Der Werf, 2001). Il genere *Aspergillus* nel tempo ha evoluto una capacità che viene chiamata oligotrofia, ovvero l'abilità di poter accrescersi in substrati poveri o quasi totalmente sprovvisti di sostanze nutritive, che ha permesso a questi patogeni di diffondersi in maniera praticamente ubiquitaria (Singh et al., 2008).

Questi funghi oltre a dare origine ad accumuli di composti tossici molto pericolosi nelle granaglie, sono anche in grado di causare marciumi della spiga del mais, formando un micelio (tipicamente localizzato nella parte apicale della spiga), che alla vista appare granuloso e ricopre le cariossidi, potendo anche penetrare all'interno del tutolo (Torelli, 2005). Gli *Aspergilli* sono responsabili di pesanti perdite alla produzione agricola di moltissime colture come i cereali, la vite, il caffè, la frutta e le verdure (Cotty et al., 1994).

Questi miceti hanno la capacità di accrescersi e sintetizzare tossine all'interno di un range termico che varia dai 19 ai 37°C, e sono in grado di svilupparsi con indici di aw relativamente bassi (0,78); per la metabolizzazione delle molecole tossiche sono invece richiesti valori di aw pari a 0,83 (Reyneri, 2006). Questi funghi sono termofili e sono in grado di resistere a condizioni di scarsa umidità meglio di altre specie fungine patogene. Per questo motivo gli *Aspergilli* sono considerati pericolosi anche in ambienti dove le granaglie sono poste in post-raccolta, tipicamente la fase di stoccaggio. Infatti il decorso dell'infezione da *Aspergilli* può essere suddiviso in due fasi (Cotty, 2001): la prima, che si verifica in campo, durante la quale questi funghi attaccando la pianta danno inizio all'accumulo di tossine e la seconda (in fase di stoccaggio) durante la quale l'azione tossigena del fungo continua con il conseguente incremento della concentrazione di questi composti tossici (Miller, 1995).

Durante il processo di coltivazione (partendo dalla semina sino alla raccolta) bisogna considerare diversi elementi che sono in grado di interferire, a favore o contro, l'attacco da parte dei funghi in

questione e che determinano poi la gravità dell'infezione ed il relativo accumulo di metaboliti tossici (Cotty, 2001). Questi elementi sono:

- La scelta degli ibridi e la classe FAO a cui appartengono: Abbas et al., (2009), hanno dimostrato che ibridi di classe alta (che soffrono meno il caldo e gli stress idrici durante la delicata fase della maturazione delle cariossidi) sono meno soggetti ad essere attaccati da parte degli Aspergilli (Abbas et al., 2009). Nonostante questo, bisogna sempre considerare più fattori, come le esigenze e l'organizzazione aziendale, il clima della zona di coltivazione ed altri, quando si tratta di scegliere la classe e l'ibrido più appropriati.
- Epoca e densità di semina: la semina precoce è in grado di restringere la finestra temporale in cui la coltura viene esposta a condizioni idrico-termiche estreme, le quali sottoponendo la pianta ad eccessivi stress, favoriscono gli attacchi di questi funghi (Blandino et al., 2008).
- La tipologia di concimazione (in modo particolare l'eccesso di N che porta ad un'elevata vigoria, con conseguente maggior consumo idrico da parte della pianta) e delle irrigazioni applicate; le piante che sono poste in condizioni di stress idrico sintetizzano meno fitoalessine, metaboliti che si contrappongono alle infezioni dei patogeni (Wotton e Strange, 1987). Avendo quindi modo di intervenire con delle irrigazioni di soccorso si riduce la competitività degli Aspergilli (Payne et al., 1986).
- I danni che vengono prodotti da animali (uccelli), insetti (in modo particolare gli insetti minatori, in primis *O. nubilalis*, ovvero la piralide del mais), agenti atmosferici (tipicamente la grandine); la discontinuità delle barriere fisiche di protezione della pianta costituiscono una facile via d'ingresso per il patogeno (Blandino et al., 2008).
- Il periodo di raccolta: se questa viene eccessivamente anticipata il prodotto si presenterà troppo umido ed in fase di stoccaggio (se non propriamente asciugato) vi sarà lo sviluppo di Aspergilli che daranno origine a muffe e relativo accumulo di composti tossici. Al contrario una raccolta posticipata e che lascia la coltura in campo per troppo tempo, qualora persistesse un clima caldo e secco, favorisce l'insorgere di marciumi ad opera di questi patogeni che nonostante la bassa umidità della granella possono dare origine ad accumuli di tossine (Reyneri, 2006).

In virtù di quanto sopra riportato, al fine di contenere il propagarsi delle infezioni da *Aspergillus*, è necessario eliminare, attraverso opportuni metodi di pulitura e vagliatura, le cariossidi contaminate prima di procedere con lo stoccaggio del prodotto (Brown et al., 1999; Park, 2002).

1.5.2.1. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

Queste specie di Aspergilli sono le più importanti in quanto principali produttrici di composti altamente tossici come le tossine AFB₁ ed AFB₂ (sintetizzate da entrambi i funghi) e le AFG₁ e AFG₂ (quest'ultime metabolizzate solo da *A. parasiticus*). I ceppi che sintetizzano micotossine del tipo B e G sono noti come ceppi del gruppo S, mentre quelli che producono solo molecole tossiche del tipo B sono noti come ceppi del gruppo L. Questi gruppi sono distinti in base al diametro degli sclerozi: i gruppi S hanno sclerozi con diametro minore di 400 µm, mentre i gruppi L hanno dimensioni maggiori di 400 µm (Amaike e Keller, 2011). *A. flavus* e *A. parasiticus* furono inoltre le prime specie del genere *Aspergillus* riconosciute come aflatossigeniche (D'Mello e Macdonald, 1997; Pitt, 2000).

Aspergillus flavus

Questo fungo è il maggior agente patogeno responsabile degli attacchi alla spiga (Campbell e White, 1995); esso è presente in tutte quelle aree del pianeta che hanno un clima temperato o caldo-umido (90-98% di umidità relativa). Il range termico all'interno del quale questo patogeno è in grado di svilupparsi è compreso tra i 12 ed i 48°C, con l'optimum che si attesta a 37°C (Vujanovic et al., 2001), mentre l'indice di aw ottimale, molto importante per il suo sviluppo e la metabolizzazione delle tossine, è compreso tra 0,86 e 0,96 (il fungo è in grado di sopravvivere anche con aw di 0,78) (Vujanovic et al., 2001). Nonostante una temperatura di 37°C sia ottimale per lo sviluppo, essa non lo è altrettanto per la sintesi di micotossine, la quale invece raggiunge la sua massima espressione ad un valore termico di 28°C (O'Brian et al., 2007).

Oltre alla temperatura ed all'aw, altri fattori che influiscono nella produzione di questi composti tossici sono il pH, la concentrazione dei nitrati e le fonti di carbonio ed energia che sono disponibili e (Yin et al., 2008; Amaike e Keller, 2011).

Aspergillus flavus essendo un fungo soil-borne è in grado di vivere in maniera saprofitica sui residui vegetali. In essi si conserva sotto forma di propaguli, sclerozi o ife, strutture che rappresentano le fonti di inoculo primario (Abbas et al., 2008). I terreni ricchi di sostanza organica e di sostanze

nutritive rappresentano un substrato ideale per l'incubazione del fungo e, se lavorati con tecniche che prevedono uno scarso rimescolamento ed interrimento della sostanza organica, come il minimum tillage od il no-tillage, possono essere considerati estremamente pericolosi in quanto fonti di una fortissima presenza di inoculo fungino (Zablotowicz et al., 2007). Per citare alcuni valori in un terreno che ha ospitato la coltura di mais e che sia particolarmente ben dotato di materia organica, *A. flavus* può arrivare a superare le 300.000 CFU per ogni singolo grammo di suolo (Abbas et al., 2009).

Possiamo suddividere il ciclo vitale di *A. flavus* in due stadi: il primo prevede che il patogeno colonizzi i residui colturali che si trovano nel suolo in modo tale di mantenere la propria presenza negli anni successivi ed il secondo stadio, che usualmente inizia in primavera, nel quale le strutture di conservazione iniziano a germinare producendo un inoculo conidiale dal quale si origina l'infezione che interesserà i tessuti della pianta (Scheidegger e Payne, 2003).

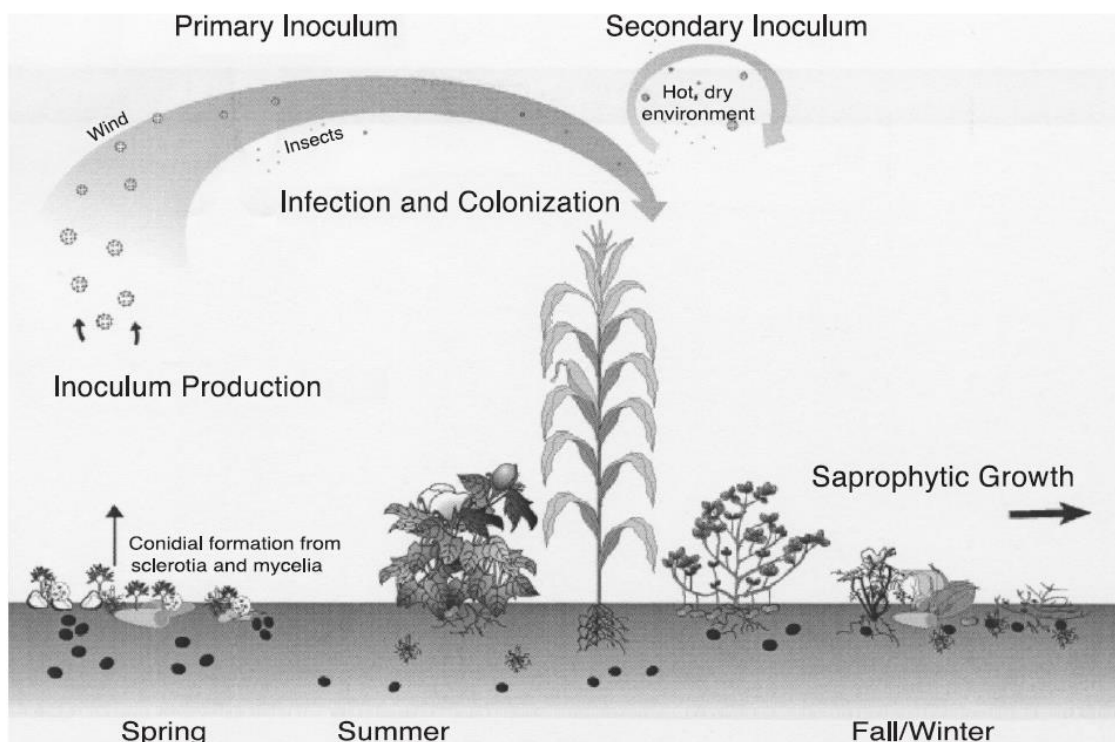


Figura 1.23. Schema del ciclo vitale di *A. flavus* e delle modalità di infezione su mais, cotone e arachide (Scheidegger e Payne, 2003).

Eventuali situazioni di stress idrici e/o termici rendono la pianta più esposta, facilitando e aggravando la colonizzazione da parte del patogeno (O'Brian et al., 2007). Qualora questi eventi si verificassero durante la fase di riproduzione, la pianta andrebbe incontro ad una situazione dove le

sete diventano più deboli; questo rende molto più facile l'ingresso del patogeno attraverso le sete stesse, da dove successivamente l'infezione si propaga sino alle cariossidi che sono in fase di formazione, in un arco temporale di 4-13 giorni (Marsh e Payne, 1984). Un'altra via d'accesso che il patogeno può utilizzare per infettare la pianta è quella rappresentata dalle ferite (Battilani, 2004). La piralide (*O. nubilalis*) ad esempio, insieme ad altri insetti minatori di minore importanza, ricopre un ruolo fondamentale in quanto le larve, attraverso le rosure che arrecano a danno della pianta (nelle cariossidi ed in altri tessuti), facilitano l'ingresso del patogeno dovuto al fatto che tali larve fungono da vettore per i conidi che si trovano sul loro corpo (Windham et al., 1999; Cleveland et al., 2003).

La generazione di *O. nubilalis* che arreca i danni di maggiore entità è la seconda, compare nel periodo della prima decade di luglio, momento in cui la possibilità che la pianta vada incontro a stress idrici e termici (per eccessivo calore), sono i più alti. Questo perché il manifestarsi di questi eventi crea le condizioni ottimali allo sviluppo del fungo (Mencarelli et al., 2012); infatti queste particolari circostanze portano a stress fisiologici, che associati a stress di natura fisica, rendono la pianta molto debole ed esposta agli attacchi del patogeno.

Generalmente le cariossidi non vengono immediatamente colonizzate all'interno prima che si verifichi l'inizio della fase della maturazione fisiologica, nonostante questo però, trascorsi una quindicina di giorni, il fungo può aver colonizzato anche il 30% delle cariossidi. L'avanzamento del patogeno è molto contenuto finché perdura una situazione di umidità superiore al 32%, ma cresce velocemente dal momento in cui il tasso d'umidità si porta al di sotto del 28%. Si ritiene che questo evento sia dovuto al fatto che le cariossidi, data l'attività fisiologica ridotta dovuta alla fase di maturazione in cui si trovano, non siano in grado di esprimere le difese attive di cui dispongono (Battilani, 2004). Qui il patogeno inizia a metabolizzare degli enzimi in grado di idrolizzare il pericarpo delle cariossidi superando così questa barriera fisica e spostandosi nelle cellule vegetali (Kolattukudy, 1980, 1985). Nelle immagini di seguito si può osservare il risultato dell'attacco di *A. flavus* alla spiga ed alla cariosside:

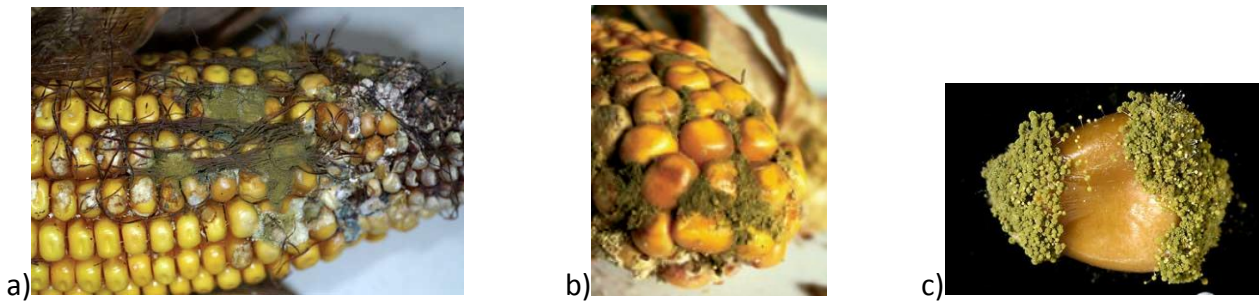


Figura 1.24. Spiga e cariosside colpita da *A. flavus*. Fonte:

a) www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/files/images/aspercorn.jpg,

b) www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/MAIS_SICUREZZA_ALIMENTARE/Mais_Cap.%201.pdf,

c) www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson_r/images/photos/A_flavus3.jpg

Le circostanze di maggior criticità, nelle quali si verificano gli accumuli di micotossine ad opera di *A. flavus*, si manifestano quando si verifica un ritardo nella raccolta, in quanto la coltura, permanendo in campo per un periodo eccessivo, va incontro a situazioni che riportano le condizioni ideali affinché il fungo manifesti il suo massimo potenziale tossigeno (Jaime-Garcia e Cotty, 2003), causando così il problema di presenza di AFs nel prodotto stoccato. Tale problema è presente anche nel caso in cui la raccolta sia eccessivamente anticipata, in quanto il prodotto presenterà un'elevata umidità, non compatibile con i parametri richiesti. Infatti in fase di stoccaggio, in casi del genere, il patogeno si troverà nelle condizioni ideali per il suo sviluppo e l'ulteriore sintesi di micotossine, causando così, uno scadimento qualitativo (Marin et al., 1998). La raccolta del mais avviene quando la granella ha un tasso d'umidità pari al 18% circa (aw circa 0,85); questo livello di umidità viene poi portato a valori inferiori negli stabilimenti di stoccaggio. Qualora in campo, si verificano le condizioni per l'accumulo di tossine, la raccolta è anticipata a quando la granella ha un'umidità inferiore od uguale al 24%.

Aspergillus parasiticus

Riguardo questo patogeno sia per le condizioni di sviluppo, che per le modalità d'infezione, vale quanto detto per *A. flavus*. Da segnalare che, a differenza di *A. flavus* (fungo ubiquitario), *A. parasiticus* è più diffuso in climi tropicali e sub-tropicali, ed è responsabile della produzione di micotossine sia del tipo B (B₁ e B₂), che del tipo G (G₁ e G₂) (D'Mello e McDonald, 1997; Pitt, 2000).

1.5.2.2. *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger*

Questi patogeni, anche se non ricoprono il ruolo d'importanza di *A. flavus* e *A. parasiticus*, sono considerati come produttori di OTA. I prodotti agricoli interessati dall'attività tossigena di questi miceti sono principalmente i vini, tuttavia si possono ritrovare anche in altri ambiti.

A. ochraceus

Questo fungo dà origine a colonie di sviluppo ridotte che assumono una colorazione che varia dal giallo-arancio al color ocraceo. Il micelio è di color biancastro e si compone di ife settate che assumono una forma cilindrica. Le forme di conservazione occasionalmente prodotte sono gli sclerozi, che appaiono bianchi appena formati, mentre con il processo di maturazione invece virano verso una colorazione compresa tra il range cromatico che varia dal rosa al porpora. Le ife del micelio superficiale sviluppano rami conidiofori verticali che riportano degli stipi (agglomerati presenti sulla punta dei rami conidiofori) di lunghezza variabile tra 1 e 1,5 mm di colorazione che varia dal giallastro al bruno pallido, di aspetto rugoso (a trama fina o grossolana); a volte possono presentare delle escrescenze.

I conidi sono di colore giallo-bruno, dalla forma sferica o sub-sferica aventi diametro di 2,5-3,5 μm ; la trama della parete dei conidi varia da liscia a leggermente rugosa (Battilani et al., 2006a). Lo sviluppo di questo fungo è inibito dalla specie *A. niger* (Paster et al., 1992). *A. ochraceus* è noto per la produzione di ocratossine A, B e C (Van der Merwe et al., 1965a, 1965b). Solamente alcuni isolati sono dotati di proprietà tossigene (Ciegler, 1972).

A. niger

Aspergillus niger si distingue per il rapido sviluppo delle colonie le quali sono costituite da una ricca massa di micelio incluso nel substrato. Le ife, che formano conidi, emergono dal substrato; si presentano settate e ialine (dall'aspetto trasparente, vitreo). Il colore che esse inizialmente assumono è bianco, ma in un breve lasso di tempo diventano nere; questo cambiamento cromatico è dovuto allo sviluppo dei conidiofori. Viste dal fondo le colonie appaiono di colore giallo pallido, e possono dare origine alla formazione di fessurazioni nell'agar che seguono un andamento radiale.

I conidi sono (lunghi da 400 a 3000 μm) di colore marrone-nero e ad eccezione di una piccola area marginale, ricoprono totalmente la colonia. Le pareti degli stessi evidenziano una trama liscia e di

aspetto ialino con l'apice più scuro. Il colore dei conidi varia da marrone a nero, dall'aspetto molto rugoso, con un diametro di 4-5 μm (Battilani et al., 2006). Questo fungo produce OTA (Abarca et al., 1994; Téren et al., 1996).

1.5.3. Il genere *Penicillium*

Questo genere include diverse specie tra le quali *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. viridicantum* e *P. cyclopium* per citarne solo alcune (Causin et al., 2006) che sintetizzano differenti tipi di micotossine. Nonostante ciò, per quanto riguarda il mais, la sola specie meritevole di attenzione è *P. verrucosum*. Le specie appartenenti al genere *Penicillium* sono in grado di crescere a basse temperature; tali funghi infatti riescono ad esprimere il loro massimo potenziale nelle zone maidicole dell'Europa Centro- Settentrionale, caratterizzate da climi freschi e umidi, rispetto al genere *Aspergillus* che, essendo più termofilo, richiede invece climi caldi (Causin, 2004).

I marciumi dei *Penicillium* sono favoriti da danni fisici alla spiga od alle cariossidi; danni che possono essere causati da insetti, da macchine agricole (in modo particolare da quelle utilizzate per la raccolta) o da eventi climatici estremi come la grandine.

Il quadro sintomatologico inerente gli attacchi di questi patogeni evidenzia la formazione di una muffa verde o verde-bluastro sulla parte apicale della spiga; questo micelio si accresce sulle cariossidi e tra di esse, sino ad arrivare al tutolo.

1.5.3.1. *Penicillium verrucosum*

Questa specie è l'unica del suo genere che viene ritenuta essere in grado di metabolizzare la tossina OTA. Viene identificata più come un fungo "da conservazione" che come un patogeno direttamente "attivo" in campo (Causin, 2006); nonostante questo però esso è comunque in grado di condurre attacchi e colonizzare la pianta, in modo particolare nel caso siano presenti delle ferite.

P. verrucosum è caratterizzato da una crescita lenta, ed è in grado di svilupparsi a temperature tra 0 e 31 °C, con il suo optimum di crescita a 20°C (Causin, 2006). Inoltre il patogeno riesce a tollerare bene anche situazioni relativamente asciutte in quanto è in grado di svilupparsi con aw pari a 0,80. L'intervallo termico entro il quale viene sintetizzata l'OTA rispecchia quello di sviluppo (0-31°C); già a partire da temperature di 4°C ed aw vicina a 0,86, *P. verrucosum* produce quantità importanti di questo metabolita (Causin, 2006).

Dal momento che tale fungo cresce a basse temperature, la sua presenza è maggiormente focalizzata nei paesi che godono di un clima temperato-fresco, come quelli dell'Europa centro-settentrionale ed il Canada, paesi nei quali è riscontrabile una marcata diffusione di questo patogeno. È molto difficile incontrare *P. verrucosum* nelle aree ad interesse maidicolo in Italia e, qualora fosse presente, lo si trova tipicamente nel post-raccolta. Per questo motivo a livello nazionale la granella difficilmente riporta contaminazioni da OTA (Causin, 2006).

P. verrucosum detiene ottime capacità saprofitarie, di conseguenza è in grado di sopravvivere nei residui colturali che si trovano nel terreno o nella sporcizia che può accumularsi all'interno di locali o strutture di conservazione; a tal fine anche la sua capacità di resistere alle basse temperature e la tolleranza alla scarsa umidità lo favoriscono (Causin, 2006). Non appena le condizioni climatiche lo permettono, *P. verrucosum* inizia a sviluppare una gran quantità di conidi leggeri e secchi, i quali sono poi facilmente trasportati e diffusi nell'ambiente ad opera dell'aria. Nel momento in cui essi arrivano sulla spiga, qualora vi siano delle ferite (da insetti o da eventi meteorologici come la grandine), questi possono germinare e colonizzare la spiga e portare le cariossidi al marciume, solitamente nella parte apicale della spiga stessa. Nelle parti così colpite si forma una muffa finemente polverulenta di un colore grigio-verde che può riportare anche delle sfumature bluestre; anche il tutolo, con lo sviluppo del fungo, viene interessato dalla massa di micelio (Causin, 2006).



Figura 1.25. Spiga di mais colpita da *P. verrucosum*. Fonte:
http://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/MAIS_SICUREZZA_ALIMENTARE/Mais_Cap.%201.pdf

Le cariossidi interessate dall'infezione fungina possono anche assumere un colore stinto e riportare delle striature sbiancate. Un sintomo particolare e tipico dei funghi del genere *Penicillium* è il cosiddetto "blue eye" o "occhio blu".

Esso è causato dal patogeno che invade l'embrione delle cariossidi, donando un colore anomalo blu-verdastro (questo sintomo può essere causato anche da *A. glaucus*, un fungo del genere *Aspergillus* in grado di svilupparsi sulla granella con umidità anche del 14,5%) (Causin, 2006).

Solitamente questo sintomo si verifica in post-raccolta e su cariossidi lesionate (lesioni causate dalla raccolta stessa, o da un errato settaggio della trebbiatrice), che sono conservate a tassi d'umidità superiori al 15-18%. Nelle aree maidicole italiane gli attacchi alla spiga ed i relativi sintomi appena descritti, molto frequentemente non sono causati da *P. verrucosum*, bensì da altre specie del genere *Penicillium*, come il *P. oxalicum* che dispone della peculiarità di essere favorito dal caldo (Causin, 2006).

Al fine di contenere le infezioni da *Penicillium* si utilizzano in sinergia strategie utilizzate in campo, come la scelta dell'ibrido (che anche in questo caso è di grande importanza) e quelle che si utilizzano nella fase di post-raccolta, ponendo quindi attenzione a non danneggiare la granella durante la trebbiatura e facendo attenzione alle modalità di stoccaggio, ossia cercando di limitare la quantità di cariossidi lesionate ed in particolar modo limitando l'umidità della granella portandola entro i limiti di sicurezza consigliati (Causin, 2006).

1.6. I fattori che influenzano la sintesi di micotossine

Lo sviluppo fungino e la sintesi di micotossine sono influenzati da diversi fattori che possono essere suddivisi in fattori intrinseci ed estrinseci.

I primi sono legati alle specie fungine considerate, nonché al potenziale tossigeno dei vari ceppi appartenenti alla specie in esame, mentre i fattori estrinseci invece sono composti per lo più dalle condizioni climatiche ove il fungo si sviluppa: esse sono la temperatura e l'umidità (Pietri, 1998). Questi parametri influenzano lo sviluppo del fungo e la produzione dei composti tossici favorendoli o limitandoli a seconda delle condizioni presenti e degli optimum del patogeno. Nonostante le infezioni e le contaminazioni da parte di questi funghi tossigeni possano avvenire durante tutto l'intero ciclo di coltivazione (dalla semina alla raccolta), e per alcuni patogeni proseguire nelle fasi di post-raccolta (tipicamente lo stoccaggio), ci sono alcune fasi fenologiche come la fioritura e la successiva maturazione delle cariossidi nella spiga che sono più a rischio, dato il delicato momento che la pianta si trova ad affrontare.

Fasi come la trasformazione tecnologica e la preparazione alimentare sono da ritenersi altrettanto a rischio (Pietri, 2001). Anche la composizione del substrato influenza molto lo sviluppo di questi

funghi; solitamente sono più colpiti i substrati di origine vegetale (mais, frumento, riso, avena, segale e sorgo sono i cereali più colpiti) in quanto ricchi di amido, sostanza che viene utilizzata dalle specie fungine in questione per accrescersi (Dragoni et al., 1997; Haouet e Altissimi, 2003; Amodeo, 2002).

Generalmente la pianta di mais è resistente alle infezioni fungine, nonostante questo però, quando si verificano condizioni ambientali difficili (temperature troppo alte o eccessive escursioni termiche e livelli di umidità elevati), attacchi di insetti o qualsiasi altro fattore in grado di indurre uno stato di stress nella pianta (ad esempio pratiche irrigue non sufficienti a coprire il fabbisogno della coltura, impiego dei pesticidi inadeguato, ecc...), essa diventa particolarmente suscettibile e vulnerabile agli attacchi di questi patogeni.

Ritornando ai fattori estrinseci di maggior rilievo, temperatura e umidità giocano un ruolo fondamentale nelle infezioni da parte di questi patogeni. La temperatura di crescita di un fungo è generalmente compresa tra 15 e 30°C, con un optimum indicativo che è compreso tra i 20 ed i 25°C (Dragoni et al., 1997). Di solito le temperature di crescita ottimali coincidono con quelle della sintesi delle micotossine. Ci sono tuttavia alcune discrepanze tra le temperature ottimali di crescita e di metabolizzazione dei composti tossici; per *A. flavus* ad esempio l'optimum di crescita si colloca tra i 36 ed i 38°C, mentre la produzione di micotossine avviene tra i 20 ed i 30°C (Battilani, 2004).

Per quanto riguarda invece l'umidità ambientale l'*aw* indica la quota di acqua libera rispetto all'umidità totale che il fungo può utilizzare per la crescita (Dragoni et al., 1997). Generalmente è buona norma non superare, per una buona conservazione, valori di *aw* vicini a 0,65. Bisogna però considerare che la relazione che intercorre tra l'umidità totale e l'*aw* non è lineare e, di conseguenza, essa varia in base al prodotto considerato. Nei cereali ad esempio, ad una temperatura di 25°C, al fine di evitare contaminazioni fungine, l'umidità non deve superare il 13-13,5%, mentre per i semi oleosi il limite di umidità si attesta al 7-8% (Amodeo, 2001). Il valore minimo di *aw* al quale corrisponde la crescita della maggior parte dei funghi è di 0,80. *A. flavus* è in grado di tollerare anche situazioni di relativa siccità, con valori di *aw* vicini a 0,78 (anche se i valori di *aw* per la crescita sono superiori), mentre *F. verticillioides* necessita di un'umidità molto elevata, infatti nonostante sia in grado di sopravvivere con indici *aw* di 0,87-0,88, l'optimum di crescita si ha con *aw* vicini a 0,96-0,98.

1.7. Gestione della contaminazione da parte dei funghi micotossigeni

Ci sono diversi metodi e pratiche che aiutano a contenere la presenza dei patogeni in campo ed a controllare la contaminazione della granella da micotossine. Ognuno di questi metodi apporta un contributo parziale; ne deriva di conseguenza, che al fine di avere una valida gestione dei funghi e dei composti da loro prodotti, è necessario applicare ed intrecciare tra loro tutti i metodi di seguito elencati. Così facendo vi è una buona capacità di proteggere le colture e gli utilizzatori finali degli alimenti da esse ottenuti.

1.7.1. Le pratiche agronomiche

Una buona gestione e pianificazione di tutte quelle pratiche ed operazioni colturali-agronomiche permettono di poter garantire alle colture le condizioni ottimali di crescita e sviluppo; così facendo si evita di far incorrere la pianta in stress di varia natura, che indubbiamente, la espongono all'attacco dei patogeni.

L'attuazione pertanto di queste pratiche gioca un ruolo fondamentale per quanto riguarda la prevenzione. Dal momento che, questi composti tossici vengono accumulati maggiormente nelle fasi in cui le colture si trovano in campo, è di vitale importanza assumere tutti quegli accorgimenti che permettono di limitare il proliferare dei funghi patogeni. Tutti i fattori che verranno di seguito elencati sono coinvolti ed interconnessi tra di loro, dando origine a sistemi estremamente complessi. L'efficacia di ogni singolo fattore è spesso parziale, per questo motivo è fondamentale controllare, per quanto possibile, e bilanciare ogni singolo elemento, al fine di ottenere un sistema agricolo equilibrato.

La gestione del terreno

Le lavorazioni del terreno che si effettuano prima della semina sono molto importanti; devono essere condotte in modo tale da favorire ed incentivare lo sviluppo delle piante, evitando l'instaurarsi di situazioni di stress anche se limitate a brevi periodi, in quanto qualsiasi condizione di stress porta la pianta ad una minor crescita e la espone all'attacco dei funghi patogeni con conseguente accumulo di metaboliti tossici. Di estrema importanza sono tutte quelle lavorazioni che mirano tra l'altro all'interramento dei residui colturali della coltura precedente; è noto infatti che molti funghi si conservano saprofitariamente su tali residui, substrato in cui trovano le

condizioni ideali per superare le stagioni con condizioni climatiche difficili, per poter svernare e dare origine ad una nutrita fonte d'inoculo.

Lavorazione tipica che permette di attuare questi interrimenti è l'aratura, particolarmente consigliata su terreni che prima di ospitare il mais abbiano accolto colture autunno-vernine o la stessa coltura di mais, in quanto, l'interramento dei residui permette alla microflora presente nel terreno di attuare la decomposizione di tali residui e porta alla devitalizzazione del micelio fungino. Affinché gli effetti benefici siano validi ed ottimizzati, l'aratura dovrebbe essere effettuata il prima possibile, e comunque entro 60 giorni dalla raccolta della coltura precedente. Tecniche alternative di lavorazione come minimum tillage o no-tillage, associate ad un programma di monosuccessione di mais, possono portare all'aumento del potenziale d'inoculo con il susseguirsi di tutte le problematiche note.

Di particolare importanza è anche lo sgrondo delle acque in eccesso, in particolar modo in quei terreni che soffrono di ristagno idrico, in quanto ambienti eccessivamente umidi, favoriscono l'insediarsi e lo sviluppo dei funghi. All'opposto, terreni che hanno una tessitura principalmente sabbiosa, possono indurre stress alle piante dovuto al fatto che soffrendo di siccità la pianta può entrare in stress idrico se non si interviene tempestivamente con interventi irrigui che ripristino un livello ottimale di umidità del terreno (Mosca, 2006).

Le successioni colturali

La rotazione colturale è una pratica molto utile al fine di poter controllare la quantità di patogeno nei terreni, nonché la successiva diffusione. La monosuccessione infatti facilita l'accumularsi di un patogeno in un dato ambiente, con la conseguente ricomparsa in grande quantità nel ciclo colturale successivo; questo è particolarmente evidenziato quando la coltura in precessione ha subito attacchi.

In questo modo la coltura che verrà seminata ha un'altissima possibilità di essere colpita dai funghi patogeni con attacchi generalizzati, sia allo stocco, che alla spiga.

Proprio in virtù del fatto di quanto appena visto, sono caldamente consigliate le rotazioni colturali che, se incluse in un programma di avvicendamento della durata superiore ai 2 anni, aiuta sensibilmente alla riduzione della carica d'inoculo fungina. Le specie vegetali che più si prestano ad entrare negli avvicendamenti colturali sono la barbabietola, l'erba medica, la soia ed il girasole (Zucchi et al., 2005).

Epoca e densità di semina

La semina è una fase sempre molto delicata in quanto, eventuali problematiche in questo step, possono avere ripercussioni anche di grave entità per tutta la durata del ciclo produttivo.

Questa operazione va eseguita al momento opportuno, ed alla presenza delle condizioni agronomiche e climatiche ottimali (10°C per quanto concerne la temperatura del terreno e protratta da alcuni giorni, con una profondità di deposizione seme di circa 5 cm) (Reyneri, 2005; Causin, 2006; Battilani et al, 2008).

Semine tardive (effettuate cioè all'incirca durante la terza decade del mese di Aprile) sono da evitare, in quanto espongono la coltura ad un eccessivo rischio (nello specifico se vengono usati ibridi delle classi FAO 600 e 700) di contaminazione, dovuto al fatto che le fasi fenologiche più sensibili coincidono con la massima attività del patogeno.

Le semine precoci, affiancate alla scelta di ibridi precoci, sono da preferire in quanto portano ad un anticipo dell'epoca di fioritura (la fase fenologica più delicata); questo permette di contrastare meglio le infezioni dei micopatogeni, oltre ad avere anche vantaggi quali la competizione coltura-malerbe e l'esposizione della pianta nei momenti in cui essa è più vulnerabile all'attacco degli insetti. Avvalendosi della semina anticipata si è in grado di contenere danni diretti ed indiretti provocati dalla piralide ed altri insetti minatori, in quanto le fasi fenologiche della pianta maggiormente esposte ed il ciclo di riproduzione dell'insetto, risultano sfasati.

Queste strategie sono quelle più utilizzate nell'ambiente maidicolo italiano per attenuare le problematiche derivanti da questi insetti e sono valide solo se si utilizzano ibridi appropriati in grado cioè di resistere ai ritorni di freddo (Maiorano et al., 2007). Tali accorgimenti permettono di ottenere sensibili diminuzioni della quantità di tossine presenti nella granella.

Anche la densità di semina riveste un ruolo importante sotto questo aspetto; ad esempio una densità di semina troppo elevata accentua il rischio di stress idrico e permette l'instaurarsi di condizioni micro-climatiche favorevoli allo sviluppo dei patogeni fungini. In terreni sciolti, e ove non sia possibile attuare un'irrigazione della coltura, è necessario diminuire la densità ottimale di semina di 1-1,5 piante/m². Alcune sperimentazioni effettuate in diversi areali maidicoli del Nord Italia hanno dimostrato che densità di semina superiori a 8,5 piante /m² possono incrementare sensibilmente gli accumuli delle più comuni Fusarium-tossine (Blandino et al., 2008).

La concimazione

È di vitale importanza curare con precisione questo aspetto, in quanto la corretta gestione della concimazione, evita alle piante di incorrere in stress nutrizionali (carenze ed eccessi) che possono favorire la sintesi e l'accumulo di composti tossici.

L'elemento nutritivo a cui porre maggiore attenzione è l'azoto; le piante che manifestano i tipici sintomi di carenza azotata (come uno sviluppo limitato ed una produzione inferiore alla media) sono più propense a soffrire la contaminazione da micotossine, in modo particolare di AFs. Al contrario un'eccessiva distribuzione d'azoto porta al verificarsi di accumuli di fumonisine; questo fatto è probabilmente correlato all'instaurarsi di condizioni micro-climatiche come un decremento della circolazione dell'aria tra le piante ed il conseguente verificarsi di elevati livelli di umidità dovuta all'eccessiva vigoria provocata dagli eccessi azotati (Scudellari et al., 2007).

Altro fattore importante da considerare è che lo stato nutrizionale delle piante è in grado di influenzare la loro suscettibilità verso molti patogeni e, nello specifico, colture che si trovano in ambienti eccessivamente azotati dimostrano una minore resistenza rispetto alle colture che sono fertilizzate in modo equilibrato (Battilani et al., 2008).

Nelle concimazioni azotate che prevedono la distribuzione di dosi superiori a 100 kg/ha in copertura, è opportuno dilazionare tale quantità in più interventi ed abbinarli a sarchiatura, al fine di interrare il fertilizzante per evitarne il degrado ed ottimizzarne l'effetto.

La gestione delle infestanti

La lotta alle malerbe è importante in quanto elimina delle piante che possono competere con la coltura per la disponibilità idrica e nutrizionale (Battilani et al., 2008), infatti la crescita di erbe infestanti può essere causa di stress alla coltura la quale, non trovandosi in condizioni di fitness ideale, risulta più suscettibile ed esposta agli attacchi fungini. È quindi consigliato attuare un valido programma di lotta alle infestanti avvalendosi di diserbanti chimici in pre e post emergenza qualora fossero necessari, ai quali vanno abbinate le lavorazioni, come la sarchiatura, nella fase di levata.

L'irrigazione

Questa pratica è di estrema importanza nel processo di coltivazione del mais; essa infatti aiuta a contenere la contaminazione e l'accumulo di composti tossici nel mais in quanto evita o attenua gli stress idrici.

Inoltre tramite l'irrigazione è possibile controllare, anche se in parte, parametri microclimatici come temperatura e umidità, fattori che influenzano il diffondersi dei funghi patogeni. Ad esempio, qualora si verificassero stress idrici in concomitanza con temperature superiori a 30°C per periodi prolungati, si instaurano in campo le condizioni ideali per il proliferare dei funghi del genere *Aspergillus*; se la condizione di stress si verifica nelle fasi che seguono la maturazione latte delle cariossidi, il rischio di elevate contaminazioni sarà più elevato.

Al contrario, al verificarsi di estati dalle condizioni climatiche più fresche ed umide, ad essere favoriti nello sviluppo sono i funghi del genere *Fusarium*. In virtù di quanto appena riportato bisogna impostare una gestione delle irrigazioni equilibrata, che tenga conto di tutte le variabili in gioco e dove i patogeni spesso trovano le condizioni ottimali di crescita che sono opposte tra i vari generi. Diverse prove hanno evidenziato che la modalità di distribuzione dell'acqua ad aspersione, a confronto con l'irrigazione a manichetta, ha portato ad un maggiore abbattimento del livello di micotossine. Nelle colture gestite con l'irrigazione ad aspersione si è assistito ad un minore attacco di *O. nubilalis*, imputabile all'effetto di "dilavamento" che questa modalità d'irrigazione ha sulle piante (Anconelli et al., 2007).

La difesa contro gli insetti

Data l'entità dei danni e delle problematiche che gli insetti arrecano alle colture di mais, la difesa delle piante da quest'ultimi ricopre un ruolo chiave per poter gestire la contaminazione da micotossine nelle colture. Come si è visto, nei nostri areali, è la piralide l'insetto che più è presente e che determina le problematiche più importanti. Nonostante questo, esso non è il solo a ricoprire un ruolo di criticità nelle colture, in quanto a livello mondiale ci sono anche altri insetti che rappresentano una minaccia alla salute ed all'integrità delle piante; ci si riferisce in particolar modo ai lepidotteri nottuidi e coleotteri elateridi in primis.

Ad esempio negli Stati Uniti, insetti diversi dalla piralide quali *Heliothis zea* e *Spodoptera frugiperda*, sono responsabili della diffusione dei miceti tossigeni in qualità di vettori. È noto che queste larve diffondono le spore ed i conidi dei funghi trasportandoli (in quanto le larve si "sporcano" con queste strutture riproduttive) attraverso le rosure e le ferite che esse provocano alla pianta (Down, 1998).

Interventi chimici atti a controllare questi insetti sono di grande aiuto, non solo per ottenere un incremento produttivo, ma anche per diminuire il contenuto di micotossine. Bisogna comunque

tener presente che, essendo il sistema pianta-patogeno-insetto-ambiente molto complesso e strettamente interconnesso, si possono verificare delle situazioni nelle quali, nonostante si attui un buon piano d'intervento contro questi insetti, il risultato finale non corrisponda alle aspettative nel contenuto finale delle micotossine. Questi casi si possono riscontrare quando ad esempio si verificano condizioni climatiche particolarmente sfavorevoli alla pianta e favorevoli al patogeno; a questo punto vi sarà una forte produzione di composti tossici indipendentemente dalla presenza massiccia o meno dell'insetto. Un'altra situazione che si può verificare è che l'insetto, nonostante danneggi la spiga, se quest'ultima ha un livello di umidità tale da non rendere possibile l'azione del fungo, il danno stesso non influenzerà il livello finale di micotossine (Down et al., 1999). Resta comunque di fondamentale importanza attuare, ove e quando necessario, un equilibrato piano d'intervento contro gli insetti che interessano le colture sotto questo aspetto.

1.7.2. La lotta chimica

L'applicazione di un buon protocollo di lotta chimica può risultare molto importante per il controllo dei patogeni e le relative micotossine. Questi interventi si rendono necessari in quanto ci sono fattori come l'andamento climatico che non si possono controllare ed hanno fortissima incidenza nello sviluppo di queste patologie. Qualora si presentassero primavere umide e piovose e con temperature miti (condizioni favorevoli ai micopatogeni), l'intervento chimico è di vitale importanza. Da un punto di vista pratico si interviene sia con anticrittogamici, sia con insetticidi, in quanto come ben noto, gli insetti nella loro forma giovanile quale la larva, sono responsabili di forti contaminazioni dovute al fatto che la pianta si trova in uno stato di stress in seguito all'attacco di queste larve e che esse si comportano come vettori per le spore fungine. Tutti i trattamenti contro i micopatogeni sono eseguiti quando la pianta si trova nella fase fenologica dell'antesi, periodo durante il quale, la pianta è maggiormente esposta agli attacchi di questi funghi.

Ci sono molti principi attivi fungicidi, ma i più diffusi sono i composti cosiddetti azolici come i triazoli, gli imidazoli ed i triazolintioni. I più efficaci e diffusi sono il tebuconazolo, il metconazolo ed il prothioconazolo (Paul et al., 2008, 2010).

Questi principi attivi agiscono inibendo la biosintesi dell'ergosterolo, ottenuta inattivando l'enzima 14 α -demetilasi; scendendo più nel dettaglio questi composti riescono a bloccare l' α -demetilazione nella posizione C14 del 24-metanolodiolanosterolo il quale è un precursore dell'ergosterolo (Brent, 1995). Come conseguenza all'inattivazione di questo enzima si ha il blocco della funzionalità del citocromo P450, che porta ad un deficit di ergosterolo nella membrana fungina, dovuta all'inefficienza del sistema enzimatico. La carenza di ergosterolo altera la permeabilità della membrana e porta all'accumulo di precursori metilati nel citoplasma (Spolti et al., 2012).

1.7.3. La lotta biologica

La lotta biologica mira a contrastare il diffondersi dei patogeni attraverso l'utilizzo dei BCA (Biological Control Agents, ovvero agenti di controllo biologico).

Sono considerati BCA batteri, lieviti e funghi non tossigeni. Tra i vari sistemi per gestire la contaminazione di questi patogeni, la strategia del controllo biologico, in seguito a vari studi effettuati, sembra essere un approccio promettente (Yin et al., 2008).

Diversi sono i batteri utilizzati nella lotta biologica: specie come *Bacillus subtilis*, *Lactobacilli spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Ralstonia spp.* e *Burkholderia spp.* sono stati utilizzati per gestire la

contaminazione da AFs. Nello specifico questi microrganismi sono stati testati contro il genere *Aspergillus* ed hanno dimostrato di essere in grado di inibire lo sviluppo e la produzione delle aflatossine. In questo studio condotto da Palumbo et al., (2006), è stato dimostrato che ceppi di *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Burkholderia* (isolati da mandorla californiana) sono in grado di inibire completamente la crescita di *A. flavus*. È stato anche dimostrato che sempre ceppi di *B. subtilis* e *P. solanacearum*, isolati da terreno coltivato a mais, hanno la capacità di contrastare l'accumulo di aflatossine (Nesci et al., 2005).

Tutti questi risultati però sono stati ottenuti in laboratorio, mentre in campo si assiste ad una forte perdita di efficacia, dovuta al fatto che la distribuzione di un'uniforme e sufficiente carica batterica risulta di difficile attuazione (Dorner, 1998).

All'interno del gruppo dei lieviti, ci sono specie saprofiti quali *Candida krusei* e *Pichia anomala*, che hanno dato esiti molto interessanti contro *A. flavus*. Anch'essi, come i batteri, hanno precluso lo sviluppo di questi funghi in laboratorio, tuttavia, è necessario effettuare ulteriori studi al fine di attestarne l'efficacia in pieno campo.

Risultati interessanti in pieno campo per quanto riguarda il controllo degli Aspergilli si sono ottenuti con l'applicazione di ceppi di patogeni non tossigeni ed in grado di competere con quelli tossigeni; ad oggi risulta la pratica con la quale si ottengono i migliori risultati. Questi patogeni non tossigeni competono con i ceppi tossigeni per lo spazio ed il nutrimento, fattori necessari per lo sviluppo di un micopatogeno, riducendone la presenza in campo e la diffusione. È di fondamentale importanza distribuire una sufficiente quantità d'inoculo al fine di garantire alla coltura un'efficace e massiccia presenza dei ceppi non tossigeni nelle fasi fenologiche più delicate, nelle quali la pianta è maggiormente esposta. Studi hanno dimostrato come la distribuzione prolungata nel tempo per più anni di questi ceppi non tossigeni, sia in grado di garantire un maggior controllo del patogeno tossico.

Inizialmente questi ceppi non tossigeni venivano distribuiti tramite sospensione liquida, spruzzandola sulle piante in via di sviluppo (nelle prime fasi di crescita) o prima della semina, direttamente sul suolo. Questo metodo era molto efficace, ma risultava troppo costoso da applicare su grandi superfici; sono allora stati testati nuovi metodi di distribuzione tramite substrati solidi come crusca di frumento e torba. A questo scopo vengono utilizzate anche cariossidi di frumento o di riso, le quali sono prima sterilizzate e successivamente inoculate con una sospensione liquida contenente il ceppo non tossigeno; al termine della fase d'inoculo le cariossidi vengono incubate e poi essiccate a 50°C. Terminata questa fase si procede alla conservazione delle stesse portandole ad

una temperatura di 5°C sino al loro utilizzo (Dorner, 1998). Quando poi esse vengono distribuite in campo, si ha lo sviluppo del fungo con una forte produzione di conidi che tramite il vento e la pioggia vengono diffusi sulla coltura, dando inizio alla naturale competizione tra questi ceppi non tossigeni e quelli tossigeni.

Un altro agente di controllo biologico molto diffuso ed utilizzato per la lotta biologica contro i generi *Aspergillus* e *Fusarium* è il *Trichoderma*, un genere fungino che racchiude in sé diverse specie di forte interesse. Il genere *Trichoderma* appartiene alla famiglia *Hypocreaceae* ed alla vista appare di aspetto polverulento.

Fu descritto per la prima volta da Persoon nel 1794 e successivamente, con il fondamentale contributo di due micologi, Rifai e Bissett, fu introdotta l'attuale suddivisione oggi nota. Rifai nel 1969 differenziò il genere *Trichoderma* in nove specie aggregate, sulla base della differenze morfologiche micro e macroscopiche tra le specie e dei conidiofori e Bissett nel 1991, partendo dal lavoro svolto dal collega nel 1969, suddivise il genere in cinque sezioni principali, strutturando tale suddivisione sulle caratteristiche delle ramificazioni dei conidiofori e relazionando così molte specie tra loro simili da un punto di vista morfologico. Le cinque sezioni ottenute grazie al lavoro di questi micologi sono:

- *T. sez. Hypocreanum*, (Bissett)
- *T. sez. Longibrachiatum*, (Bissett)
- *T. sez. Pachybasium*, (Bissett)
- *T. sez. Saturnisporium*, (Doi et al.)
- *T. sez. Trichoderma*

Per distinguere una singola specie di questo genere, a differenza di altri, non è sufficiente basarsi sulle sole caratteristiche morfologiche (Samuels, 1996). I tratti, che combinati tra loro sono in grado di garantire una valida descrizione della specie, sono il tasso di crescita e la forma morfologica dei conidiofori (Gams e Bissett, 1998).

Il genere *Trichoderma* è ubiquitario, ovvero presente in ogni ambiente del pianeta; si trova principalmente nei suoli (Samuels, 1996) e ha come peculiarità quella di comportarsi in maniera opportunistica. È in grado di stabilire rapporti "simbiontici" con molte piante e di manifestare un'azione antagonista verso molti funghi patogeni (Harman et al., 2004). I funghi del genere *Trichoderma*, oltre a ricoprire un importante ruolo nel settore agricolo in qualità di BCA, vengono utilizzati anche come biofertilizzanti o ammendanti per il terreno (Harman et al., 2004). Non tutte

le specie appartenenti a questo genere hanno le caratteristiche necessarie per essere utilizzate nel settore agro-industriale, in quanto dotate di differenti capacità metaboliche e gradi di aggressività (Kubicek e Harman, 1998).

Le caratteristiche che rendono questo genere fungino di così vivo interesse sono:

- l'efficienza nel colonizzare la rizosfera sviluppandosi in associazione con le radici delle piante
- la capacità di competere e controllare diversi organismi patogeni delle piante
- la capacità di migliorare lo stato fitosanitario delle piante
- la capacità di incentivare e favorire la crescita radicale

Per quanto riguarda la capacità di controllare i fitopatogeni, l'interazione che intercorre tra *Trichoderma* e patogeno è composta da più processi, ma i tre di maggiore importanza sono il micoparassitismo, la competizione e l'antibiosi (Sharma, 2011). Questi processi possono svolgersi anche in maniera complementare, ovvero manifestarsi contemporaneamente.

Indubbiamente il micoparassitismo è l'aspetto più importante che prevede l'attacco diretto ad un fungo patogeno. Questo processo si compone di tre fasi principali quali l'individuazione dell'ospite, la penetrazione, ed infine la distruzione dello stesso (Vinale et al., 2008). Nella fase di individuazione il *Trichoderma* localizza ed identifica l'ospite; questo avviene come risposta ad uno stimolo che può essere di tipo fisico (noto come fenomeno del tigmotropismo) o chimico (chiamato chemiotropismo positivo). Quest'ultimo prevede che il *Trichoderma* si muova verso l'ospite in quanto le ife dell'antagonista sono attratte da sostanze chimiche metabolizzate dall'ospite. Il funzionamento è il seguente: durante tutto il suo ciclo vitale il *Trichoderma* sintetizza degli enzimi in grado di idrolizzare le pareti delle cellule del patogeno ospite (questo complesso enzimatico prende il nome di CWDEs, acronimo di "Cell Wall Degrading Enzymes"), il quale rilascia delle molecole chimiche che il *Trichoderma* capta, riconoscendo quindi la posizione del patogeno e dirigendo il proprio sviluppo ifale verso di esso (Woo e Lorito, 2007; Vinale et al., 2008). Gli enzimi del complesso CWDEs colpiscono specificamente biopolimeri contenuti solo all'interno delle pareti cellulari dei funghi, senza causare quindi danni alle piante (Lorito, 1998). Una volta terminata la fase di individuazione del patogeno, il *Trichoderma* passa a quella della penetrazione.

Le ife dell'antagonista entrano in contatto con l'ospite; il *Trichoderma* avvolge il patogeno, forma gli appressori (strutture di ife che permettono di aderire al micelio del patogeno) (Harman et al., 2004) ed inizia a sintetizzare gli enzimi in grado di distruggere la parete cellulare dell'ospite. Il *Trichoderma* prosegue nell'azione attuando di fatto l'inizio della terza ed ultima fase, ovvero quella di distruzione

dell'ospite, che prevede la completa lisi del micelio del patogeno e la totale distruzione di tutte le strutture di conservazione (Vinale et al., 2008). La distruzione dell'ospite avviene in seguito all'azione sinergica degli enzimi CWDEs ed altri metaboliti secondari (Druzhinina et al., 2011).

Un altro processo importante per la lotta contro i patogeni è la competizione. Il *Trichoderma* è un competitore molto aggressivo in quanto cresce velocemente e colonizza rapidamente il substrato sul quale si trova (Ozbai e Newman, 2004). I fattori per i quali il *Trichoderma* entra in competizione con i patogeni sono essenzialmente le sostanze nutritive e lo spazio necessario alla crescita (Howell, 2003).

Il terzo processo attraverso il quale *Trichoderma* interagisce con i patogeni è l'antibiosi, ovvero la produzione da parte dell'antagonista di sostanze chimiche in grado di compromettere ed inibire lo sviluppo e la normale attività del patogeno. Tra i composti tossici per i patogeni che il *Trichoderma* metabolizza ci sono il 6-pentil- α -pirone, l'acido harzianico, la trichodermina, la tricholina, il massoilactone, la gliovirina e la viridina (Vey e Hoagland, 2001). Queste molecole possono essere suddivise in tre categorie principali: i composti volatili, gli idrosolubili ed i peptaiboli (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991). Tutte queste sostanze chimiche sintetizzate dal *Trichoderma*, agiscono in svariati modi, sortendo effetti fungistatici, battericidi ed inibendo gli enzimi dei patogeni responsabili della sintetizzazione della parete cellulare. Diversi studi sono in corso, con lo scopo di produrre in laboratorio queste sostanze in grande quantità, al fine di creare prodotti anticrittogamici da poter distribuire in pieno campo e con l'obiettivo di simulare l'azione del *Trichoderma* (Vey e Hoagland, 2001; Benitez et al., 2004; El-Hasan et al., 2007; Woo e Lorito, 2007; Vinale et al., 2008).

Un altro aspetto di estrema importanza è l'interazione pianta-*Trichoderma* che si instaura tra i due individui; essa ha luogo nella cosiddetta "rizosphere competence" (Howell, 2003). Consiste nel fatto che, il *Trichoderma* penetra nella pianta attraverso le radici, causando modificazioni morfologiche e biochimiche, le quali permettono al fungo di diventare parte integrante del sistema pianta (Ozbai e Newman, 2004) dando origine di fatto ad una forma di opportunismo simbiotico (ove il fungo sfrutta gli zuccheri contenuti negli essudati radicali) tipico dei funghi micorrizici. La pianta reagisce a questa "invasione" costruendo una barriera che ha un alto contenuto di callosio e cellulosa (Yedidia et al., 1999; Chacon et al., 2007; Druzhinina et al., 2011), ma non distrugge le ife fungine. Una volta penetrato nelle radici della pianta, il *Trichoderma* instaura una comunicazione biochimica con il vegetale, sintetizzando sostanze chimiche in grado di generare e modulare segnali ormonali.

Questa "simbiosi" porta svariati vantaggi anche alla pianta; nello specifico si verificano diversi cambiamenti di carattere biochimico. I due più importanti riguardano l'acquisizione della resistenza

ai patogeni come la SAR (Systemic Acquired Resistance o resistenza sistemica acquisita) e la ISR (Induced Systemic Resistance o resistenza sistemica indotta). La SAR solitamente indotta dall'attacco di un patogeno, viene tradotta in molecole che trasportano il segnale in tutta la pianta, seguendo il percorso metabolico dell'acido salicilico (Ryals et al., 1996), mentre la ISR è la risposta da parte della pianta alla penetrazione di patogeni non virulenti e viene tradotta anch'essa in molecole segnale utilizzando le vie biosintetiche dell'acido jasmonico e dell'etilene (Harman et al., 2004); in questo modo la pianta è in grado di tollerare l'invasione del patogeno (Shoresh et al., 2010). Nella ISR la capacità della pianta di riconoscere il patogeno è dovuta ai MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns), composti chimici in grado di identificare le molecole associate ad alcuni patogeni (Bent e Mackey, 2007). Grazie ai segnali indotti dai MAMPs la pianta inizia a sintetizzare fitoalessine, sostanze con lo scopo di arginare e contrastare il patogeno. Inoltre la pianta inizia ad accumulare callosio e cellulosa nelle zone ove "l'invasore" è penetrato al fine di costruire una barriera per arginarne meccanicamente l'avanzamento (Hermosa et al., 2012). Oltre a questi vantaggi, dovuti alla resistenza ai patogeni, l'interazione *Trichoderma*-pianta favorisce lo sviluppo dell'apparato radicale, garantendo alla pianta un migliore ancoraggio ed un maggior sfruttamento degli elementi nutritivi, consentendo così un miglior fitness nonché un incremento di biomassa dovuto allo sviluppo del vegetale (Harman et al., 2004).

1.7.4. La scelta varietale

La scelta di un ibrido idoneo è fondamentale; essa permette di utilizzare la pianta con le caratteristiche che meglio si adattano all'ambiente dove deve crescere e produrre.

Nella scelta dell'ibrido bisogna tener conto che la pianta dovrà affrontare stress di natura biotica (come la competizione con le erbe infestanti e la presenza di patogeni) e di natura abiotica (eccessive temperature, carenze idriche e squilibri nutrizionali). Un aspetto molto importante da tenere in considerazione nella scelta dell'ibrido da utilizzare è la classe di maturazione (classe FAO); questo perché, a seconda della zona di coltivazione e del clima locale, si cerca di ridurre la durata della finestra temporale che inizia dalla maturazione latte delle cariossidi e che si protrae sino alla raccolta, periodo durante il quale la pianta è molto suscettibile agli stress che possono causare importanti perdite produttive, con conseguente danno economico.

Ne deriva che, due caratteristiche molto importanti che influenzano la scelta dell'ibrido da coltivare, sono la capacità di mantenere una certa stabilità produttiva e la capacità della pianta di adattarsi alle condizioni ambientali.

Alcune proprietà fisiologiche e morfologiche della pianta sono in grado, anche indirettamente, di contenere l'accumulo di micotossine e, oltre a quelle appena citate, ce ne sono altre di una certa importanza che influenzano la scelta varietale; esse sono la capacità di tollerare gli stress idrici, la proprietà di reclinare la spiga nella fase fisiologica di riempimento delle cariossidi, la totale copertura da parte delle brattee della spiga (è un'importante forma di protezione meccanica), la resistenza delle brattee e l'aderenza che esse hanno sulla spiga (questa peculiarità è un punto a favore nel contrastare gli Aspergilli ed il *F. verticillioides*, ma sfavorevole contro *F. graminearum*), lo spessore delle brattee che aiuta ad ostacolare l'eventuale propagazione fungina.

Nonostante il ricorso al miglioramento genetico abbia dato un grandissimo aiuto e ottenuto ottimi risultati nel controllare diverse fitopatie, tra cui anche molte patologie di origine fungina, per quanto riguarda l'aspetto che interessa la contaminazione da micotossine è tutt'ora in fase di studio una soluzione efficiente, in quanto il lavoro di miglioramento genetico sino a qui attuato, non ha portato a risultati soddisfacenti. Questo è dovuto al fatto che l'accumulo di composti tossici nella pianta di mais è un processo che interessa numerose variabili fortemente interconnesse tra di loro e di non facile gestione.

Al fine di attuare una valida gestione della contaminazione da parte di queste tossine, l'ottenimento di ibridi in grado di contrastare questo fenomeno, è sicuramente un aspetto fondamentale. Esso, avvalendosi anche di tutti quegli accorgimenti e quelle pratiche agricole che sono state riportate in precedenza, può garantire un prodotto dalle spiccate caratteristiche di qualità e salubrità che permette di contenere fortemente le patologie riscontrabili in animali ed esseri umani e causate da questi composti tossici.

1.7.5. L'utilizzo di piante geneticamente modificate

L'impiego di tecniche di ingegneria genetica offre soluzioni interessanti che aiutano a gestire la contaminazione da micotossine. Essa consiste nel creare piante in grado di resistere agli attacchi ed alle infezioni dei patogeni, manipolandone il DNA, potenziando l'espressione di geni che codificano sostanze chimiche ad attività insetticida ed antifungina e che sono naturalmente presenti all'interno del patrimonio genetico del vegetale, o inserendo porzioni di DNA proveniente da altri organismi

viventi, al fine di dotare la pianta della capacità di sintetizzare determinate molecole chimiche. Molti studi mirano a potenziare l'espressione di quei geni che naturalmente sono presenti nel genoma della pianta, come quelli che codificano gli inibitori della proteasi (Vogel et al., 1968) e che esercitano un'azione tossica sugli insetti, dotando la pianta di una resistenza naturale (Richardson, 1991).

Un diverso approccio mira invece a far esprimere alle piante molecole che naturalmente non sono sintetizzate. Probabilmente il mais geneticamente ingegnerizzato più noto sotto questo aspetto è il cosiddetto "mais Bt", al quale è stato impiantato nel genoma un gene che proviene da un microrganismo come il *Bacillus thuringiensis*.

Naturalmente questo batterio gram-positivo si trova nel suolo e, grazie a questo gene, è in grado di sintetizzare una molecola tossica (proteina CRY) per molte specie d'insetti. Questa sostanza viene racchiusa in una paraspore prodotta da *B. thuringiensis* durante il suo ciclo vitale nella fase stazionaria (Griffitts et al., 2005). Grazie alle tecniche di ingegneria genetica questo gene, opportunamente modificato, è stato inserito nel corredo genetico di diverse specie vegetali, tra cui quella di *Zea mays*, permettendone la sintesi ed il conseguente accumulo nei tessuti della pianta.

Quando la larva dell'insetto si nutre dei tessuti di una pianta Bt, la tossina in essi presente viene ingerita, ed una volta attivata dagli enzimi digestivi presenti nell'apparato digerente delle larve, si lega al rivestimento intestinale formando canali ionici che alterano l'omeostasi cellulare, danneggiando così la cellula. Dopo poche ore dall'ingestione dei tessuti "contaminati" dalla proteina, la larva smette di cibarsi e nell'arco di 3-4 giorni muore.

Oltre a questa sequenza genica, ne sono state individuate altre che codificano per proteine che risultano tossiche per diverse specie di insetti, tra i quali i lepidotteri, i coleotteri, gli ortotteri, gli omotteri, i mallofagi e gli imenotteri (Schnepf et al., 1998). Recentemente sono stati scoperti due ceppi di lieviti ed uno di batteri che sono in grado di crescere metabolizzando e degradando la tossina FB₁ e producendo come prodotti di scarto solo CO₂. Gli enzimi che operano questa trasformazione biochimica sono stati isolati e sono in fase di studio, al fine di creare delle piante transgeniche, in grado di esprimere tali enzimi ed avere quindi la capacità di degradare la fumonissina B₁ (Jouany, 2007).

Anche se la sola ingegneria genetica da sola non riesce a contenere completamente la contaminazione da micotossine, sicuramente apporta un forte aiuto nell'intento di perseguire questo obiettivo. Attualmente in Italia non è consentita la coltivazione di piante geneticamente

modificate, di conseguenza per poter gestire questa problematica è necessario focalizzare l'attenzione sugli altri sistemi, attuando una forte collaborazione tra di essi.

La gestione della contaminazione da micotossine nel mais è complicata perché si tratta di fenomeni complessi e fortemente integrati tra di essi.

La presenza e la quantità del fungo produttore di micotossine è molto importante, poiché le tossine sono composti del metabolismo secondario, e che i fattori che influenzano il metabolismo fungino possono intervenire modulandolo nella sintesi delle sostanze tossiche.

Per questo motivo nei protocolli di gestione delle contaminazioni sono compresi molti interventi diversi tra di loro, di diversa natura, che devono essere opportunamente integrati tra di essi, poiché ciascuno di questi interventi può dare solo effetti parziali.

Tra questi, l'utilizzo di varietà resistenti, come è avvenuto per molte altre patologie fungine, è una possibilità molto promettente.

Tuttavia per quanto riguarda i funghi produttori di micotossine, non ci sono molti lavori, e soprattutto, non vengono ancora prodotti a livello commerciale degli ibridi selezionati a questo scopo.

Per dare un piccolo contributo alla tematica appena citata, sono state realizzate alcune prove di campo per saggiare il comportamento di alcune nuove varietà ritenute interessanti sotto questo aspetto.

2. Materiali e metodi

2.1. Organizzazione delle prove sperimentali

Il presente lavoro di tesi comprende tre differenti prove sperimentali di campo.

La prima (**Prova di Campo 1**) ha previsto l'allestimento in 5 diverse province del Nord Italia (Bergamo, Cremona, Pavia, Rovigo e Verona) di una sperimentazione di confronto varietale comprendente 8 ibridi di mais appartenenti alle classi FAO 600, 650 e 700 (2 replicazioni per ogni ibrido), al fine di determinare la risposta dei diversi genotipi in termini di qualità della granella raccolta, anche in relazione ai diversi ambienti di coltivazione. Di seguito (**figura 2.2**) sono riportate le lavorazioni colturali effettuate nelle parcelle oggetto di prova.

Oltre a questa, sono state allestite due ulteriori sperimentazioni (strip test), una in provincia di Rovigo, comune di Borsea (**Prova di Campo 2**) e una in provincia di Venezia, comune di Scorzè (**Prova di Campo 3**) con lo scopo di valutare tre differenti ibridi di mais. Vengono sotto riportate le lavorazioni colturali eseguite nella prova di Borsea (**figura 2.1**).

Operazione colturale	Data	Note
Aratura autunnale 40 cm	settembre 2013	
Estirpatura	ottobre 2013	
Concimazione di fondo	marzo 2014	3 q.li/ha di 10-26-26
Erpicoltura	marzo 2014	
Semina	1 aprile	Trika localizzato 10kg/ha
Distribuzione diserbante	19 aprile	Adengo 1,5 l/ha
Sarchiatura	primi di maggio	3,7 q.li/ha di urea su precoci 4,5 q.li/ha di urea su tardivi
Irrigazioni	21-24 giugno	55 mm
Trattamento piralide	24 luglio	Coragen
Raccolta	20 agosto	raccolta dei precoci
	19 settembre	raccolta dei tardivi

Figura 2.1. Lavorazioni eseguite nelle parcelle sperimentali di Borsea (Prova di Campo 2).

BERGAMO	CREMONA
Tipo di Terreno: Medio Impasto (con scheletro) Lavorazioni: Aratura + Erpicatura Concimazione pre-semi: Teflutar (30 Kg/Ha) Semina: 20 marzo Concimazione Azotata: Entec 500 Kg/Ha Diserbo pre-emergenza: Lumax (4 l/Ha) Irrigazione: n° 1 per scorrimento Trattamento Piralide: Si Raccolta: 22 settembre	Tipo di Terreno: Medio Impasto Lavorazioni: Ripuntatore + Erpicatura Concimazione pre-semi: Liquame + Digestato Semina: 10 aprile Concimazione copertura: Entec 600 Kg/Ha Diserbo pre-emergenza: Lumax (4 l/Ha) Irrigazione: n° 2 per scorrimento Trattamento Piralide: No Raccolta: 29 settembre
PAVIA	ROVIGO
Tipo di Terreno: Medio Impasto-Sabbioso Lavorazioni: Aratura + Erpicatura Concimazione pre-semi: 12-5-20 (650 Kg/Ha) Semina: 4 aprile Concimazione copertura: Entec 450 Kg/Ha Diserbo pre-emergenza: Adengo (1,8 l/Ha) Irrigazione: n° 2 per scorrimento Trattamento Piralide: No Raccolta: 28 settembre	Tipo di Terreno: Medio Impasto - Argilloso Lavorazioni: Aratura + Erpicatura Concimazione pre-semi: N 90 U, P 90 U, K 100 U Semina: 26 marzo Concimazione copertura: Urea 400 Kg/Ha Diserbo pre-emergenza: Adengo (1,8 l/Ha) Irrigazione: n° 1 per Aspersione Trattamento Piralide: Si Raccolta: 15 settembre
VERONA	
Tipo di Terreno: Medio Impasto Lavorazioni: Aratura + Erpicatura Concimazione pre-semi: 15.15.15. 3 q.li/ha Semina: 4 aprile Concimazione copertura: Blu formula 400 Kg/Ha Diserbo pre-emergenza: Adengo (1,8 l/Ha) Irrigazione: manichetta Trattamento Piralide: Si Raccolta: 17 settembre	

Figura 2.2. Lavorazioni culturali eseguite nelle parcelle prova delle 5 località (Prova di Campo 1).

2.2. Raccolta e processazione dei campioni

Per la Prova di Campo 1, alla maturazione di raccolta si è proceduto al prelievo manuale delle spighe (20 per replicazione) e alla valutazione dello stato fitosanitario delle stesse al fine di determinare il danno causato dai miceti del genere *Fusarium*, avvalendosi di una scala di severità del danno variabile da 1 (spiga sana) a 9 (100% di spiga colpita), e a rilevare eventuali attacchi da piralide. Una volta ultimata l'indagine visiva, le spighe sono state sgranate e la granella ottenuta è stata pesata al fine di stimare la produttività dell'ibrido.

Nelle prove sperimentali condotte a Borsea (Prova di Campo 1) e Scorzè (Prova di Campo 2), invece, la granella di mais è stata raccolta con l'utilizzo della mietitrebbia; si è proceduto, dunque, ad un campionamento dinamico nel punto di scarico tra il carro-pesa, dove la mietitrebbia ha scaricato il prodotto raccolto, e il rimorchio.

La granella è stata poi essiccata sino a stabilizzarla al 13% di umidità; l'essiccazione, per la quale ci si è avvalsi di una attrezzatura aziendale, è stata effettuata a basse temperature (40-42°C) al fine di mantenere viva la popolazione fungina presente nelle cariossidi.

Ogni campione è stato completamente macinato tramite l'utilizzo di un mulino e ricampionato in modo dinamico sino ad ottenere un sottocampione di 500 grammi circa; la farina così ottenuta è stata nuovamente macinata ad un grado di finezza maggiore grazie ad un mulino a lame rotanti da laboratorio e suddivisa in aliquote uguali per le successive indagini di laboratorio.

2.3. Indagini micologiche e chimiche di laboratorio

Le analisi micologiche sono state effettuate presso i laboratori del Dipartimento TeSAF dell'Università degli Studi di Padova avvalendosi delle tecniche tradizionali di coltivazione microbica. Tale procedimento prevede la diluizione seriale di sospensioni di farine di mais, la purificazione dei funghi tramite l'utilizzo di substrati specifici e la successiva quantificazione di tali patogeni attraverso il conteggio delle CFU (Colony Forming Unit) e dei rispettivi limiti fiduciali secondo il metodo proposto da Fisher e Yates (1953).

Partendo da 50 grammi di farina sospesi in 450 millilitri di acqua sterile, tenuti costantemente in agitazione tramite un agitatore magnetico, si è proceduto ad effettuare la serie di diluizioni di seguito riportata (**figura 2.3**).

N° beuta	Diluizione	
1	Sospensione madre	50 g di farina + 450 ml di H2O sterile
2	1:10	50 ml dalla beuta 1 + 450 ml di H2O sterile
3	1:100	50 ml dalla beuta 2 + 450 ml di H2O sterile
4	1:1.000	50 ml dalla beuta 3 + 450 ml di H2O sterile
5	1:10.000	50 ml dalla beuta 4 + 450 ml di H2O sterile
6	1:100.000	50 ml dalla beuta 5 + 450 ml di H2O sterile
7	1:1.000.000	50 ml dalla beuta 6 + 450 ml di H2O sterile

Figura 2.3. Schema delle diluizioni seriali prodotte per analizzare le farine.

Per ogni diluizione sono state inoculate, con 0,5 ml di sospensione, 5 capsule Petri contenenti terreno di coltura PDA (Potato Dextrose Agar) addizionato con streptomina in concentrazione di 5 mg/ml (antibiotico a largo spettro che impedisce lo sviluppo di colonie batteriche che possono compromettere il riconoscimento e la quantificazione dei funghi che si accrescono). Le capsule Petri sono state poi incubate al buio a temperatura costante di 25°C per 4 giorni, trascorsi i quali si è provveduto al riconoscimento delle colonie attribuibili al genere *Fusarium*.

Le indagini chimiche riguardanti la quantificazione del contenuto di fumonisine totali (B₁+B₂) dei campioni delle Prove di Campo 1 e 3 e la determinazione del deossivalenolo per tutti i campioni delle tre prove sono state effettuate presso i laboratori del Dipartimento TeSAF avvalendosi del metodo Lateral Flow, (Vicam®), mentre le analisi sul contenuto di fumonisine delle farine della Prova di Campo 2 sono state condotte dalla ditta Neutron (MO), utilizzando il metodo LCMS.

2.4. Elaborazioni statistiche

Per quanto riguarda i risultati ottenuti riguardanti l'analisi visiva delle spighe e le rese ottenute per ibrido e per località (**figura 3.6**) si è proceduto all'analisi della varianza (ANOVA, Test di Duncan per $p=0,05$), dopo adeguata trasformazione dei dati (trasformazione angolare per quanto riguarda l'indice di malattia da *Fusarium* e la percentuale di attacco da piralide e trasformazione logaritmica per le rese in granella).

Per i dati relativi alla carica fungina riportati nelle **figure 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.35, 3.36, 3.39, 3.40** e la produttività della popolazione di *Fusarium* produttori di fumonisine (**figura 3.34**) sono stati indicati i limiti fiduciali calcolati per $p=0,05$.

Per i risultati delle analisi chimiche eseguite con il metodo Lateral Flow, (Vicam®), riportati in **figura 3.12, 3.38, 3.41 e 3.42**, sono stati utilizzati, invece, i limiti fiduciali della misura determinati sulla base delle equazioni dei limiti di confidenza ($p=0,05$) della retta di taratura ricavata utilizzando campioni a titolo noto.

L'elaborazione dei dati complessivi riguardanti tutte le località e tutti gli ibridi (**figura 3.28, 3.29, 3.30, 3.31, 3.32 e 3.33**) è stata eseguita attraverso l'analisi della varianza a due fattori (ANOVA, Test di Duncan per $p=0,05$) considerando come fattori ibrido e località.

L'analisi della varianza ANOVA (Test di Duncan) è stata condotta utilizzando il programma statistico CoStat® (CoHort software, Berkeley, Ca).

3. Risultati

3.1. Risultati della Prova di Campo 1

Determinazione dello stato fitosanitario delle spighe e stima delle rese in granella

Di seguito vengono riportate le tabelle con i risultati delle indagini visive, quindi l'indice di malattia di *Fusarium*, la percentuale di attacco da piralide e le rese in granella (14% di umidità), ottenuti dalla media delle due replicazioni per le sperimentazioni condotte a Bergamo (figura 3.1), Cremona (figura 3.2), Pavia (figura 3.3), Rovigo (figura 3.4) e Verona (figura 3.5).

L'ibrido B1 ha avuto le peggiori performance in tutte e cinque le località oggetto di test per quanto riguarda l'attacco da parte degli agenti della Fusariosi della spiga. A questo, per le località di Bergamo e Cremona corrisponde anche il maggior attacco di piralide (*O. nubilalis*).

Per quanto riguarda la resa in granella, la tesi A1 si è rivelata la meno produttiva a Bergamo, Cremona e Pavia, la C6 la meno produttiva a Verona e Rovigo, mentre gli ibridi che hanno prodotto di più sono diversi a seconda della località considerata.

		Media Replicazioni (1-2)		
BERGAMO	Ibrido	Indice di malattia (%) <i>Fusarium spp.</i>	Attacco (%) piralide	Resa granella (q/ha)
	C1	25	66	194
	A1	36	78	167
	C2	36	58	184
	C3	19	75	186
	C4	24	75	193
	B1	59	83	184
	C5	12	43	189
	C6	25	56	199

Figura 3.1. Risultati delle analisi visive e delle rese. Bergamo 2014.

		Media Replicazioni (1-2)		
CREMONA	Ibrido	Indice di malattia (%) <i>Fusarium spp.</i>	Attacco (%) piralide	Resa granella (q/ha)
	C1	19	88	193
	A1	25	78	164
	C2	8	50	197
	C3	10	60	173
	C4	11	78	189
	B1	33	98	181
	C5	13	73	172
	C6	16	93	192

Figura 3.2. Risultati delle analisi visive e delle rese. Cremona 2014.

		Media Replicazioni (1-2)		
PAVIA	Ibrido	Indice di malattia (%) <i>Fusarium spp.</i>	Attacco (%) piralide	Resa granella (q/ha)
	C1	42	63	173
	A1	36	51	138
	C2	48	50	162
	C3	28	33	157
	C4	13	28	164
	B1	80	35	159
	C5	25	53	146
	C6	26	25	158

Figura 3.3. Risultati delle analisi visive e delle rese. Pavia 2014.

		Media Replicazioni (1-2)		
ROVIGO	Ibrido	Indice di malattia (%) <i>Fusarium spp.</i>	Attacco (%) piralide	Resa granella (q/ha)
	C1	12	95	139
	A1	7	55	139
	C2	9	85	148
	C3	12	87	142
	C4	7	60	152
	B1	17	80	150
	C5	8	78	145
	C6	7	38	130

Figura 3.4. Risultati delle analisi visive e delle rese. Rovigo 2014.

		Media Replicazioni (1-2)		
VERONA	Ibrido	Indice di malattia (%) <i>Fusarium spp.</i>	Attacco (%) piralide	Resa granella (q/ha)
	C1	13	33	153
	A1	34	84	149
	C2	31	80	151
	C3	15	37	136
	C4	17	60	156
	B1	46	35	162
	C5	10	38	156
	C6	28	65	127

Figura 3.5. Risultati delle analisi visive e delle rese. Verona 2014.

Considerando l'effetto della scelta varietale nell'insieme della prova (**Figura 3.6**), l'ibrido B1 risulta significativamente più attaccato da *Fusarium spp.* rispetto a tutti gli altri ibridi saggiati, mentre gli ibridi C4 e C5, quelli che hanno dimostrato le migliori performance, sono risultati essere significativamente meno attaccati rispetto ad altri 5 ibridi. Le diverse località, invece, evidenziano significative differenze nell'indice di malattia della spiga, dove Pavia risulta essere la località con le spighe più attaccate, mentre a Rovigo sono state raccolte le spighe più sane.

L'effetto dell'ibrido non fa emergere differenze significative nella percentuale di attacco della piralide, mentre è il fattore località che evidenzia delle differenze; le parcelle maggiormente interessate dagli attacchi della piralide sono state quelle di Cremona, mentre a Pavia viene riportata la percentuale d'attacco più bassa.

Per quanto riguarda la resa in granella, l'ibrido meno produttivo è stato l'A1, mentre gli ibridi C4 e C1 si sono distinti per aver ottenuto la migliore resa media. La maggior produttività si è verificata a Bergamo seguita da Cremona, mentre a Rovigo è stata registrata la resa media più bassa.

Attacco <i>Fusarium</i> (%)		
Ibrido	% media	
B1	46,6	a
A1	27,6	ab
C2	26,4	b
C1	22,1	b
C6	20,3	b
C3	16,9	b
C4	14,3	b
C5	13,6	b
Località	% media	
PV	37	a
BG	29	ab
VR	24	bc
CR	17	cd
RO	10	d

Attacco piralide (%)		
Ibrido	% media	
A1	69,1	a
C1	68,8	a
B1	66,0	a
C2	64,4	a
C4	60,0	a
C3	58,2	a
C5	56,5	a
C6	55,3	a
Località	% media	
CR	77	a
RO	72	ab
BG	67	ab
VR	54	bc
PV	42	c

Resa granella (q/ha)		
Ibrido	resa media	
C4	171,0	a
C1	170,5	a
C2	168,3	a
B1	167,2	a
C5	161,7	a
C6	161,1	a
C3	158,9	a
A1	151,5	a
Località	resa media	
BG	187	a
CR	183	a
PV	157	b
VR	149	bc
RO	143	c

Figura 3.6. Media dei risultati delle analisi visive e delle rese ottenute per ibrido e per località e relativa analisi statistica. Per ciascun ibrido e per ciascuna località, gli indici di malattia (%) da *Fusarium spp.*, le percentuali di attacco (%) di piralide e le rese in granella (q/ha) contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono significativamente all'analisi della varianza (ANOVA), Test di Duncan per $p=0,05$.

Risultati delle indagini micologiche e chimiche

A seguire le tabelle con i risultati delle indagini micologiche (due replicazioni per tesi) per le località di Bergamo (**figura 3.7**), Cremona (**figura 3.8**), Pavia (**figura 3.9**), Rovigo (**figura 3.10**) e Verona (**figura 3.11**) ed i risultati delle indagini chimiche (**figura 3.12**).

Località	Rep.	Ibrido	<i>Fusarium</i> spp.	lim +/-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>
BERGAMO	1	C1	84800	18127	84400	400	< loq
	1	A1	880	283	880	< loq	< loq
	1	C2	22000	5823	18400	1200	2400
	1	C3	120800	25899	119600	< loq	1200
	1	C4	33800	3150	33800	< loq	< loq
	1	B1	2224000	77330	2224000	< loq	< loq
	1	C5	132800	21039	132000	< loq	800
	1	C6	11240	2982	7240	< loq	4000
	2	C1	126400	13068	109200	2800	14400
	2	A1	34800	8883	34800	< loq	< loq
	2	C2	158800	25358	158800	< loq	< loq
	2	C3	107600	4442	107600	< loq	< loq
	2	C4	34000	8778	34000	< loq	< loq
	2	B1	1076000	183636	1076000	< loq	< loq
	2	C5	56000	11646	42400	800	12800
	2	C6	6040	666	3400	160	2480

Figura 3.7. Risultati delle analisi micologiche. Bergamo 2014. Il limite fiduciale (lim+/-) della carica di *Fusarium spp.* è stato calcolato per $p=0,05$.

Località	Rep.	Ibrido	<i>Fusarium</i> spp.	lim +/-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>
CREMONA	1	C1	250400	33377	218400	28000	4000
	1	A1	41200	3766	30400	800	10000
	1	C2	372000	124889	324000	16000	32000
	1	C3	171200	17256	165600	2400	3200
	1	C4	146800	17166	130400	400	16000
	1	B1	3912000	707875	3912000	< loq	< loq
	1	C5	508000	57161	504000	4000	< loq
	1	C6	200000	43892	192400	1200	6400
	2	C1	228000	32799	212000	8000	8000
	2	A1	58400	13645	53200	400	4800
	2	C2	284000	36828	279200	800	4000
	2	C3	146800	17956	145600	< loq	1200
	2	C4	59600	17058	59600	< loq	< loq
	2	B1	696000	90209	692000	4000	< loq
	2	C5	150000	19152	150000	< loq	< loq
	2	C6	100000	17905	98000	1200	800

Figura 3.8. Risultati delle analisi micologiche. Cremona 2014. Il limite fiduciale (lim+/-) della carica di *Fusarium* spp. è stato calcolato per $p=0,05$.

Località	Rep.	Ibrido	<i>Fusarium</i> spp.	lim +/-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>
PAVIA	1	C1	29600	11699	25600	4000	< loq
	1	A1	14800	3331	14800	< loq	< loq
	1	C2	65200	11856	63600	1600	< loq
	1	C3	8880	1475	7680	< loq	1200
	1	C4	58500	23292	56500	1000	1000
	1	B1	1612000	193605	1584000	< loq	28000
	1	C5	59200	12489	53600	400	5200
	1	C6	22400	4080	21200	1200	< loq
	2	C1	552000	92237	552000	< loq	< loq
	2	A1	48400	13757	41200	< loq	7200
	2	C2	137200	22111	129200	4000	4000
	2	C3	297600	6662	289200	400	8000
	2	C4	80000	23026	79600	< loq	400
	2	B1	1104000	178529	1096000	< loq	8000
	2	C5	148800	14111	144000	< loq	4800
	2	C6	13440	1535	10640	2000	800

Figura 3.9. Risultati delle analisi micologiche. Pavia 2014. Il limite fiduciale (lim+/-) della carica di *Fusarium* spp. è stato calcolato per $p=0,05$.

Località	Rep.	Ibrido	<i>Fusarium</i> spp.	lim +/-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>
ROVIGO	1	C1	161200	20064	158400	2800	< loq
	1	A1	88800	13209	86400	2400	< loq
	1	C2	384400	20202	384400	< loq	< loq
	1	C3	94400	10737	92400	2000	< loq
	1	C4	112800	10327	112400	400	< loq
	1	B1	246000	42826	236000	< loq	10000
	1	C5	107600	13757	98800	< loq	8800
	1	C6	56000	6330	55600	400	< loq
	2	C1	123200	12973	123200	< loq	< loq
	2	A1	242800	13209	203600	3200	36000
	2	C2	68400	13417	68000	< loq	400
	2	C3	92800	19910	91600	1200	< loq
	2	C4	17120	3250	17080	40	< loq
	2	B1	228400	15042	224400	< loq	4000
	2	C5	28840	4334	28440	200	200
	2	C6	33560	4306	33160	< loq	400

Figura 3.10. Risultati delle analisi micologiche. Rovigo 2014. Il limite fiduciale (lim+/-) della carica di *Fusarium* spp. è stato calcolato per $p=0,05$.

Località	Rep.	Ibrido	<i>Fusarium</i> spp.	lim +/-	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>
VERONA	1	C1	161200	19440	159600	1600	< loq
	1	A1	424000	164137	423600	400	< loq
	1	C2	198400	28494	198400	< loq	< loq
	1	C3	58800	14111	57600	1200	< loq
	1	C4	76400	17416	76000	400	< loq
	1	B1	3120000	670851	3120000	< loq	< loq
	1	C5	209200	11187	208800	400	< loq
	1	C6	302400	21603	298400	4000	< loq
	2	C1	108800	11459	105600	2800	400
	2	A1	676000	98382	676000	< loq	< loq
	2	C2	540000	115129	536000	4000	< loq
	2	C3	47200	8529	46400	800	< loq
	2	C4	95200	10475	94800	400	< loq
	2	B1	956000	177664	952000	4000	< loq
	2	C5	270800	23725	269200	1600	< loq
	2	C6	26800	2831	26400	400	< loq

Figura 3.11. Risultati delle analisi micologiche. Verona 2014. Il limite fiduciale (lim+/-) della carica di *Fusarium* spp. è stato calcolato per $p=0,05$.

Località	Ibrido	Deossivalenolo						Fumonisine					
		replica 1			replica 2			replica 1			replica 2		
		µg/kg	CL inf	CL sup	µg/kg	CL inf	CL sup	µg/kg	CL inf	CL sup	µg/kg	CL inf	CL sup
BERGAMO	C1	9480	8209	9496	12510	10478	12825	3678	3614	3927	3987	3934	4252
	A1	20900	15803	22999	21900	16343	24306	< loq			< loq		
	C2	30900	20310	36965	15900	12799	16766	1939	1797	2111	6926	6942	7382
	C3	1220	1092	1355	1750	1589	1836	1837	1690	2005	2513	2400	2708
	C4	970	855	1130	1590	1440	1691	1183	1000	1330	< loq		
	B1	57200	22616	83243	32700	20908	39691	9876	9892	10594	10218	10229	10970
	C5	1020	903	1175	960	846	1121	5645	5639	6009	2478	2363	2672
	C6	17600	13876	18829	16400	13122	17367	< loq			553	332	682
CREMONA	C1	1700	1543	1791	4850	4388	4765	6584	6596	7014	7444	7465	7941
	A1	5160	4657	5068	9810	8465	9850	491	266	618	593	374	723
	C2	1980	1804	2047	260	176	497	5006	4984	5329	6896	6911	7349
	C3	380	292	604	260	176	497	3350	3273	3583	2462	2346	2655
	C4	250	166	489	< loq			4380	4340	4666	4048	3997	4316
	B1	6760	6016	6665	7340	6496	7256	49916	43042	61066	16437	16202	17985
	C5	790	684	969	< loq			16130	15915	17632	7028	7045	7492
	C6	< loq			1050	931	1202	4771	4743	5080	2406	2288	2597
PAVIA	C1	20500	15581	22482	21900	16343	24306	2922	2827	3135	10662	10666	11461
	A1	50400	23346	69951	30800	20274	36816	558	337	687	4392	4352	4679
	C2	54000	23075	76873	56200	22781	81230	3945	3891	4208	3341	3264	3573
	C3	17800	13999	19076	9000	7833	8986	< loq			6726	6739	7167
	C4	1240	1111	1373	1770	1608	1855	1853	1707	2022	1623	1464	1784
	B1	81600	12385	138548	87800	7888	154498	50055	43135	61264	10755	10757	11564
	C5	18800	14602	20320	11600	9816	11806	4678	4647	4981	5919	5919	6302
	C6	26200	18440	30152	8200	7196	8145	< loq			1232	1052	1380
ROVIGO	C1	740	636	924	< loq			1590	1430	1750	1407	1236	1560
	A1	280	195	515	630	531	826	1267	1089	1416	1200	1018	1347
	C2	440	349	657	380	292	604	3583	3515	3827	1716	1562	1880
	C3	300	215	533	< loq			1881	1736	2051	1834	1687	2003
	C4	< loq			< loq			1058	867	1201	< loq		
	B1	8910	7762	8891	810	703	987	4057	4006	4325	1653	1496	1815
	C5	< loq			< loq			1483	1317	1640	1016	823	1158
	C6	830	722	1004	810	703	987	1218	1037	1366	< loq		
VERONA	C1	3390	3094	3362	1290	1158	1418	4059	4009	4328	4506	4470	4799
	A1	11700	9890	11917	31100	20379	37265	9353	9374	10019	23807	22880	26699
	C2	23500	17167	26438	6160	5513	6060	7130	7149	7602	11380	11369	12258
	C3	2200	2008	2250	1660	1505	1754	2927	2832	3140	2267	2141	2452
	C4	380	292	604	250	166	489	1669	1513	1832	2102	1968	2280
	B1	7200	6381	7113	10900	9296	11033	76954	58173	102405	29270	27551	33440
	C5	2050	1869	2111	890	779	1058	7616	7639	8127	5540	5532	5897
	C6	13000	10828	13380	9900	8535	9947	1618	1459	1779	3199	3116	3424

Figura 3.12. Contenuti di fumonisine totali e deossivalenolo nei campioni di granello di mais. Limite di quantificazione per fumonisine =200 µg/kg; limite di quantificazione per deossivalenolo =250 µg/kg. I limiti di confidenza (C.L.) sono stati calcolati per p=0,05.

Vengono ora, quindi, analizzati i risultati ottenuti dalle indagini micologiche e chimiche per ognuna delle località oggetto di saggio. Non è stato possibile effettuare alcuna analisi statistica riguardante le indagini micologiche e chimiche in quanto le replicazioni per ogni tesi sono solo due.

Dalla **figura 3.13** emerge che nella località di Bergamo gli ibridi A1, C4 e C6 hanno evidenziato la più bassa carica di *Fusarium* nella granella e i contenuti in fumonisine (**figura 3.14**) più bassi in assoluto, mentre, in linea con i risultati che mostrano una forte infezione da parte di *Fusarium* della spiga (**figura 3.1**), la granella dell'ibrido B1 ha dimostrato essere la più contaminata in fumonisine e quella con la maggior carica di *Fusaria*. La regressione lineare tra la carica di *Fusaria* ed il contenuto di fumonisine evidenzia un R^2 pari a 0,7647.

Per quanto riguarda l'accumulo di deossinivalenolo (**figura 3.15**) gli ibridi che hanno riportato i migliori risultati, con valori molto bassi rispetto alla media, sono C3, C4 e C5, mentre l'ibrido più contaminato rimane il B1.

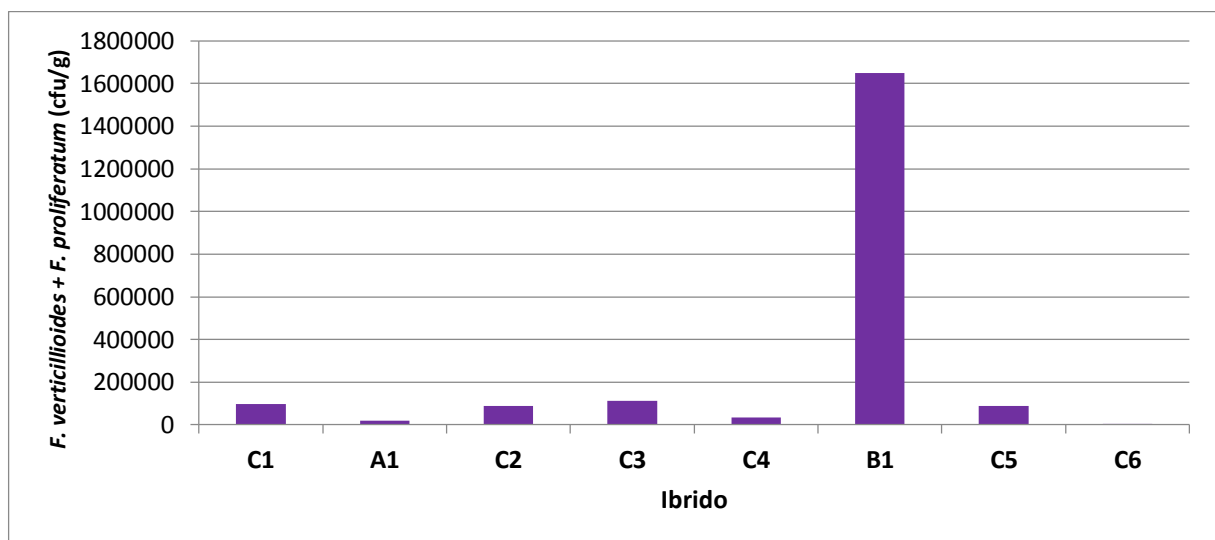


Figura 3.13. Carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (cfu/g) della granella di mais (media delle due replicazioni). Bergamo 2014.

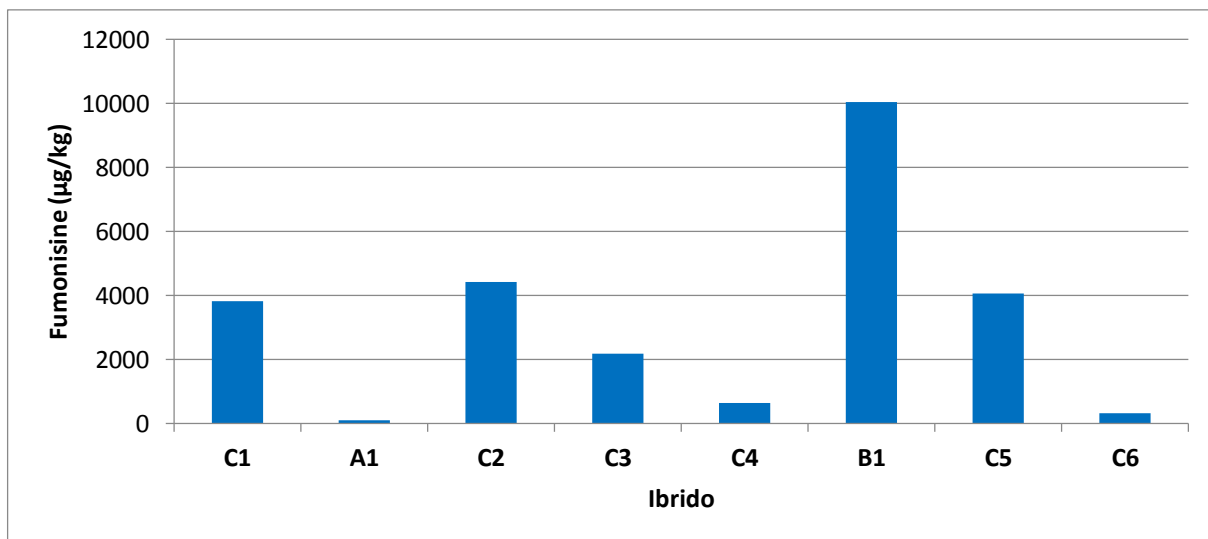


Figura 3.14. Contenuto di fumonisine (µg/kg) della granella di mais (media delle due replicazioni). Bergamo 2014.

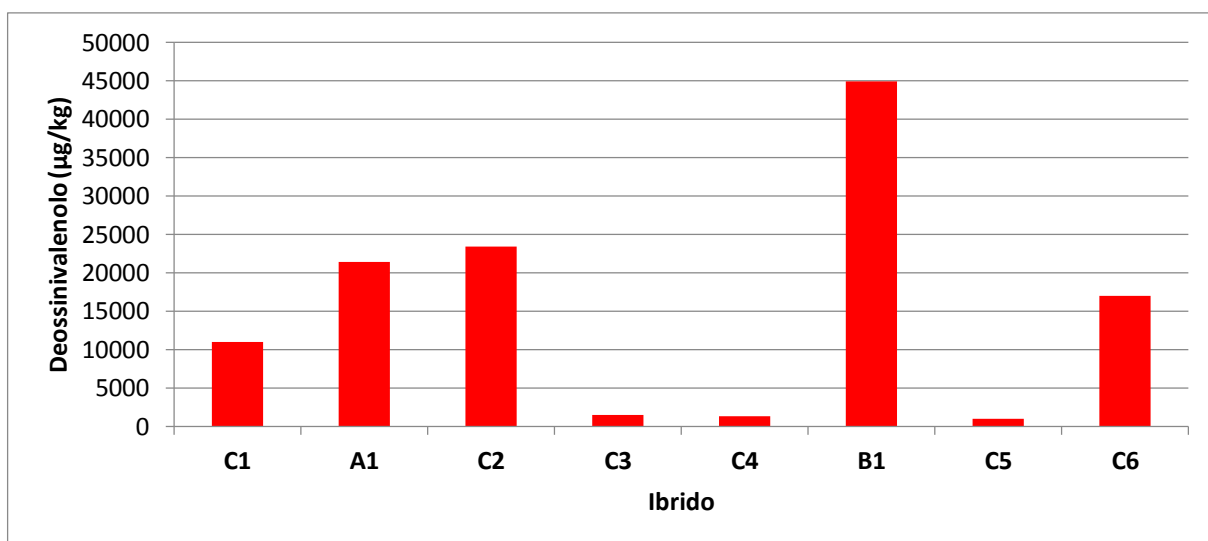


Figura 3.15. Contenuto di deossinivalenolo (µg/kg) della granella di mais (media delle due replicazioni). Bergamo 2014.

Nella prova sperimentale di Cremona, l'ibrido A1 è risultato avere una granella con la carica di *Fusarium* inferiore rispetto agli altri ibridi (**figura 3.16**) e col minor contenuto in fumonisine (**figura 3.17**), ma è risultato particolarmente sensibile all'accumulo di deossinivalenolo, mentre gli ibridi C3, C4 e C5 risultano i meno contaminati dal deossinivalenolo (**figura 3.18**).

In termini di accumulo di fungo nella granella, anche gli ibridi C4 e C6 hanno ottenuto un ottimo risultato, mentre l'ibrido B1, oltre ad aver mostrato una elevata pressione di malattia sulla spiga (**figura 3.2**), riporta la più elevata carica da *Fusarium* e la più elevata contaminazione da fumonisine, oltre che un elevato contenuto in deossinivalenolo; i risultati sopra citati ricalcano quelli ottenuti nella sperimentazione di Bergamo.

La regressione lineare tra la carica di *Fusaria* ed il contenuto di fumonisine evidenzia un elevato R^2 (0,955).

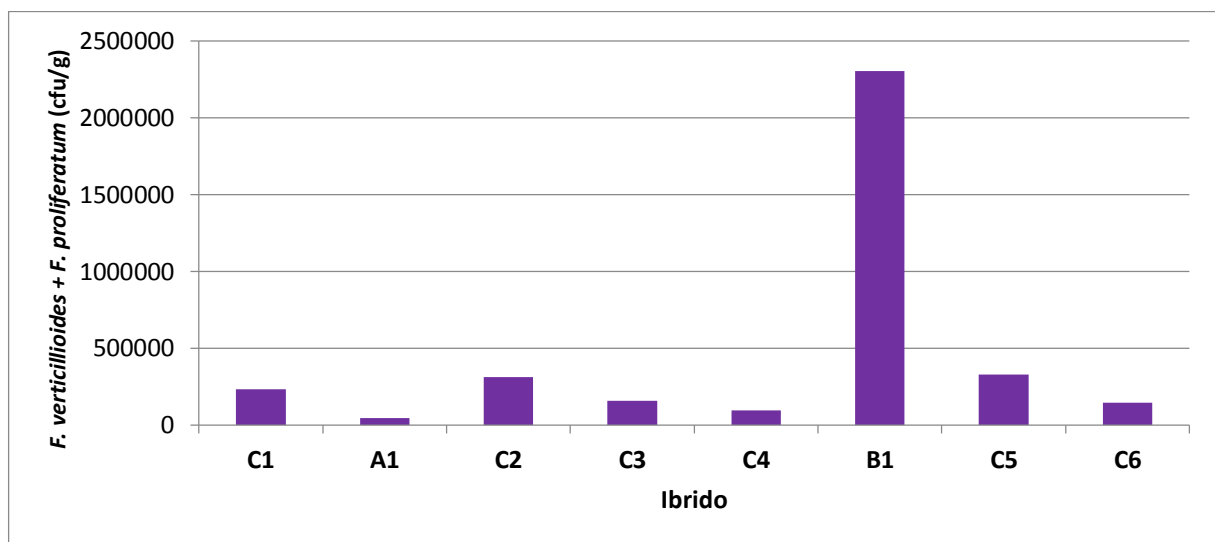


Figura 3.16. Carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (cfu/g) della granella di mais (media delle due replicazioni). Cremona 2014.

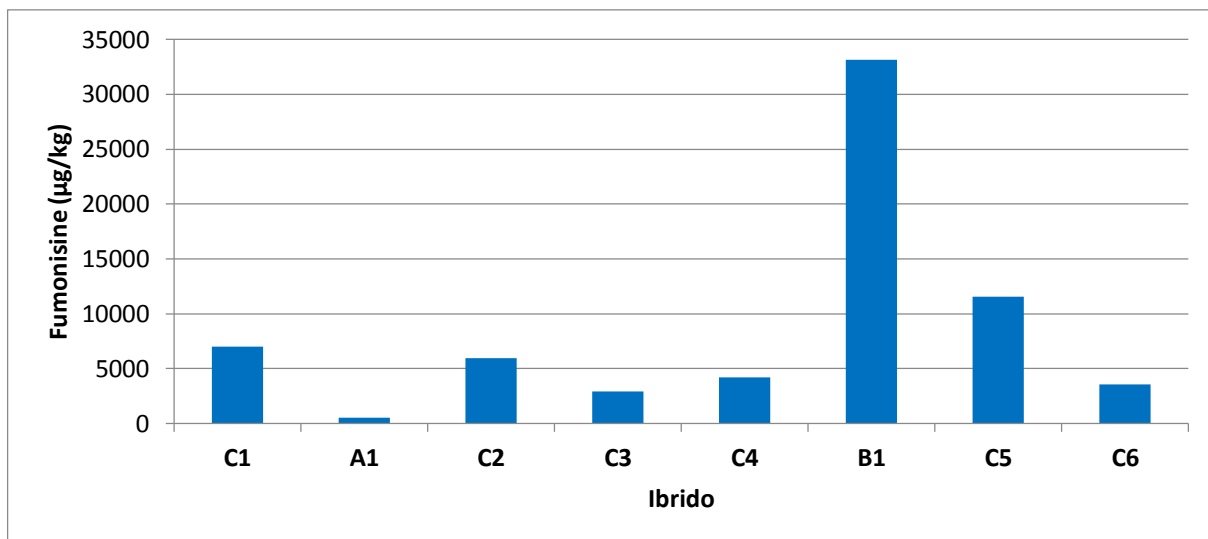


Figura 3.17. Contenuto di fumonisine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) della granella di mais (media delle due replicazioni). Cremona 2014.

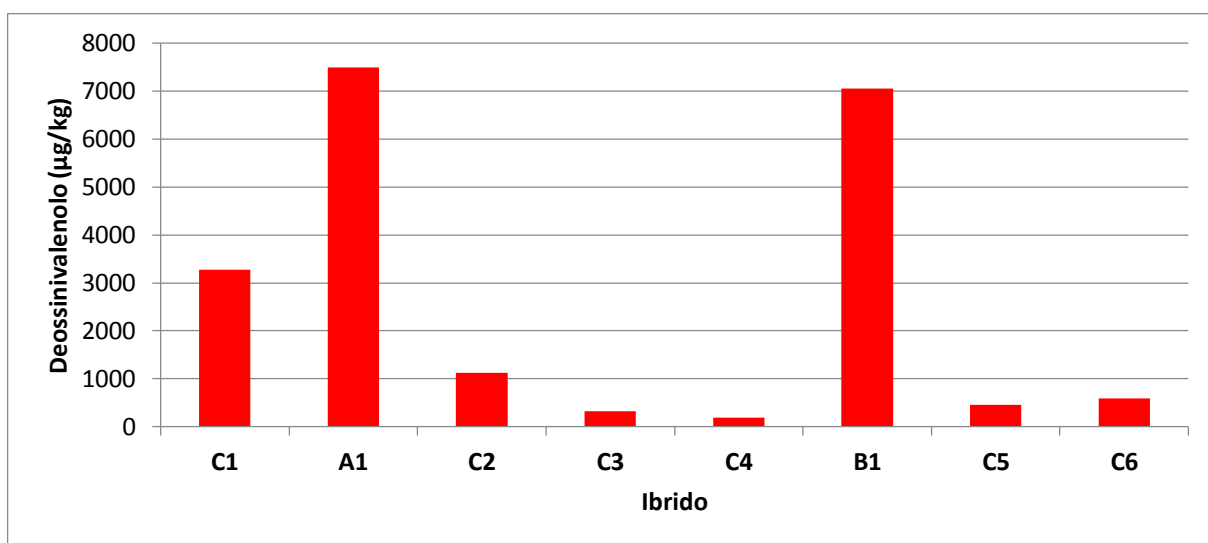


Figura 3.18. Contenuto di deossivalenolo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) della granella di mais (media delle due replicazioni). Cremona 2014.

Nella località di Pavia vengono evidenziate nuovamente l'elevata sensibilità dell'ibrido B1 alla contaminazione dei funghi produttori di tossine, le buone performances degli ibridi A1, C4 e C6 in termini di contaminazione da *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (figura 3.19) e relativa tossina prodotta (figura 3.20), e la poca suscettibilità degli ibridi C3, C4 (quello nettamente meno contaminato) e C5 all'accumulo di deossinivalenolo (figura 3.21).

Molto elevata la correlazione tra *Fusarium* produttori di fumonisine e tossina rilevata nella granella ($R^2=0,9886$).

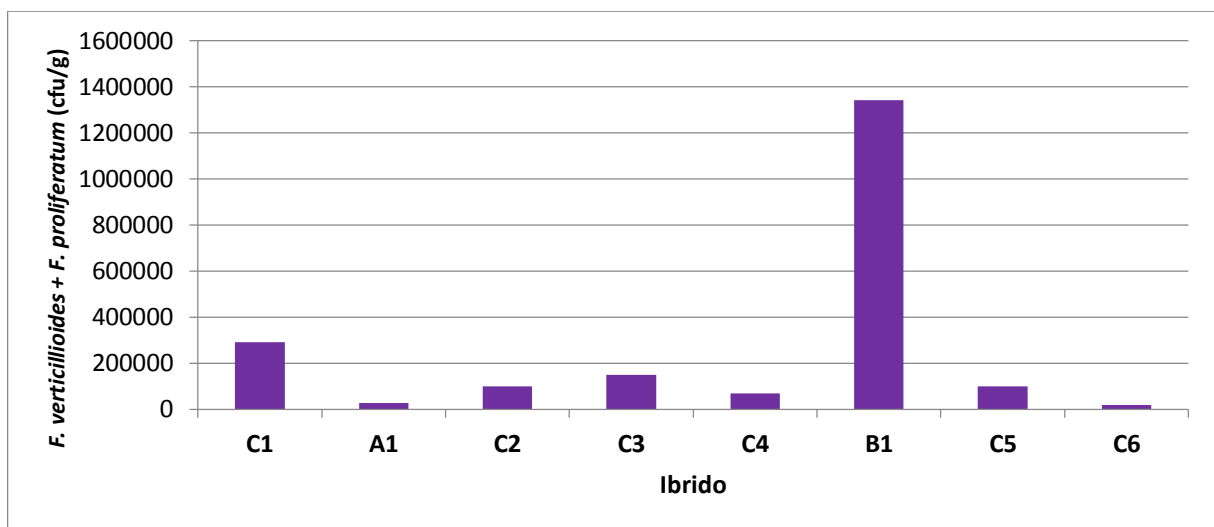


Figura 3.19. Carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (cfu/g) della granella di mais (media delle due replicazioni). Pavia 2014.

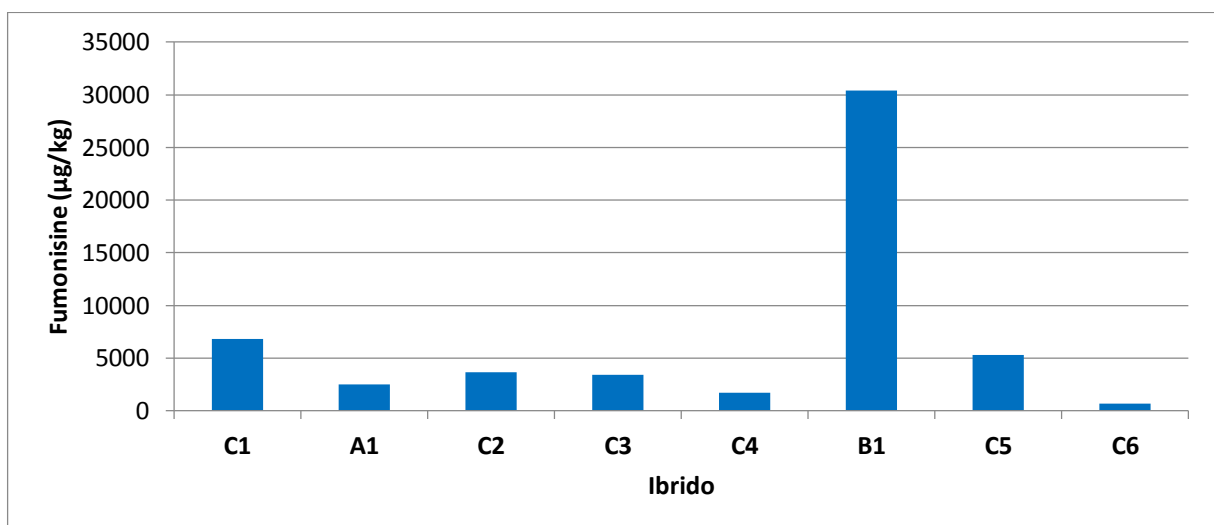


Figura 3.20. Contenuto di fumonisine (µg/kg) della granella di mais (media delle due replicazioni). Pavia 2014.

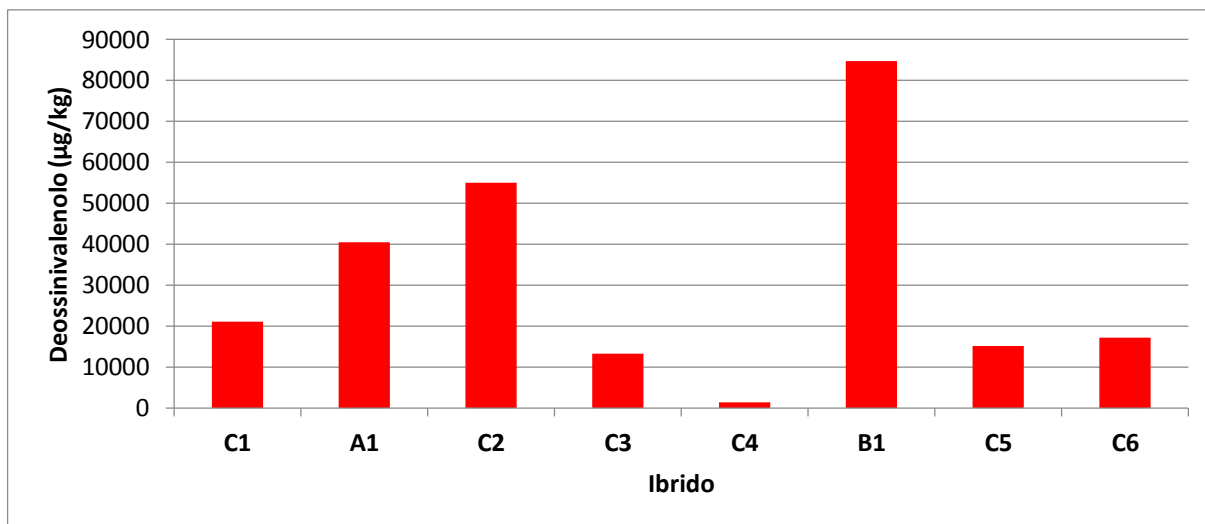


Figura 3.21. Contenuto di deossinivalenolo (µg/kg) della granella di mais (media delle due replicazioni). Pavia 2014.

Nella sperimentazione condotta a Rovigo, invece, la contaminazione da fumonisine (figura 3.23) e dei *Fusarium* produttori delle stesse (figura 3.22) evidenziano differenze tra gli ibridi meno marcate rispetto a quanto enunciato per le precedenti prove (la regressione lineare tra i due fattori ha evidenziato un $R^2=0,7882$).

Comunque, l'ibrido B1 conferma essere il più contaminato, in maniera particolarmente marcata guardando al deossinivalenolo, gli ibridi C4 e C6 risultano essere i meno contaminati da fumonisine e dai funghi produttori delle stesse e, infine, gli ibridi C3, C4 e C5 confermano essere nuovamente i meno suscettibili all'accumulo di deossinivalenolo nella granella (figura 3.24).

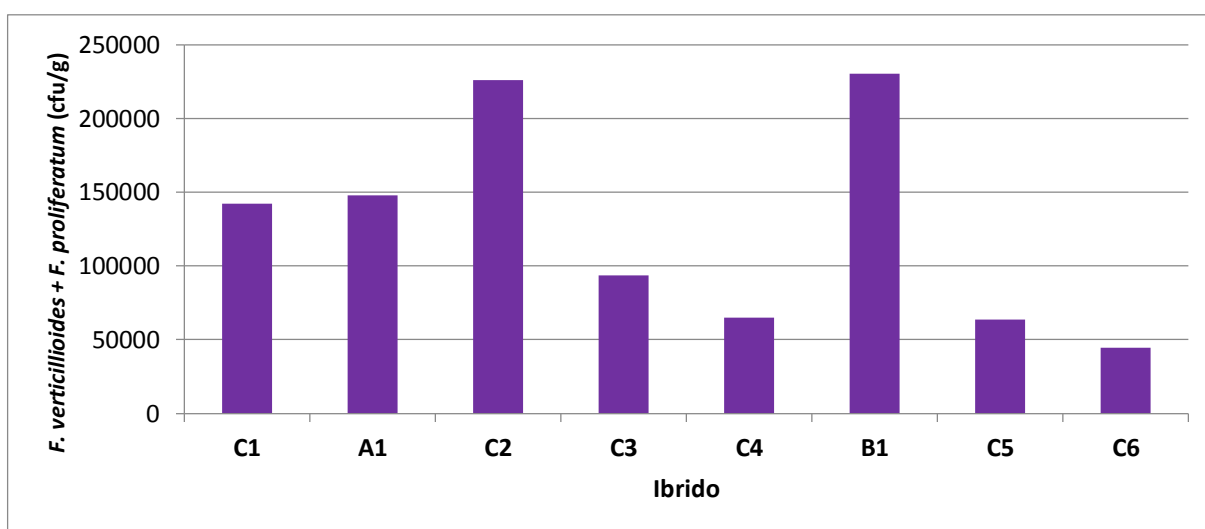


Figura 3.22. Carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (cfu/g) della granella di mais (media delle due replicazioni). Rovigo 2014.

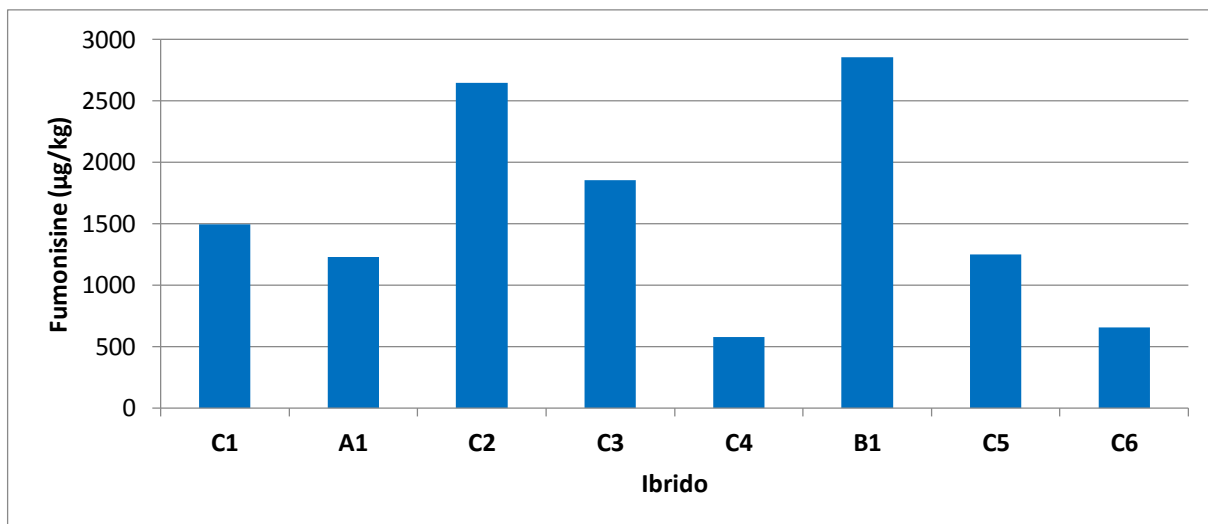


Figura 3.23. Contenuto di fumonisine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) della granella di mais (media delle due replicazioni). Rovigo 2014.

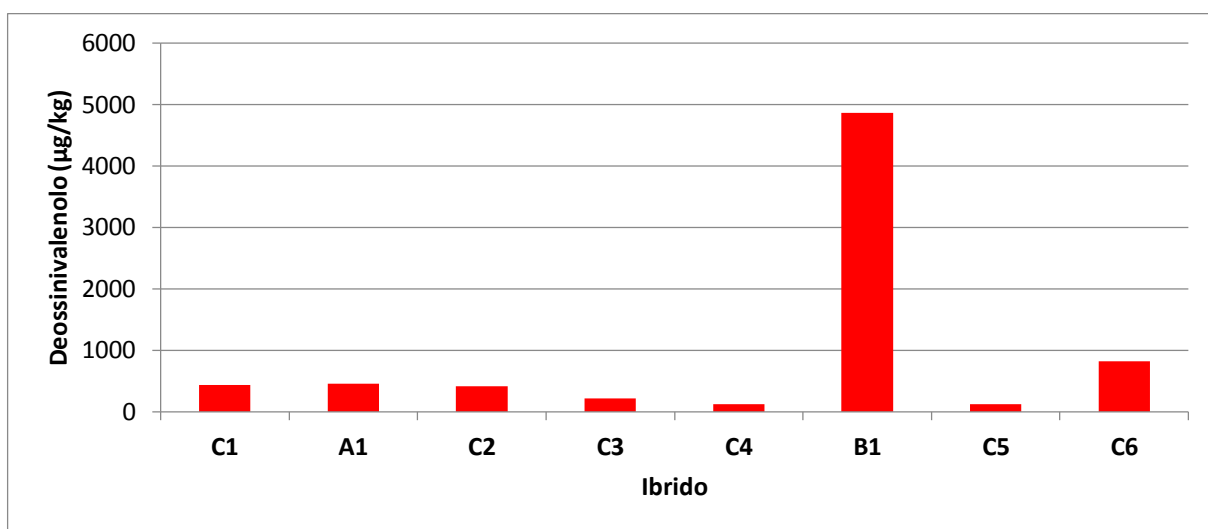


Figura 3.24. Contenuto di deossinivalenolo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) della granella di mais (media delle due replicazioni). Rovigo 2014.

Nella sperimentazione di Verona, gli ibridi che hanno evidenziato la minore contaminazione da fumonisine (**figura 3.26**) e relativi funghi produttori (**figura 3.25**) sono stati il C1, il C3, il C4 ed il C6. Per quanto riguarda l'accumulo di deossinivalenolo (**figura 3.27**) ottimi risultati sono stati ottenuti sempre dagli ibridi C3, C4 e C5, mentre gli ibridi A1, C2 e C6 hanno evidenziato livelli di DON maggiori rispetto all'ibrido B1.

Nuovamente, invece, l'ibrido B1 si distingue per aver manifestato il più alto tenore di fumonisine e risulta essere quello con la carica di *Fusarium* produttori delle stesse più elevata. La correlazione tra la carica di *Fusaria* ed il contenuto di fumonisine assume un valore pari a $R^2=0,995$.

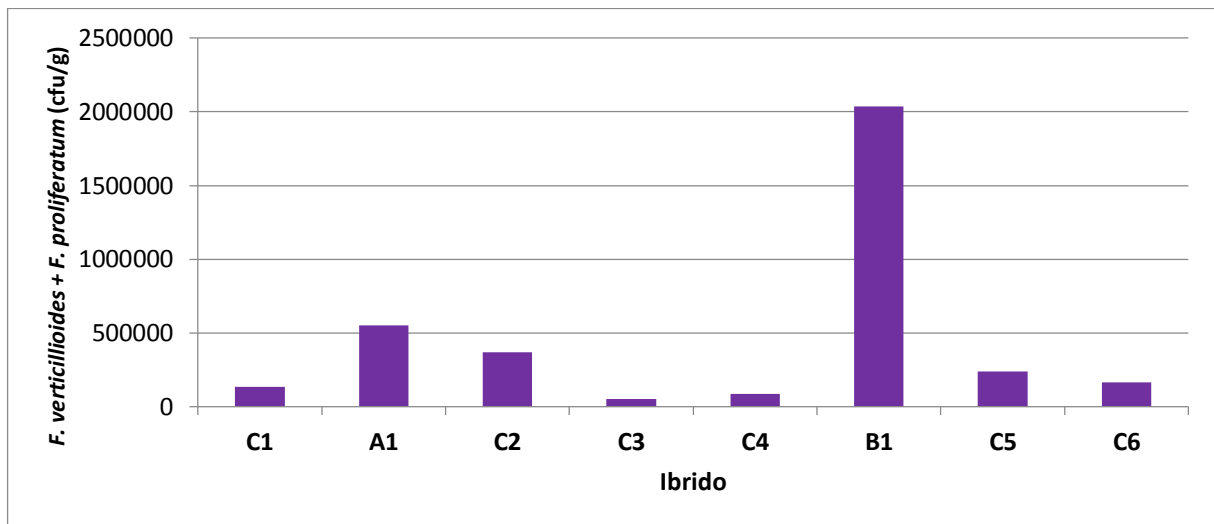


Figura 3.25. Carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (cfu/g) della granella di mais (media delle due replicazioni). Verona 2014.

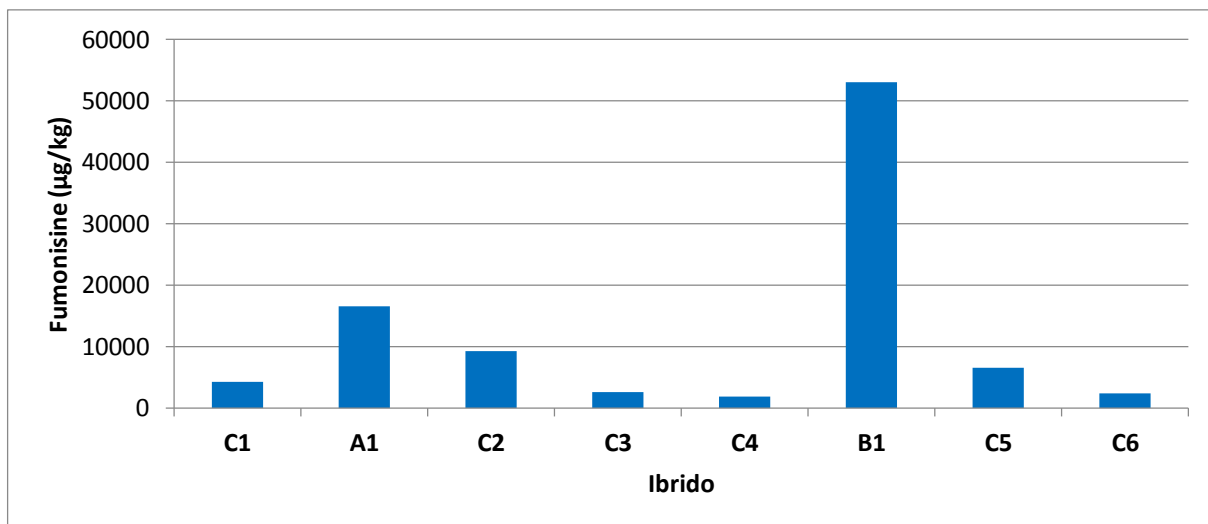


Figura 3.26. Contenuto di fumonisine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) della granella di mais (media delle due replicazioni). Verona 2014.

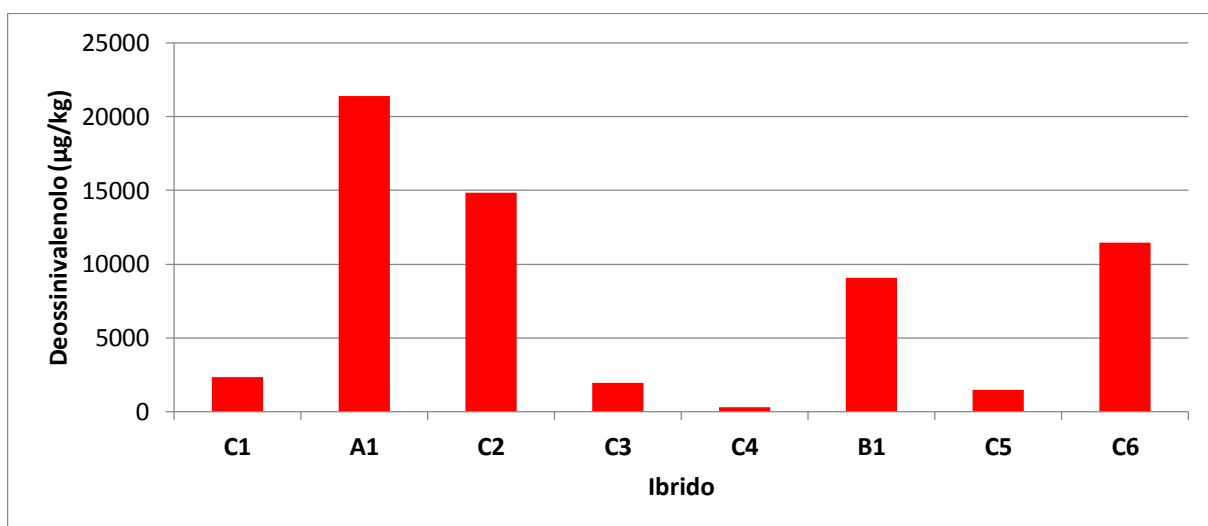


Figura 3.27. Contenuto di deossivalenolo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) della granella di mais (media delle due replicazioni). Verona 2014.

Dopo aver elencato in maniera analitica i risultati ottenuti nella prova per ogni singola località oggetto di sperimentazione, procediamo ora nel vedere i risultati ottenuti nel loro insieme al fine di valutare gli ibridi meno sensibili all'attacco dei funghi produttori di micotossine e come la scelta della località influenzi la contaminazione del mais in generale.

La granella dell'ibrido B1 è risultata essere significativamente più contaminata da fumonisine (**figura 3.29**) e dai relativi funghi produttori (**figura 3.28**), evidenziando cariche di molto superiori rispetto a tutti gli altri ibridi, mentre il miglior risultato è stato ottenuto dagli ibridi C4 e C6, gli unici ad aver ottenuto una carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* media inferiore alle 100.000 cfu/g. Questo risultato era atteso in quanto in tutte le 5 località dove è stata condotta la prova la granella dell'ibrido B1 è risultata essere la più contaminata, mentre gli ibridi C4 e C6 hanno sempre evidenziato le performances migliori.

Considerando il contenuto di deossinivalenolo della granella (**figura 3.30**), anche in questo caso l'ibrido B1 risulta essere il più suscettibile, anche se in maniera non significativamente differente dall'ibrido A1, mentre gli ibridi C3, C4 e C5 hanno evidenziato un contenuto medio significativamente inferiore rispetto a tutti gli altri (l'ibrido C4 significativamente meno contaminato di tutti gli altri ibridi).

Concludendo, quindi, se consideriamo la suscettibilità dei diversi genotipi ai funghi produttori sia di fumonisine, sia di deossinivalenolo, l'ibrido meno performante risulta essere indubbiamente il B1, mentre il più resistente sicuramente il C4, seguito dal C3.

In ultima analisi, vengono riportati i grafici inerenti le contaminazioni medie (medie di tutti gli ibridi saggiati) delle diverse località oggetto di studio. La località con la più elevata pressione di contaminazione da *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (**figura 3.31**) è risultata Verona, nonché quella con una contaminazione media di fumonisine della granella più elevata (**figura 3.32**), mentre a Pavia sono stati riscontrati i contenuti di deossinivalenolo più elevati (**figura 3.33**). Rovigo, invece, è risultata essere la località con la più bassa pressione di malattia per quanto riguarda i funghi produttori di tossine.

L'analisi statistica non ha evidenziato interazione tra i fattori ibrido e località per quanto riguarda la carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* ed il contenuto di fumonisine nella granella, mentre per quanto riguarda il deossinivalenolo l'interazione è risultata significativa ($p=0,0066^{**}$).

La relazione tra funghi produttori di fumonisine e relative tossine risulta essere nel complesso molto buona ($R^2=0,9884$) confermando quanto già sottolineato per ogni singola località. Osservando, però, i risultati ottenuti divisi per località, la stretta correlazione tra le due variabili considerate viene a

mancare, facendo supporre un'influenza ambientale che determina una diversa produttività di tossina da parte del fungo a seconda dell'areale di produzione del mais. Per tale motivo si è provveduto a determinare la capacità produttiva dei funghi, per ogni singola provincia, calcolata come rapporto tra la carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* e fumonisine; dai dati ottenuti (**figura 3.34**) emerge un'effettiva differenza produttiva. Sono emerse delle differenze produttive, dove a Cremona il pool di funghi produttori di fumonisine è risultato essere significativamente più produttivo di Rovigo.

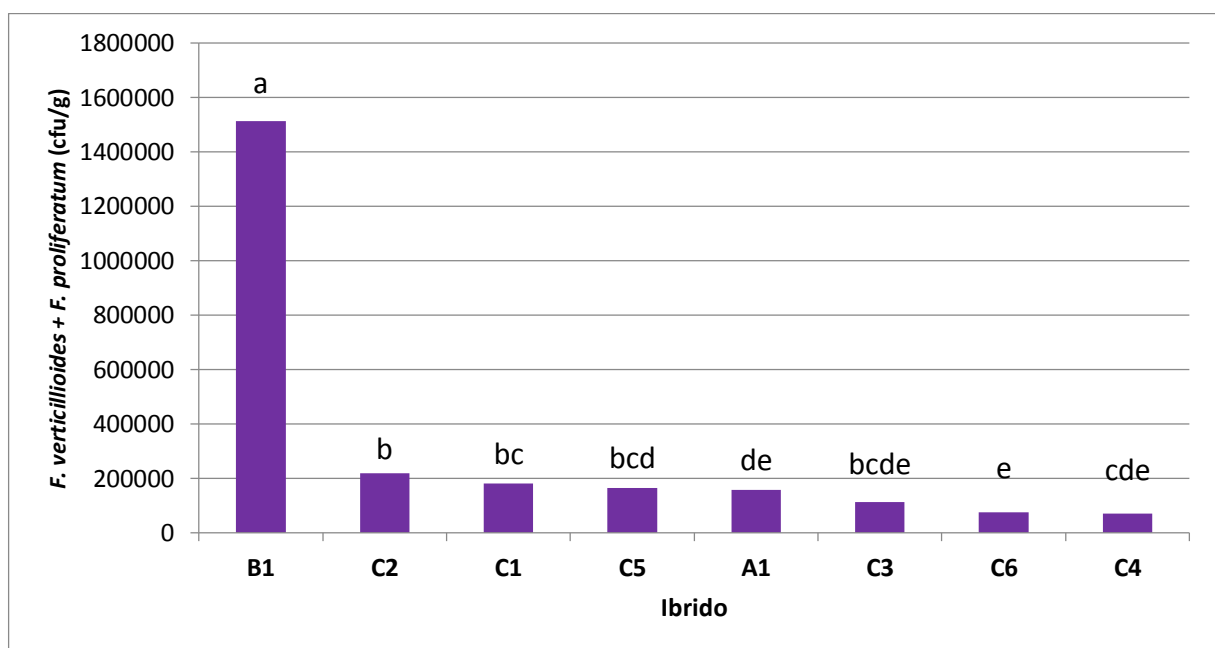


Figura 3.28. Carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (cfu/g) della granella di mais (media delle 5 località). Gli ibridi contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono significativamente all'analisi della varianza (ANOVA), Test di Duncan per $p=0,05$.

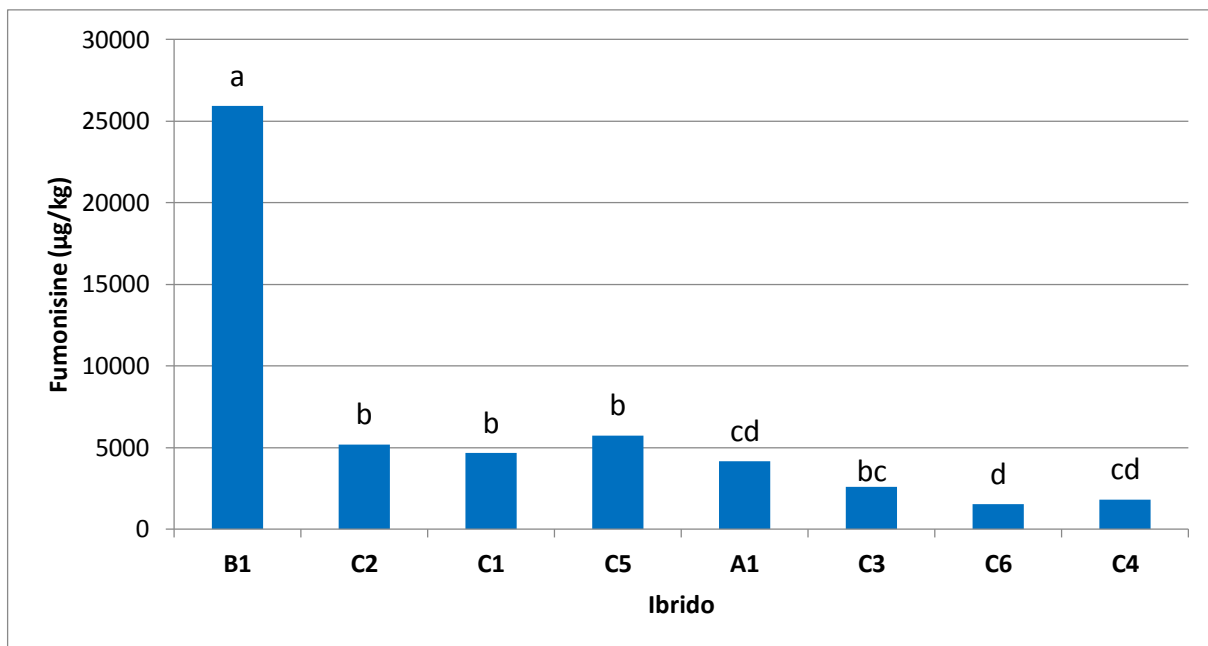


Figura 3.29. Contenuto di fumonisine (µg/kg) della granella di mais (media delle 5 località). Gli ibridi contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono significativamente all'analisi della varianza (ANOVA), Test di Duncan per $p=0,05$.

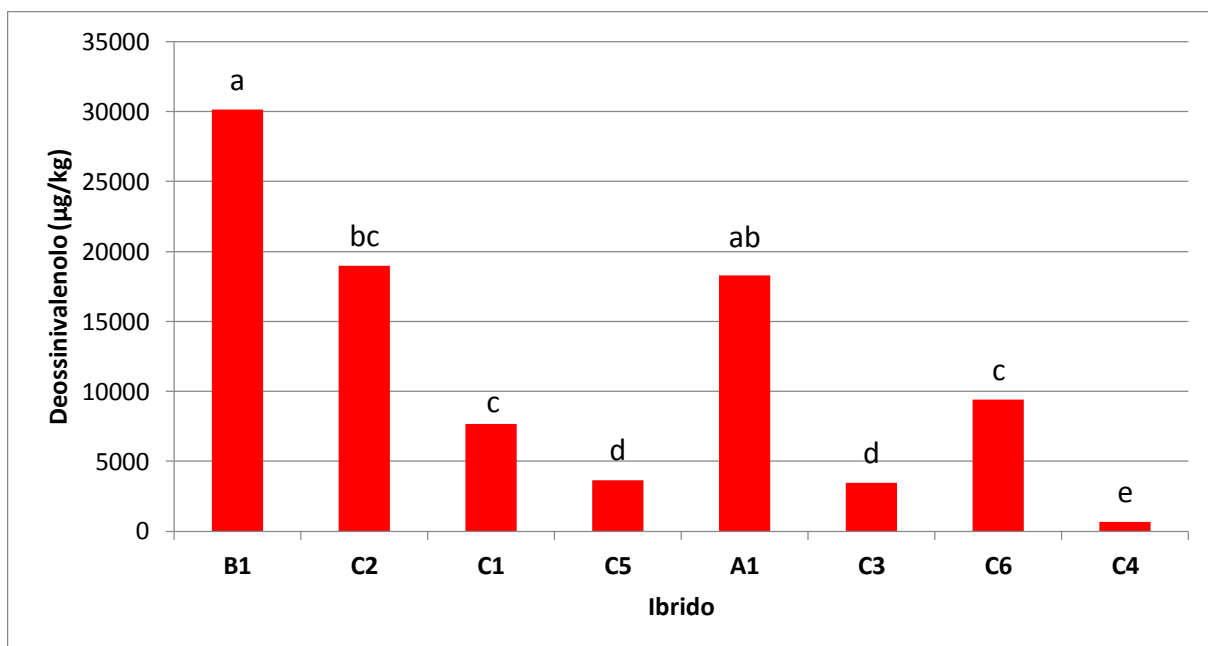


Figura 3.30. Contenuto di deossinivalenolo (µg/kg) della granella di mais (media delle 5 località). Gli ibridi contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono significativamente all'analisi della varianza (ANOVA), Test di Duncan per $p=0,05$.

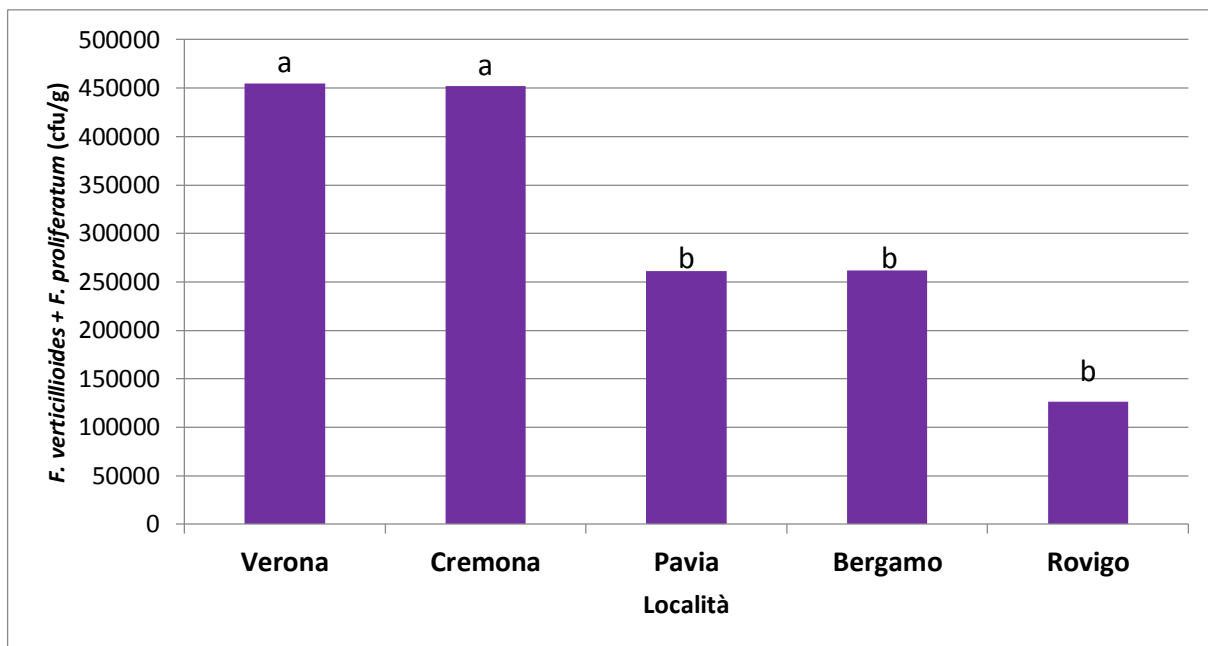


Figura 3.31. Carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (cfu/g) della granella di mais (media degli ibridi). Le località contrassegnate dalla stessa lettera non differiscono significativamente all'analisi della varianza (ANOVA), Test di Duncan per $p=0,05$.

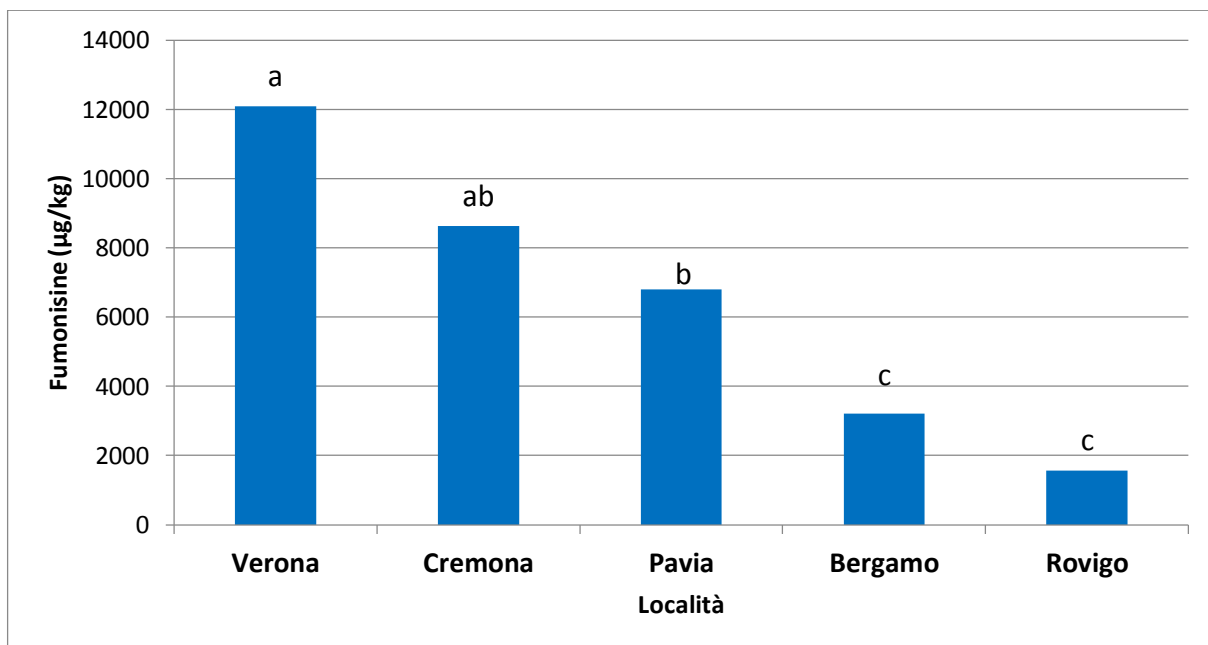


Figura 3.32. Contenuto di fumonisine (µg/kg) della granella di mais (media degli ibridi). Le località contrassegnate dalla stessa lettera non differiscono significativamente all'analisi della varianza (ANOVA), Test di Duncan per $p=0,05$.

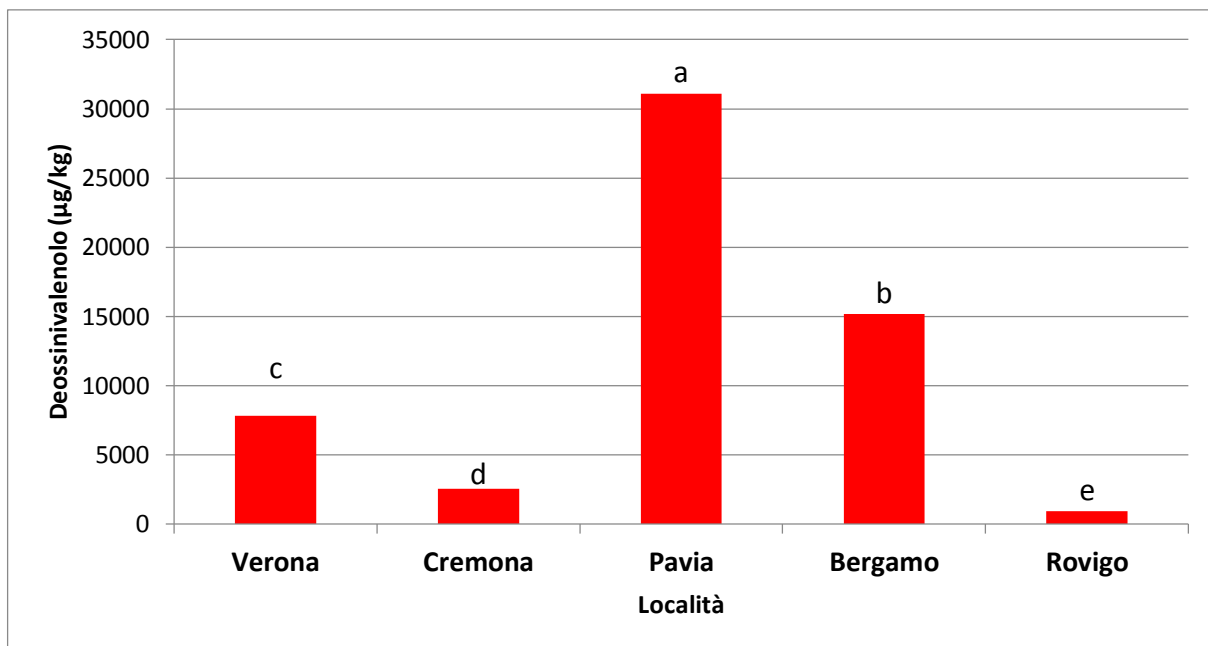


Figura 3.33. Contenuto di deossinivalenolo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) della granella di mais (media degli ibridi). Le località contrassegnate dalla stessa lettera non differiscono significativamente all'analisi della varianza (ANOVA), Test di Duncan per $p=0,05$.

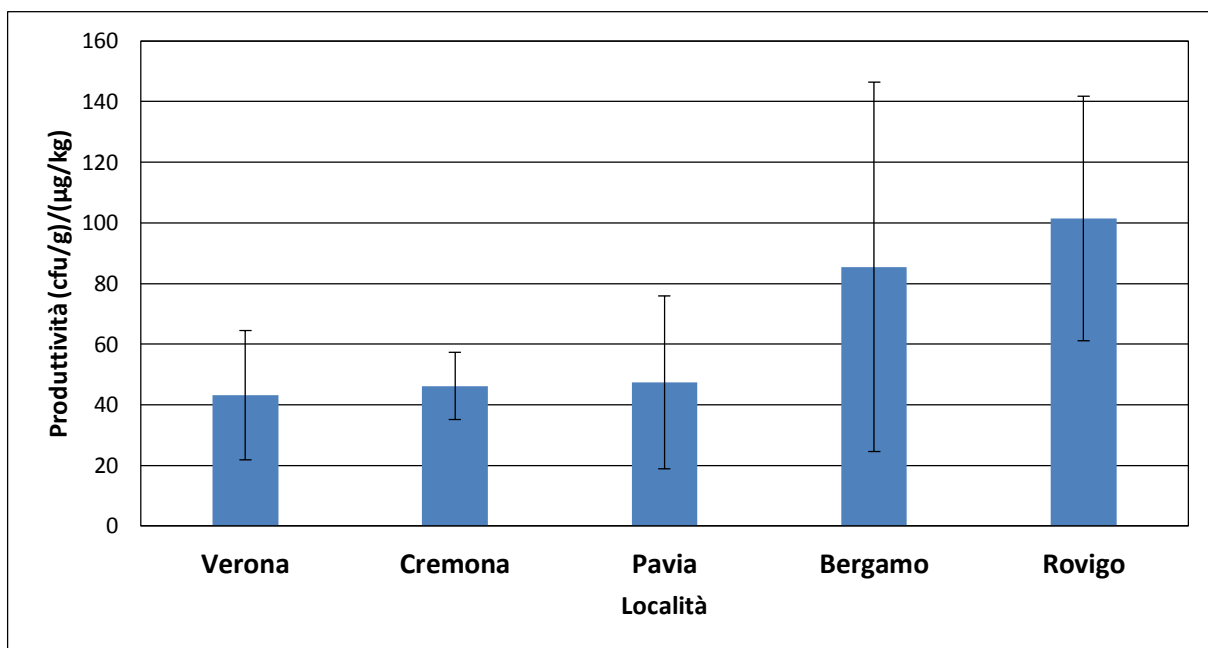


Figura 3.34. Produttività della popolazione di *Fusarium* produttori di fumonisine indicata come rapporto tra carica fungina (cfu/g) e tossina relativa ($\mu\text{g}/\text{kg}$). I limiti fiduciali sono stati calcolati per $p=0,05$.

3.2. Risultati della Prova di Campo 2

Risultati delle indagini micologiche e chimiche

Nella prova sperimentale condotta a Borsea si è scelto anche di valutare l'effetto del trattamento contro la piralide oltre a quello derivante dalla scelta varietale; per ogni ibrido, quindi, si è provveduto ad allestire un'ulteriore parcella dove è stato effettuato il trattamento insetticida.

I risultati delle indagini micologiche complete sono sotto riportate in **figura 3.35**.

Dall'indagine sulla carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* della granella (**figura 3.36**) si evidenzia l'effetto della scelta varietale, dove l'ibrido C2 (classe FAO 600 a 130 gg) presenta una contaminazione nettamente e significativamente superiore rispetto agli ibridi P1 e P2 (classe FAO 200 a 85 gg); questo risultato è confermato dall'analisi delle fumonisine totali (**figura 3.37**).

L'effetto migliorativo del trattamento insetticida sulla qualità della granella emerge marcatamente, però, solo quando effettuato sull'ibrido più tardivo, mentre per i due ibridi precoci l'insetticida ha portato ad un sensibile incremento della carica di funghi tossigeni; l'effetto del trattamento sui precoci, comunque, non ha dato effetti differenziabili da un punto di vista statistico.

Gli ibridi P1 e P2 riportano tenori di deossinivalenolo (**figura 3.38**) di molto inferiori rispetto all'ibrido C2, senza manifeste differenze riguardante l'effetto del trattamento insetticida.

Al contrario, l'ibrido C2 riporta una significativamente più elevata presenza di vomitossina nella tesi trattata chimicamente contro la piralide; questa è la manifestazione di una maggior incidenza di *F. graminearum* occorsa nella parcella dove il trattamento insetticida ha indirettamente contenuto lo sviluppo dei miceti produttori di fumonisine.

Ibrido	Trattamento piralide	<i>Fusarium spp.</i>		<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>
		cfu/g	lim (+/-)			
C2	NO	1880000	99317	1800000	48000	32000
	SI	1016000	224427	992000	16000	8000
P1	NO	92000	10086	91600	400	< loq
	SI	140000	9932	139200	< loq	800
P2	NO	161600	30022	156400	2400	2800
	SI	300000	80456	268000	24000	8000

Figura 3.35. Risultati delle analisi micologiche. Borsea 2014. Il limite fiduciale (lim+/-) della carica di *Fusarium spp.* è stato calcolato per $p=0,05$.

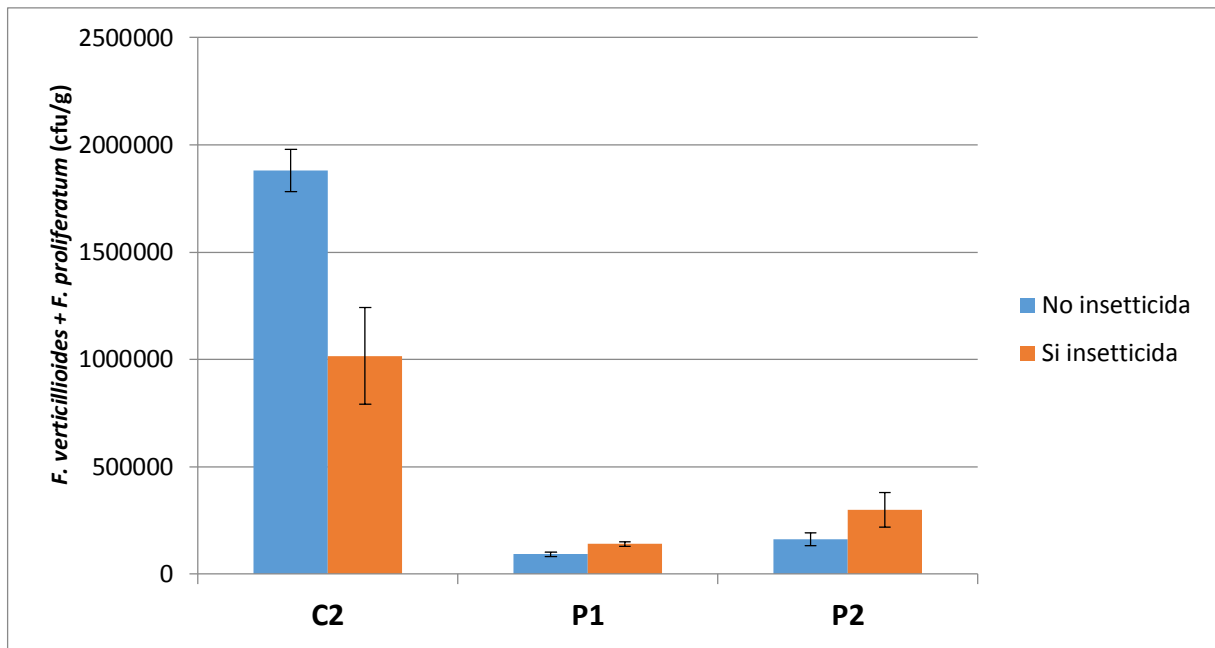


Figura 3.36. Carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (cfu/g) della granella di mais. Borsea 2014. I limiti fiduciali sono stati calcolati per $p=0,05$.

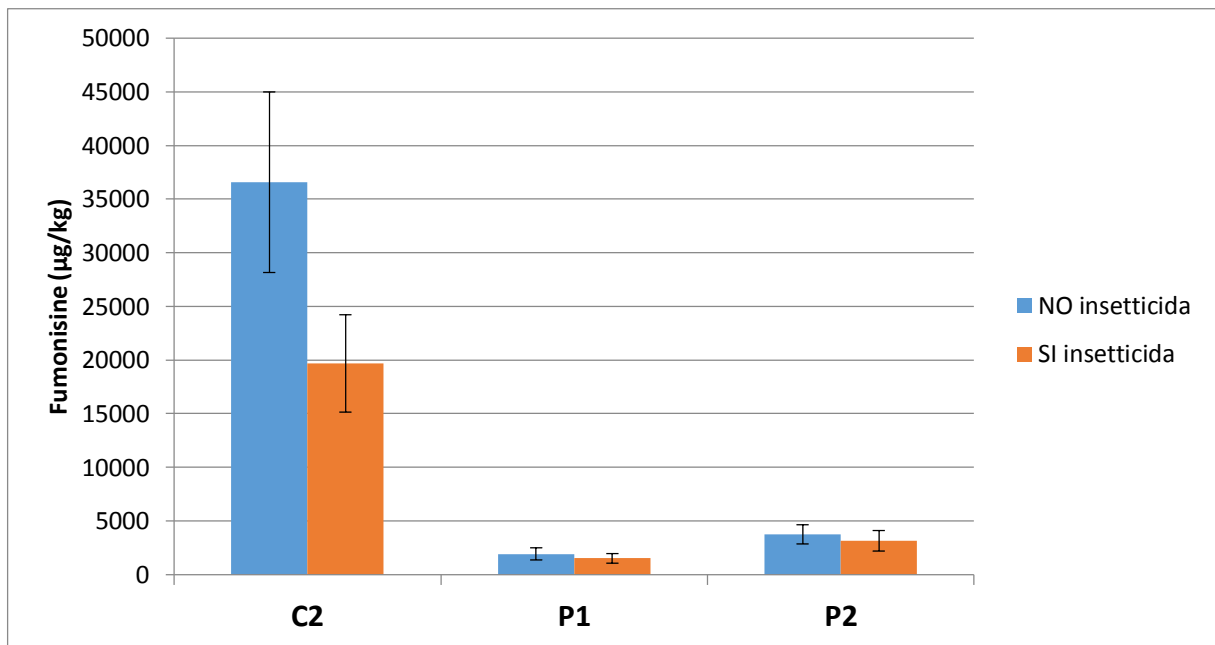


Figura 3.37. Contenuto di fumonisine B_1 e B_2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) della granella di mais. Borsea 2014. Limite di quantificazione= 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. I limiti fiduciali sono stati calcolati dal laboratorio di analisi Neutron.

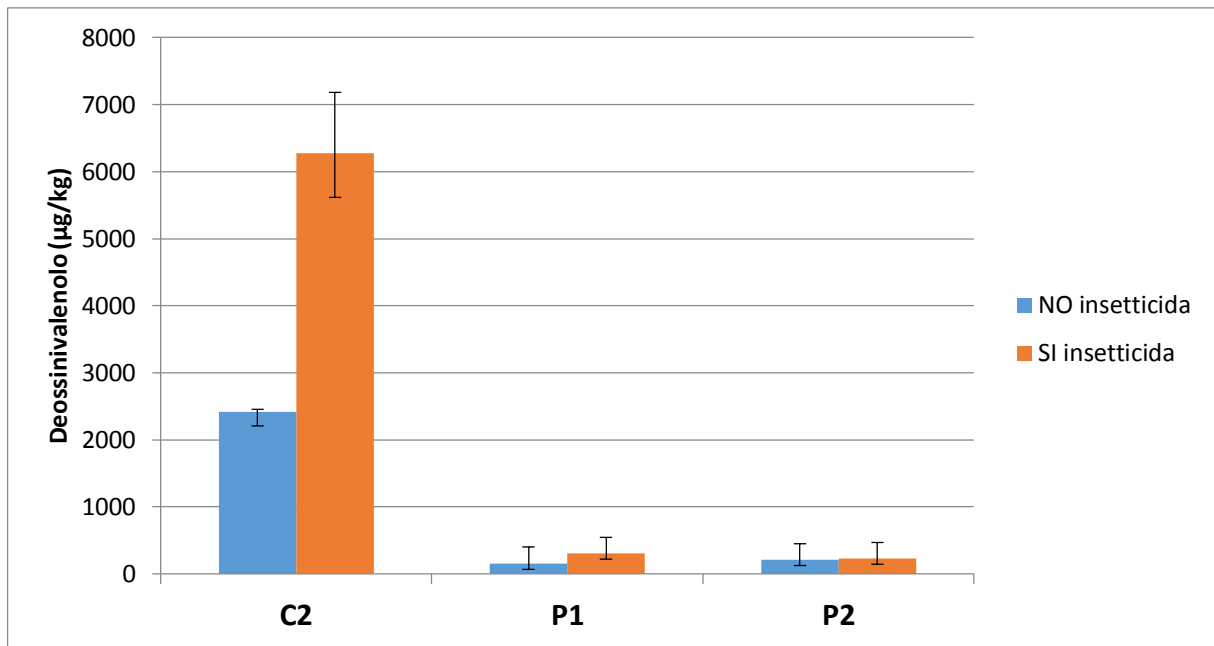


Figura 3.38. Contenuto di deossinivalenolo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) della granella di mais. Borsea 2014. I limiti fiduciali riportati sono stati calcolati per $p=0,05$.

3.3. Risultati della Prova di Campo 3

Risultati delle indagini micologiche e chimiche

La sperimentazione condotta nel comune di Scorzè (VE) ha previsto il confronto degli stessi tre ibridi saggiati nella prova di Borsea (Prova di Campo 2) senza, però, considerare l'effetto del trattamento insetticida.

I risultati relativi le indagini micologiche complete sono riportati in **figura 3.39**.

L'ibrido C2 è stato interessato da un'infezione fungina (**figura 3.40**) significativamente superiore rispetto agli ibridi precoci, tra i quali l'ibrido P1, con una carica media di poco superiore alle 30.000 cfu/g, ha prodotto una granella significativamente meno contaminata anche rispetto a P2. Il contenuto di fumonisine (**figura 3.41**) rispecchia esattamente l'andamento della carica dei *Fusaria*. Quindi, anche alla luce dei risultati emersi a riguardo del contenuto di deossinivalenolo (**figura 3.42**), l'ibrido tardivo C2 ha sicuramente dimostrato una maggior suscettibilità all'attacco dei funghi micotossigeni rispetto ai precoci.

Ibrido	<i>Fusarium spp.</i>		<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>
	cfu/g	lim (+/-)			
C2	364000	107371	364000	< loq	< loq
P1	32800	4840	29600	800	2400
P2	84000	32373	83600	400	< loq

Figura 3.39. Risultati analisi micologiche. Scorzè 2014. Il limite fiduciale (lim+/-) della carica di *Fusarium spp.* è stato calcolato per $p=0,05$.

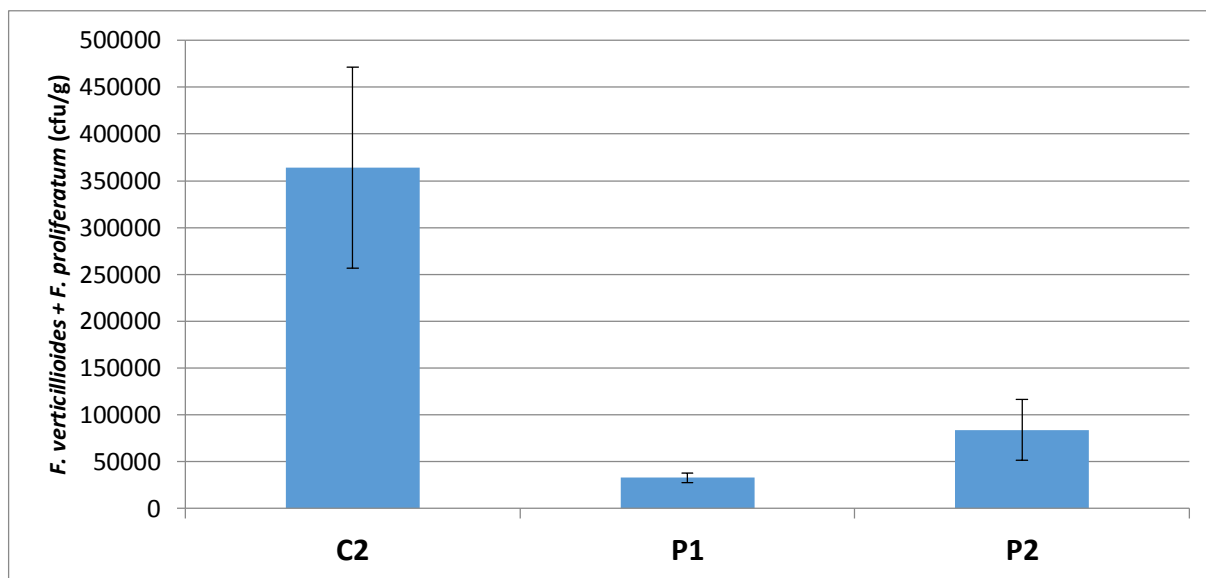


Figura 3.40. Carica di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (cfu/g) della granella di mais. Scorzè 2014. I limiti fiduciali sono stati calcolati per $p=0,05$.

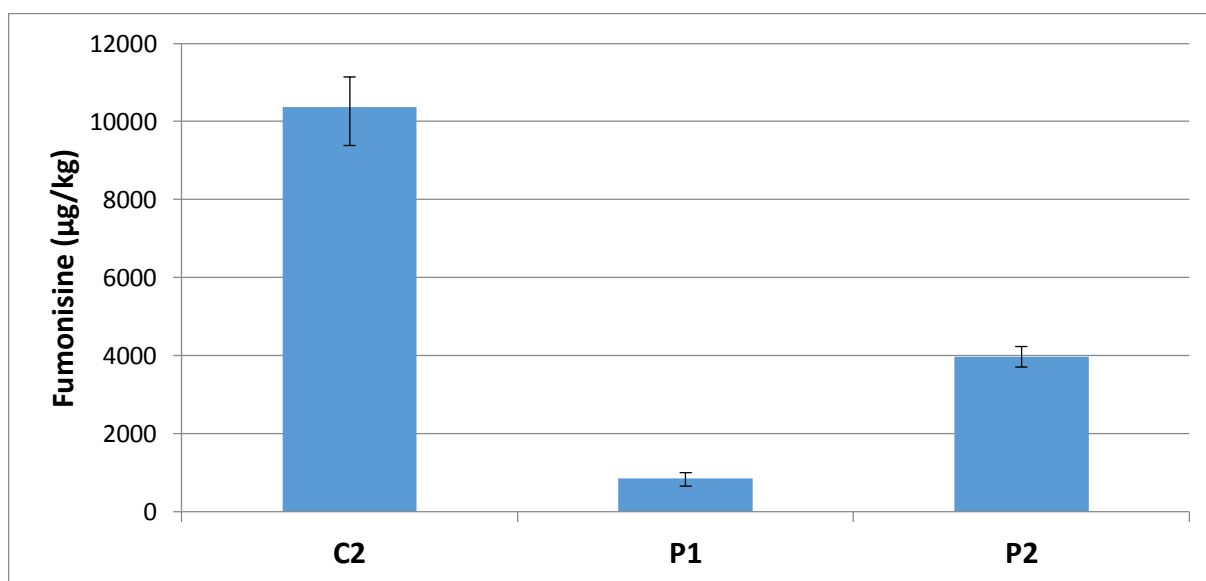


Figura 3.41. Contenuto di fumonisine B₁ e B₂ (µg/kg) della granella di mais. Scorzè 2014. I limiti fiduciali sono stati calcolati per $p=0,05$.

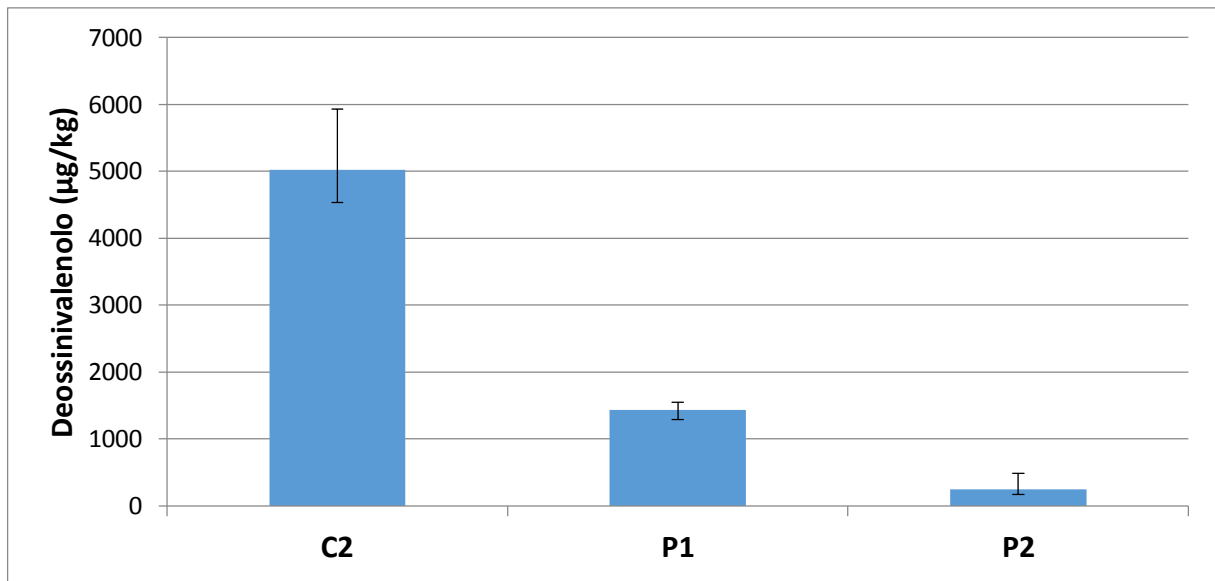


Figura 3.42. Contenuto di deossinivalenolo (µg/kg) della granella di mais. Scorzè 2014. I limiti fiduciali sono stati calcolati per $p=0,05$.

4. Discussioni e conclusioni

Le malattie indotte da patogeni fungini che colpiscono la spiga di mais e la relativa produzione, nonché l'accumulo di composti tossici da parte di questi funghi, sono eventi che comportano problematiche anche di grave entità che possono causare, oltre ad uno scadimento qualitativo della granella ed un impatto sanitario sulla pianta (che si traduce con una minore resa), anche problematiche di carattere sanitario per l'uomo e per gli animali in qualità di consumatori finali.

Diverse sono infatti le patologie in cui possono incorrere i soggetti che assumono alimenti contaminati e gli esiti più gravi possono culminare, come del resto si è già verificato in passato, con la morte degli individui stessi. Il contenuto di queste micotossine, all'interno di alimenti feed e food, sono regolamentati dall'Unione Europea attraverso specifiche normative e lo sfioramento di questi limiti può portare al sequestro del prodotto non conforme con le relative conseguenze di carattere amministrativo e/o penale contro i responsabili, nonché ad un danno economico. Il mais, a livello mondiale, è un cereale estremamente importante e diffuso, utilizzato nelle sue varie forme sia come alimento ad indirizzo feed e food, sia come materia prima in processi industriali.

Questo porta inevitabilmente a dover affrontare la problematica della contaminazione da micotossine in maniera molto seria, al fine di garantire un prodotto sano e sicuro, da poter essere introdotto in tutta sicurezza all'interno delle varie filiere produttive che caratterizzano tutto il percorso a partire dal produttore sino al consumatore ultimo finale. Nonostante siano utilizzate, in campo, diverse tecniche di controllo della contaminazione da micotossine, come l'applicazione di pratiche agronomiche atte a ridurre le infezioni fungine, programmi di lotta chimica e biologica e l'utilizzo di piante transgeniche, esse non sono in grado di risolvere completamente il problema, ma danno soltanto risultati parziali.

La selezione varietale ed il miglioramento genetico offrono una soluzione molto interessante. Molte patologie di carattere fungino infatti sono state risolte proprio con l'ausilio di questi mezzi. A questo scopo sono stati confrontati differenti ibridi in differenti località per saggiarne la sensibilità alla fusariosi della spiga.

Le prove svolte oltre a fornire informazioni sulla suscettibilità varietale hanno consentito di raccogliere dati che sono utili a meglio chiarire i meccanismi che causano l'infezione e l'accumulo delle *Fusarium*-tossine nel mais.

Si conferma che c'è una stretta relazione tra la carica fungina e la contaminazione da micotossine di pertinenza. Il risultato appare, dati alla mano, evidente ed è chiaramente dimostrato dalle regressioni tra carica fungina (*F. verticillioides* e *F. proliferatum*) e tossine correlate quali le

fumonisine. Tali regressioni sono sempre significative con valori molto alti, talvolta anche superiori a 0,9. È evidente che tutto ciò che può contribuire ad abbassare le infezioni fungine può essere un utile strumento per contenere l'accumulo delle micotossine. Si nota però anche un altro interessante fenomeno sino ad ora mai riportato, ovvero la diversa produttività di tossina da parte del patogeno. Appare infatti evidente come la medesima quantità di fungo dia luogo ad una diversa produzione, da un punto di vista quantitativo, di micotossine imputabile all'ambiente, indipendentemente dall'effetto dell'ibrido.

È ben visibile che la variabile ambiente è in grado di influenzare in maniera differente la tendenza ad accumulare fumonisine o deossinivalenolo, a seconda delle specie fungine "stimolate".

Il fattore che gioca un ruolo principale, quindi, è legato alla località, mentre il fattore ibrido non è risultato così importante. È quindi possibile ipotizzare che l'ambiente in senso lato come insieme delle cause che possono influire su pianta e patogeno, abbia esercitato su quest'ultimo un effetto stimolante in alcuni casi quali Cremona, Pavia e Verona, dove la produzione di fumonisine per colonie formanti unità di fungo è circa il doppio rispetto a Bergamo e Rovigo.

Da un primo esame si potrebbe imputare questo effetto al trattamento per il controllo della piralide che non è stato eseguito nelle località di Cremona e Pavia. È ben noto che le infestazioni da piralide sono fortemente correlate con le contaminazioni da fumonisine, ma nel caso in esame non può essere assunta come unica soluzione in quanto a Verona, una delle più produttive sotto questo aspetto, il trattamento contro la piralide è stato eseguito.

È pertanto necessario avanzare un'altra ipotesi legata all'influenza degli stress sul metabolismo fungino ricordando che le micotossine sono dei metaboliti secondari e che tutto quello che influenza la fisiologia fungina può alterare questo metabolismo; è quindi ragionevole pensare al fatto che le località dove il fungo è risultato il più produttivo sia dovuto alla motivazione che esso abbia subito anche degli stimoli derivanti dall'ambiente.

Le prove svolte non consentono di individuare il tipo di stimolo, ma è possibile ipotizzare che si tratti di qualche tipo di stress visto che è stato dimostrato che stress ossidativi ed osmotici possono causare una sovraespressione di alcuni geni del cluster per la produzione delle fumonisine (Ferrigo et al., 2015; Jurado et al., 2008).

L'influenza degli stress direttamente sul patogeno o trasferiti dalla pianta al patogeno, si propone, pertanto, come un'interessante argomento da approfondire attraverso specifiche ricerche.

Inerentemente al deossinivalenolo, prestando attenzione alla variabilità che intercorre tra le varie località, non essendo stato possibile determinare la carica fungina dei *Fusaria* produttori di questa

tossina, non possiamo, in questa sede, mettere in evidenza dinamiche simili a quelle appena descritte per le fumonisine. È ragionevole pensare che possano esistere delle interazioni di questo tipo, come riportato da Ponts et al, (2006 e 2009) rispetto alla possibilità che stress ossidativi possano influenzare la produzione di deossinivalenolo.

Per quanto riguarda la diversa sensibilità degli ibridi saggiati alla fusariosi della spiga, è stato possibile dimostrare che ci sono differenze statisticamente significative tra i genotipi in prova. Non è stato possibile, invece, trovare significatività nell'interazione "ibrido x località" probabilmente a causa del basso numero di replicazioni che a livello statistico non hanno permesso di dare significatività agli effetti espressi in modo non estremamente pronunciato. Questo aspetto merita di essere approfondito in prove dove sia possibile realizzare un maggior numero di replicazioni per trattamento.

In ogni caso risulta evidente l'effetto dell'ibrido sia sulla carica fungina che sull'accumulo di tossine. Infatti gli ibridi C4 e C6 sono risultati significativamente meno colonizzati e contaminati rispettivamente da fungo e tossina rispetto agli altri. Tale osservazione vale anche per le contaminazioni da deossinivalenolo dove il pool di genotipi meno suscettibili sono il C3, il C4 ed il C5. Interessante vedere come l'ibrido C4 risulti essere il migliore per entrambe le tossine considerate.

Relativamente al comportamento degli ibridi precocissimi (classe FAO 200 a 85 giorni) è stato possibile rilevare una netta differenza tra quest'ultimi ed il genotipo classe FAO 600 a 130 giorni per quanto riguarda la colonizzazione da parte dei patogeni *Fusarium* e la contaminazione da parte delle relative micotossine. I risultati ottenuti infatti dimostrano, in entrambi i casi, che la carica di *Fusaria* e di contenuto di fumonisine e deossinivalenolo sono sensibilmente inferiori nella granella ottenuta dagli ibridi precocissimi. La spiegazione potrebbe trovarsi nel fatto che gli ibridi precocissimi, anticipando l'intero ciclo culturale e di conseguenza tutte le fasi che lo compongono, sono in grado di evitare le infezioni dei patogeni o comunque risentirne in misura estremamente limitata, in quanto il ciclo d'infezione del fungo, non si manifesta come avverrebbe naturalmente nelle fasi di maggiore criticità e suscettibilità della pianta di *Zea mays*.

L'insieme delle prove svolte rispetto al comportamento dei vari genotipi, pur necessitando di ulteriori verifiche per più anni e se possibile per più località, mette comunque in evidenza le grandi potenzialità del miglioramento genetico condotto attraverso incroci e selezione come strumento utile a migliorare lo stato fitosanitario del mais relativamente alle fusariosi della spiga.

Sebbene non ci sia una completa sovrapposizione tra il comportamento dei merciumi rossi e rosa appare anche possibile individuare dei genotipi che associno minore sensibilità nei confronti di entrambe le malattie.

Per tutti questi motivi quindi a continuazione del lavoro, sia per individuare genotipi resistenti o tolleranti alle malattie, sia seguendo le strade che si avvalgono dell'impiego di ibridi a cicli colturali brevi, si propone già da ora come interessante e importante strumento per gestire i problemi derivanti dalla contaminazione da micotossine. Nonostante tutto bisogna evidenziare il fatto che l'impiego di ibridi precocissimi aiuta sì nel conseguire questo traguardo, ma dall'altro lato restituisce una minore produzione di granella in quanto trattasi di genotipi meno produttivi sotto questo aspetto.

ALLEGATO 1

Tab 1.1 – Regolamento CE 1126/2007. Esso modifica il Regolamento CE 1881/2006, il quale definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco.

(Fonte: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1453741093509&uri=CELEX:32007R1126>)

2.4	Deossivalenolo	
2.4.1	Cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granoturco	1.250
2.4.2	Grano duro e avena non trasformati	1.750
2.4.3	Granoturco non trasformato, ad eccezione del granoturco non trasformato destinato alla molitura ad umido (*)	1.750
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)	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	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
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
2.5	Zearalenone	
2.5.1	Cereali non trasformati diversi dal granoturco	100
2.5.2	Granoturco non trasformato ad eccezione del granoturco non trasformato destinato alla molitura ad umido (*)	350

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
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
2.5.6	Granturco destinato al consumo umano diretto, merende a base di granturco e cereali da colazione a base di granturco	100
2.5.7	Alimenti a base di alimenti destinati ai cereali trasformati (esclusi quelli a base di granturco) e altri lattanti e ai bambini	20
2.5.8	Alimenti a base di granturco trasformato destinati ai lattanti e ai bambini	20
2.5.9	Frazioni della molitura del granturco di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1103 13 o 1103 20 40 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	200
2.5.10	Frazioni della molitura del granturco di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1102 20 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	300
2.6	Fumonisine	Somma di B₁ e B₂
2.6.1	Granturco non trasformato, ad eccezione del granturco non trasformato destinato alla molitura ad umido (*)	4000
2.6.2	Granturco destinato al consumo umano diretto, prodotti a base di granturco destinati al consumo umano diretto, ad eccezione degli alimenti elencati ai punti 2.6.3 e 2.6.4	1000
2.6.3	Cereali da colazione e merende a base di granturco	800
2.6.4	Alimenti a base di granturco trasformato e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
2.6.5	Frazioni della molitura del granturco di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1103 13 o 1103 20 40 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	1400
2.6.6	Frazioni della molitura del granturco di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1102 20 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	2000

(*) L'esenzione si applica unicamente al granturco per il quale è chiaro, attraverso ad esempio l'etichettatura e la destinazione, che è destinato unicamente alla molitura ad umido (produzione di amido).

Tab. 1.2 – Regolamento CE 1881/2006. Esso definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti come micotossine nei prodotti alimentari.

(Fonte: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1453741017259&uri=CELEX:32006R1881>)

Prodotti alimentari		Tenori massimi (µg/kg)		
2.1	Aflatossine	B ₁	Somma di B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	M ₁
2.1.1	Arachidi da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego come ingredienti di prodotti alimentari	8,0	15,0	—
2.1.2	Frutta a guscio da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	—
2.1.3	Arachidi, frutta a guscio e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0	4,0	—
2.1.4	Frutta secca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	—
2.1.5	Frutta secca e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0	4,0	—
2.1.6	Tutti i cereali e loro prodotti derivati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.1.7, 2.1.10 e 2.1.12	2,0	4,0	—
2.1.7	Granturco da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	—
2.1.8	Latte crudo, latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	—	—	0,050
2.1.9	Le seguenti specie di spezie: <i>Capsicum</i> spp. (frutti secchi dello stesso, interi o macinati, compresi peperoncini rossi, peperoncino rosso in polvere, pepe di Caienna e paprica) <i>Piper</i> spp. (frutti dello stesso, compreso il pepe bianco e nero) <i>Myristica fragrans</i> (noce moscata) <i>Zingiber officinale</i> (zenzero) <i>Curcuma longa</i> (curcuma)	5,0	10,0	—
2.1.10	Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	0,10	—	—
2.1.11	Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento	—	—	0,025
2.1.12	Alimenti dietetici a fini medici speciali, destinati specificatamente ai lattanti	0,10	—	0,025

2.2	Ocratossina A	
2.2.1	Cereali non trasformati	5,0
2.2.2	Tutti i prodotti derivati dai cereali non trasformati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali e i cereali destinati al consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.2.9 e 2.2.10	3,0
2.2.3	Uve secche (uve di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10,0
2.2.4	Caffè torrefatto in grani e caffè torrefatto macinato, escluso il caffè solubile	5,0
2.2.5	Caffè solubile (istantaneo)	10,0
2.2.6	Vini (compreso il vino spumante ed esclusi i vini liquorosi e i vini con un titolo alcolometrico non inferiore al 15 % vol) e vini di frutta	2,0
2.2.7	Vini aromatizzati, bevande aromatizzate a base di vino e cocktail aromatizzati di prodotti vitivinicoli	2,0
2.2.8	Succo d'uva, succo d'uva concentrato ricostituito, nettare d'uva, mosto d'uva e mosto d'uva concentrato ricostituito, destinati al consumo umano diretto	2,0
2.2.9	Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	0,50
2.2.10	Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificamente ai lattanti	0,50
2.2.11	Caffè crudo, frutta secca diversa dalle uve secche, birra, cacao e prodotti a base di cacao, vini liquorosi, prodotti a base di carne, spezie e liquirizia	—
2.3	Patulina	
2.3.1	Succhi di frutta, succhi di frutta concentrati ricostituiti e nettari di frutta	50
2.3.2	Bevande spiritose, sidro e altre bevande fermentate derivate dalle mele o contenenti succo di mela	50
2.3.3	Prodotti contenenti mele allo stato solido, compresi la composta di mele e il passato di mele, destinati al consumo diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.3.4 e 2.3.5	25
2.3.4	Succo di mela e prodotti contenenti mele allo stato solido, compresi la composta e il passato di mele, per lattanti e bambini, etichettati e venduti come tali	10,0
2.3.5	Alimenti destinati ai lattanti e ai bambini diversi dagli alimenti a base di cereali	10,0

2.4	Deossinivalenolo	
2.4.1	Cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granturco	1.250
2.4.2	Grano duro e avena non trasformati	1.750
2.4.3	Granturco non trasformato	1.750
2.4.4	Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali [compresa la farina di granturco, la semola di granturco e il granturco grits], crusca come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto e germe, eccetto i prodotti alimentari di cui al punto 2.4.7	750
2.4.5	Pasta (secca)	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 e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
2.5	Zearalenone	
2.5.1	Cereali non trasformati diversi dal granturco	100
2.5.2	Granturco non trasformato	200
2.5.3	Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto e germe, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.5.4, 2.5.7 e 2.5.8	75
2.5.4	Granturco destinato al consumo umano diretto, farina di granturco, semola di granturco, granturco grits, germe di granturco e olio di mais raffinato	200
2.5.5	Pane (compresi i 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
2.5.6	Merende a base di granturco e cereali da colazione a base di granturco	50
2.5.7	Alimenti a base di cereali (esclusi quelli a base di granturco) e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	20
2.5.8	Alimenti a base di granturco destinati ai lattanti e ai bambini	20
2.6	Fumonisine	Somma di B₁ e B₂
2.6.1	Granturco non trasformato	2.000
2.6.2	Farina di granturco, semola di granturco, granturco gritz, germe di granturco e olio di mais raffinato	1.000

2.6.3	Alimenti a base di granturco destinati al consumo umano diretto, eccetto gli alimenti di cui ai punti 2.6.2 e 2.6.4	400
2.6.4	Alimenti a base di granturco e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
2.7	Tossine T-2 e HT-2	Somma delle tossine T-2 e HT-2
2.7.1	Cereali non trasformati e prodotti a base di cereali	

Tab. 1.3 – Regolamento UE 574/2011 che modifica l'allegato 1 della direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio per alcuni composti indesiderati nell'alimentazione animale.

(Fonte: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0574&qid=1454413130991&from=EN>)

Sostanza indesiderabile	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Contenuto massimo in mg/kg (ppm) di mangime con un tasso di umidità del 12%
Aflatossina B ₁	Materie prime per mangimi	0,02
	Mangimi complementari e completi	0,01
	ad eccezione di: - mangimi composti per bovini da latte e vitelli, ovini da latte ed agnelli, caprini da latte e capretti, suinetti e pollame giovane	0,005

Tab. 1.4 – Direttiva 2003/100/CE. Essa modifica l'allegato 1 della Direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio relativa alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali.

(Fonte: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1453741684396&uri=CELEX:32003L0100>)

Sostanze indesiderabili	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Contenuto massimo in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12 %
Aflatossina B ₁	Tutte le materie prime per mangimi	0,02
	Mangimi completi per bovini, ovini e caprini, ad eccezione di:	0,02
	— mangimi completi per animali da latte	0,005
	— mangimi completi per vitelli e agnelli	0,01
	Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02
	Altri mangimi completi	0,01
	Mangimi complementari per bovini, ovini e caprini (ad eccezione dei mangimi complementari per animali da latte, vitelli e agnelli)	0,02
	Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02
Altri mangimi complementari	0,005	

Tab. 1.5 – Raccomandazione 2006/576/CE sulla presenza di micotossine come deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali.

(Fonte: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1453741549468&uri=CELEX:32006H0576>)

Micotossina	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Valore di riferimento in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12 %
Desossinivalenolo	Materie prime per mangimi (*)	
	— Cereali e prodotti a base di cereali (**) fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco	8
	— Sottoprodotti del granoturco	12
	Mangimi complementari e completi, ad eccezione di:	5
	— mangimi complementari e completi per suini,	0,9
	— mangimi complementari e completi per vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti	2
Zearalenone	Materie prime per mangimi (*)	
	— Cereali e prodotti a base di cereali (**) fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco	2
	— Sottoprodotti del granoturco	3
	Mangimi complementari e completi	
	— Mangimi complementari e completi per suinetti e scrofette (giovani scrofe)	0,1
	— Mangimi complementari e completi per scrofe e suini da ingrasso	0,25
	— Mangimi complementari e completi per vitelli, bovini da latte, ovini (inclusi agnelli) e caprini (inclusi capretti)	0,5
Ocratossina A	Materie prime per mangimi (*)	
	— Cereali e prodotti a base di cereali (**)	0,25
	Mangimi complementari e completi	
	— Mangimi complementari e completi per suini	0,05
	— Mangimi complementari e completi per pollame	0,1
Fumonisine B1+B2	Materie prime per mangimi (*)	
	— Granoturco e prodotti derivati (***)	60
	Mangimi complementari e completi per:	
	— suini, equini (<i>Equidi</i>), conigli e animali da compagnia,	5
	— pesci,	10
	— pollame, vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti,	20
	— ruminanti adulti (> 4 mesi) e visoni	50

(*) Nel caso dei cereali e prodotti a base di cereali somministrati direttamente agli animali occorre prestare particolare attenzione a che il loro utilizzo nella razione giornaliera non comporti un'esposizione degli animali a tali micotossine superiore a quella che comporterebbe una razione giornaliera composta esclusivamente da mangimi completi.

(**) I termini «Cereali e prodotti derivati» non si riferiscono unicamente alle materie prime per mangimi di cui alla voce 1 «Cereali, loro prodotti e sottoprodotti» dell'elenco non esclusivo delle principali materie prime di cui all'allegato, parte B, della direttiva 96/25/CE del Consiglio, del 29 aprile 1996 relativa alla circolazione e all'utilizzo di materie prime per mangimi (GU L 125 del 23.5.1996, pag. 35) ma anche ad altre materie prime a base di cereali usate nei mangimi, in particolare foraggi, compresi foraggi grossolani.

(***) I termini «Granoturco e prodotti derivati» non si riferiscono unicamente alle materie prime per mangimi di cui alla voce 1 «Cereali, loro prodotti e sottoprodotti» dell'elenco non esclusivo delle principali materie prime di cui all'allegato, parte B, della direttiva 96/25/CE, ma anche ad altre materie prime a base di granoturco usate nei mangimi, in particolare foraggi, compresi foraggi grossolani.

ALLEGATO 2

Tabella della classificazione IARC

(Fonte: http://www.iss.it/binary/elet/cont/criteri_IARC.pdf)

Classificazione IARC	
Gruppi	Descrizione
1	Cancerogena per l'essere umano ⁽¹⁾
2A	Probabilmente cancerogena per l'essere umano ⁽²⁾
2B	Possibilmente cancerogena per l'essere umano ⁽³⁾
3	Non classificabile in relazione alla sua cancerogenicità per l'essere umano ⁽⁴⁾
4	Probabilmente non cancerogena per l'essere umano ⁽⁵⁾

(1) Questa categoria viene utilizzata quando c'è sufficiente evidenza di cancerogenicità nell'uomo. Eccezionalmente, un agente può essere classificato in questo gruppo quando l'evidenza nell'uomo è meno che sufficiente ma c'è sufficiente evidenza negli animali unita ad una forte evidenza negli esseri umani esposti che il meccanismo d'azione dell'agente è rilevante per la cancerogenicità.

(2) Questa categoria viene utilizzata quando c'è limitata evidenza di cancerogenicità nell'uomo e sufficiente evidenza nell'animale da esperimento. In alcuni casi, un agente può essere classificato in questa categoria quando c'è inadeguata evidenza nell'uomo, sufficiente evidenza nell'animale da esperimento e forte evidenza che il meccanismo di cancerogenesi osservato negli animali vale anche per l'uomo. Eccezionalmente, un agente può essere classificato in questa categoria anche solo sulla base di limitata evidenza di cancerogenicità nell'uomo.

(3) Questa categoria viene utilizzata per agenti per i quali c'è limitata evidenza di cancerogenicità nell'uomo e meno che sufficiente evidenza di cancerogenicità negli animali da esperimento. Può anche essere usata quando c'è inadeguata evidenza di cancerogenicità nell'uomo ma c'è sufficiente evidenza di cancerogenicità negli animali da esperimento. In alcuni casi, può essere collocato in questo gruppo un agente per il quale c'è inadeguata evidenza di cancerogenicità nell'uomo ma limitata evidenza di cancerogenicità nell'animale da esperimento con evidenza di supporto da altri dati rilevanti.

(4) Questa categoria viene usata di solito per agenti per i quali l'evidenza di cancerogenicità è inadeguata nell'uomo e inadeguata o limitata nell'animale da esperimento. Eccezionalmente, possono essere collocati in questo gruppo agenti per i quali l'evidenza nell'uomo è inadeguata ma l'evidenza nell'animale è sufficiente e, tuttavia, vi è forte evidenza che i meccanismi di cancerogenicità nell'animale non siano operativi nell'uomo. Vengono anche classificati in questo gruppo gli agenti che non ricadono in nessun'altra categoria.

(5) Questa categoria viene utilizzata per agenti per i quali c'è evidenza suggestiva di assenza di cancerogenicità sia nell'uomo, sia nell'animale da esperimento. In alcuni casi possono rientrare in questa categoria agenti per i quali c'è inadeguata evidenza di cancerogenicità nell'uomo ma evidenza suggestiva di assenza di cancerogenicità nell'animale da esperimento consistentemente e fortemente supportata da un ampio ventaglio di altri dati rilevanti.

Bibliografia

- ABARCA M.L., BRAGULAT M.R., CASTELLÀ G., CABAÑES F.J., (1994); **Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger***; Applied and Environmental Microbiology, 60, pp. 2650-2652;
- ABBAS H.K., ACCINELLI C., ZABLOTOWICZ R.M., ABEL C.A., BRUNS H.A., DONG Y., SHIER W.T., (2008); **Dynamics of mycotoxin and *Aspergillus flavus* levels in aging Bt and non-Bt corn residues under Mississippi no-till conditions**; Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol.56, pp. 7578-7585;
- ABBAS H.K., WILKINSON J.R., ZABLOTOWICZ R.M., ACCINELLI C., ABEL C.A., BRUNS HA, WEAVER M.A., (2009); **Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn**; Toxin Reviews, Vol.28, No.2-3, pp. 142-153;
- ABDULRAZZAQ Y., OSMAN N., YOUSIF Z., AL-FALAH S., (2003); **Aflatoxin M₁ in breast-milk of UAE women**; Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health, Vol.23, No.3, pp. 173-179;
- ADEJUMO T.O., HETTWER U. E KARLOVSKY P., (2007); **Occurrence of *Fusarium* species and trichothecenes in Nigerian maize**; International Journal of Food Microbiology, Vol.116, No.3, pp. 350-357;
- ADEMOYERO A. A. & P. B. HAMILTON., (1991a); **Mouth lesions in broiler chickens caused by scirpenol mycotoxins**; Poultry Sci. 70, pp. 2082-2089;
- ADEMOYERO A. A. & P. B. HAMILTON., (1991b); **Scirpentriol toxicity in young broiler chickens**; Poultry Sci. 70, pp. 2090-2093;
- ALEXANDER N.J., PROCTOR R.H. E MCCORMICK S.P., (2009); **Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumosins in *Fusarium***; Toxin Reviews, Vol.28 No.2-3, pp. 198-215;
- AMAIKE S., KELLER N.P, (2011); ***Aspergillus flavus***; Annual Reviews of Phytopathology, Vol.49, pp. 107-33;
- AMODEO P., (2001); **Perché il progetto, quali i risultati, quali le problematiche**; In Atti Convegno Aflatossine nel latte e negli alimenti zootecnici: metodiche analitiche e anamnesi di allevamento Progetto regionale "Ricerca dei determinanti la qualità del latte per l'applicazione del Reg. CE 1525 del 16 luglio 1998". Palazzo della regione Lombardia, 7 maggio 2001, pp. 7-27;
- AMODEO P., (2002); **Inquinamento da micotossine: la situazione negli allevamenti da latte della Lombardia**; Large Animals Review, (5), pp. 21-26;

- ANCONELLI S., GUIDOBONI G., SOHMANDO D., (2007); **L'irrigazione è utile per contenere le infezioni.** In: Mais: il rischio micotossine, Agricoltura, marzo 2007, pp. 130-132;
- ARUKWE A., GROTRNOL T., HAUGEN T.B., KNUD SEN F.R., GOKSOYR A., (1999); **A Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin Zearalenone and its metabolites;** The Sci. of the total Environ. 236, pp. 153-161;
- AYRAL A. M., N. DUBECH J. LE BARS & L. ESCOULA., (1992); **In vitro effect of diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol on microbicidal activity of murine peritoneal macrophages;** Mycopathologia 120, pp. 121-127;
- BACON C. W., J. K. PORTER W. P. NORRED, AND J. F. LESLIE., (1996); **Production of fusaric acid by *Fusarium* species;** Appl. Environ. Microbiol. 62, pp. 4039-4043;
- BARRIER-GUILLOT B., (2008); **T-2 and HT-2 in cereals grown in France;** 5th *Fusarium*-toxins Forum;
- BATEMAN G.L., MURRAY G., (2001); **Seasonal variations in populations of *Fusarium* species in wheat-field soil;** Applied Soil Ecology 18, pp. 117-128;
- BATTILANI E, BARBANO C., MARIN S, SANCHIS V., KOZAKIEWICZ Z., MAGAN N., (2006a); **Mapping of *Aspergillus* Section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis;** International Journal of Food Microbiology;
- BATTILANI P, ROSSI V., SCANDOLARA A., GIORNI P., BERTUZZI T., FERMENTI S., (2004); **Ruolo delle fasi fenologiche sulla sintesi di micotossine in mais;** In Rapporti ISTISAN 05/42, pp. 71-72;
- BATTILANI P., (2004); **Ferite alle cariossidi e umidità favoriscono i funghi aflatossigeni;** L'informatore agrario 14, pp. 47;
- BATTILANI P., BARBANO C., BERTUZZI T., MAROCCO A., PIETRI A., SCANDOLARA A., SCUDELLARI D., (2008); **Micotossine in Emilia-Romagna, risultati incoraggianti;** L'informatore agrario 7/2008;
- BATTILANI P., PIETRI A., (2008); **Micotossine nel mais prodotto in Italia: diffusione e prevenzione;** Informatore fitopatologico, 4, pp. 2-10;
- BEARDALL J.M., MILLER J.D., (1994); **Disease in humans with mycotoxins as possible causes;** In J.D. Miller and H.L. Trenholm (ed.), Mycotoxins in grains, pp. 487-539;
- BENITEZ T., RINCÓN A.M., LIMÓN M.C., CODÓN A.C., (2004); **Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains;** In International Microbiology, Vol.7, pp. 249-260;
- BENNET J.W., KLICH M., (2003); **Mycotoxins;** Clinical Microbiology Reviews, Vol.16, No.3, pp. 497-516;

- BENNETT J. W., S. KALE, AND Y. J., (2003); **Aflatoxins: Background, Toxicology, and Molecular Biology**. In Infectious Disease: Foodborne Diseases; S. Simjee, ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ;
- BENT A. F., MACKEY D., (2007); **Elicitors, Effectors, R Genes. The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions**; Annual Reviews of Phytopathology, Vol. 45, pp. 399-436;
- BERNHOFT A., LANGSETH W., RUNDBERGET T., KOSIAK B., GAREIS M., (1999); **Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals**; Mycopathologia 144, pp. 103-113;
- BEYER M., VERREETA J.A., RAGAB W.S.M., (2005); **Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberelia zeae* and deoxynivalenol production**; International Journal of Food Microbiology, Vol.98, pp. 233-240;
- BEZUIDENHOUT S.C., GELDERBLOM W.C.A., GORST-ALLMAN R.M.M., MARASAS W.F.O., SPITELLER G. AND VLEGGAR R., (1988); **Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme***; J. Chem. Commun. (11), pp. 743-745;
- BIEHL M.L., PRELUSKY D.B., KORITZ G.D., HARTIN K.E., BUCK W.B. AND TREHOLM H.L., (1993); **Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs**; Toxicol. Appl. Pharmacol. 121, pp. 152-159;
- BLANDINO M., MANCINI M.C., REYNERI A., (2010); **Allerta *Fusarium* sul grano: riconoscere i sintomi in campo**; Informatore Agrario, Vol.24, pp. 50-53;
- BLANDINO M., REYNERI A., VANARA F., (2008); **Effect of plant density on toxigenic fungal infection and mycotoxin contamination of maize kernels**; Field Crops Research, 106, pp. 234-241;
- BLANDINO M., REYNERI A., VANARA F., PASCALE M., HAIDUKOWSKI M., SAPORITI M., (2008); **Effect of sowing date and insecticide application against European corn borer (*Lepidoptera: Crambidae*) on fumonisin contamination in maize kernels**; Crop Protection, Vol.27, pp. 1432-1436;
- BODE W.M., CALVIN D.D., (1990); **Yield-loss relationships and economic injury levels for European Corn Borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) populations infesting Pennsylvania field corn**; J. Econ. Entomol. 83 (4), pp. 1595-1603;
- BOONMAN N, PRACHYA S, BOONMEE A, KITTAKOOP P, WIYAKRUTTA S, SRIUBOLMAS N, WARIT S, DHARMKRONG-AT CHUSATTAYANOND A., (2012); **In vitro acanthamoebicidal activity of fusaric acid and dehydrofusaric acid from an endophytic fungus *Fusarium sp.***; Tlau3. Planta Med 78, pp. 1562-1567;
- BOOTH C., (1971); **The genus *Fusarium***; Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK;

- BOTTALICO A., (2004); **Micotossine**. In chimica degli alimenti; Cabras P. e Martelli A., Piccin Nuova Libreria, Padova, pp. 649-686;
- BOTTALICO A., PERRONE G., (2002); **Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe**; European Journal of Plant Pathology 108, pp. 611-624;
- BOTTALICO A., (1998); ***Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles**; J. Plant Pathol. 80, pp. 85-103;
- BOURDAGES J.V., MARCHAND S., RIOUX S., BELZILE F.J., (2006); **Diversity and prevalence of *Fusarium* species from Quebec barley fields**; Canadian Journal of Plant Pathology 28, pp. 419-425;
- BRACKETT R.E., MARTH E.H., (1982); **Association of Aflatoxin M₁ with Casein**; Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, Vol.174, No.6, pp. 439-441;
- BRAUN R., (1960); **Über Wirkungsweise und Umwandlungen der Fusarinsäure**; Phytopathol Z 39, pp. 197-241;
- BRENT K.J., (1995); **Fungicide resistance in crop pathogens, how can it be managed?**; Bruxelles, Belgium. Global Crop Protection Federation;
- BRERA C., CATANO C., DE SANTIS B., DEBEGNACH F., DE GIACOMO M., PANNUNZI E., MLRAGLIA M., (2006); **Effect of Industrial Processing on the Distribution of Aflatoxins and Zearalenone in Corn-Milling Fractions**; Journal of Agricultural Food and Chemistry, Vol.54, pp. 5014-5019;
- BROWN D.W., MCCORMICK S.P., ALEXANDER N.J., PROCTOR R.H., DESJARDINS A.E., (2002); **Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species**; Fungal Genetics and Biology Vol.36, pp. 224-233;
- BROWN R.L., CHEN Z.Y., CLEVELAND T.E., RUSSIN J.S., (1999); **Advances in the Development of Host Resistance in Corn to Aflatoxin Contamination by *Aspergillus flavus***; Phitopathology, Vol.89, No.2, pp. 113-117;
- BROWN R., T. CLEVELAND C. WOLOSHUK G. A. PAYNE, E D. BHATNAGAR., (2001); **Growth inhibition of a *Fusarium verticillioides* GUS strain in maize kernels of aflatoxin-resistant genotypes**; Appi. Biotechnol. Microbiol. 57, pp. 708-711;
- BUNGE I., DIRHEIMER G., ROSCHENTHALER R., (1978); **In vivo and in vitro inhibition of protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* by ochratoxin A**; Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, pp. 398-405;
- CALÓ, L., F. FORNELLI R. RAMIRES S. NENNA A. TURSI M. F. CAIAFFA & L. MACCHIA., (2004); **Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin**; Pharmacol. Res. 49, pp. 73-77;

- CALONI F., SPOTTI M., AUERBACH H., OP DEN CAMP H., FINK-GREMMELS J. AND POMPA G., (2000); **In vitro metabolism of fumonisin Bi by ruminal microflora**; Vet. Res. Com. 24, pp. 379-387;
- CAMPBELL K.W., WHITE D.G., (1995); **Evaluation of Com Genotypes for Resistance to *Aspergillus* Ear Rot, Kernel Infection, and Aflatoxin Production**; Plant Disease, Vol.79, No. 10, pp. 1139-1145;
- CAST (COUNC. AGRIC. SCI. TECHNOL.), (2003); **Mycotoxins: Risks in Plant and Animal Systems**; Task Force Rep.139, No 38, Ames, IA: CAST;
- CASTEGNARO M, CHERNOZEMSKY IN, HIETANEN E, BARTSCH H., (1990); **Are mycotoxins risk factors for endemic nephropathy and associated urothelial cancers?**; Archive fur Geschwulstforschung 60, pp. 205-303;
- CASTEGNARO M., PLESTINA R., DIRHEIMER G., CHERNOZEMSKY I.N., BARTSCH H., (2000); **Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract**;
- CASTELLS M., MARIN S., SANCHIS V., RAMOS A. J., (2005); **Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing**; International Journal of Food Microbiology, 123, pp. 81-87;
- CAUSIN R., (2004); **Le micotossine: chi le produce, cosa sono e cosa fanno**; Estratto Bollettino settimanale ASS.IN.CER;
- CAUSIN R., (2006); **Funghi e micotossine. Mais e sicurezza alimentare**; Veneto agricoltura, pp. 11-29;
- CAUSIN R., RASERA R. AND SCOPEL C., (2009); **Conoscere le vie infettive per combattere le fumonisine**; Informatore Agrario 15, pp. 64-67;
- CHACON M.R., RODRIGUEZ-GALÁN O., BENITEZ T., SOUSA S., REY M., LLOBELL A., DELGADO-JARANA J., (2007); **Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum***; International Microbiology, Vol.10, pp. 19-27;
- CHAUDHARY M., JAYARAJ R., BHASKAR A.S.B., LAKSHMANA RAO P.V., (2009); **Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells**; Vol.262, No.2, pp. 153-16;
- CHOI C. Y., H. NAKAYIMA-ADACHI S. KAMINOGAWA & Y. SUGITA-KONISHI., (2000); **Nivalenol inhibits total and antigen-specific IgE production in mice**; Toxicology Appl. Pharmacol. 165, pp. 94-98;
- CHU F.S., GROSSMAN S., WEI R.D., MIROCHA C.J., (1979); **Production of antibody against T-2 toxin**; Applied, Environmental. Microbiology,. Vol.37, No.1, pp. 104-108;

- CHUNG S. H., D. RYU E. K. KIM & L. B. BULLERMAN., (2005); **Enzyme-assisted extraction of moniliformin from extruded corn grits**; J. Agric. Food Chem. 53, pp. 5074-5078;
- CIEGLER A., (1972); **Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group**; Canadian Journal of Microbiology, 18, pp. 631-636;
- CLEVELAND T.E., DOWD P.F., DESJARDINS A.E., BHATNAGAR D., COTTY P.J., (2003); **Pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in crops**; Pest Management Science, Vol.59, No.6-7, pp. 629-642;
- COTTY P.J., BAYMAN P., EGEL D.S., ELIAS K.S., (1994); **Agriculture, Aflatoxins and *Aspergillus***; Cals.Arizona.EDU;
- COTTY P.J., (2001); **Cotton-seed losses and mycotoxins**; Compendium of Cotton Diseases, pp. 9-13;
- COULTER J.B., LAMPLUGH S.M., SULIMAN G.L., OMER M.I., HENDRICKSE R.G., (1984); **Aflatoxins in human breast milk**; Annals of Tropical Paediatrics Vol.4, No.2, pp. 61-66;
- CREPPY E.E., CHAKOR K., FISHER M.J. AND DIRHEIMER G., (1984); **Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine**; Food Chem. Toxicol. 22, pp. 883-886;
- CREPPY E.E., KERN D., STEYN P.S., VLEGGAAR R., ROSCHENTHALER R. AND DIRHEIMER G., (1983a); **Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast 102 aminoacyl-tRNA synthase and on the growth and on the protein synthesis of hepatoma cells**; Toxicol. Lett. 19, pp. 217-224;
- CREPPY E.E., STORMER F.C., ROSCHENTHALER R. AND DIRHEIMER G., (1983b); **Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthase and on the growth and in vivo protein synthesis of epatoma cells**; Chem. Biol. Interect. 47, pp. 239-247;
- CZEMBOR E., STĘPIEŃ Ł., WAŚKIEWICZ A., (2014); ***Fusarium temperatum* as a New Species Causing Ear Rot on Maize in Poland**; The American Phytopathological Society – Volume 98, Number 7, pp. 1001;
- D’MELLO J.P.F., MACDONALD A.M.C., (1997); **Mycotoxins**; Anim. Feed Sci. Technol;
- DE LORENZI L., DE GIOVANNI A., MALAGUTTI L., MOLTENI L., SCIARAFFIA F., TAMBURINI A., ZANOTTI M., (2005); Ital. J. Anim. Sci. 4, pp. 395-402;
- DE NIJS M., F. ROMBOUITS & S. NOTERMANS., (1996); ***Fusarium* molds and their mycotoxins**; J. Food Saf. 16, pp. 15-58;
- DESJARDINS A.E., (2006); ***Fusarium* Mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology**; APS Press, St. Paul, MN, USA;

- DESJARDINS A.E., HOHN T.M., MCCORMICK S.P., (1993); **Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species: Chemistry, Genetics, and Significance**; Microbiological Reviews, Vol.57, No.3, pp. 595-604;
- DESJARDINS A.E., PROCTOR R.H., (2007); **Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins**; International Journal of Food Microbiology 119, pp. 47-50;
- DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D., GORDON T.R., (2000); ***Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America**; Mycol. Res. 104, pp. 865-872;
- DILL-MACKY R., JONES R.K., (2000); **The Effect of Previous Crop Residues and Tillage on *Fusarium* Head Blight of Wheat**; Plant Disease, Vol. 84, No. 1, pp. 71-76;
- DIVON H.H., RAZZAGHIAN J., UDNES-AAMOT H., SLETNER KLEMSDAL S., (2012); ***Fusarium langsethiae* (Torp and Nirenberg), investigation of alternative infection routes in oats**; European Journal of Plant Pathology, Vol.132, pp. 147-161;
- DOBLER M., DUNITZ J. D., E KRAJEWSKI J., (1969); **Structure of the K⁺ complex with enniatin B, a macrocyclic antibiotic with K⁺ transport properties**; J. Mol. Biol., vol. 42, n. 3, pp. 603-606;
- DOKO M.B., RAPIOR S., VISCONTI A., AND SCHJTH J.E., (1995); **Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa**; Journal of Agriculture and Food Chemistry. 43, pp. 429-434;
- DOMBRINK-KURTZMAN M.A., (2003); **Fumonisin and beauvericin induce apoptosis in turkey peripheral blood lymphocytes**; Kluwer Academic Publisher Mycopathologia 156, pp. 357-364;
- DOMBRINK-KURTZMAN M.A., BENNETT G.A., AND RICHARD J.L., (1994); **An optimized MTT bioassay for determination of cytotoxicity of fumonisins in turkey lymphocytes**; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 77, pp. 512-516;
- DOOHAN F.M., BRENNAN J., COOKE B.M., (2003); **Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals**; European Journal of Plant Pathology 109, pp. 755-768;
- DORN B., FORRER H. R., SCHÜRCH S., &, VOGELGSANG S., (2009); ***Fusarium* species complex on maize in Switzerland: occurrence, prevalence, impact and mycotoxins in commercial hybrids under natural infection**; European Journal of Plant Pathology, 125, pp. 51-61;
- DORNER J.W., COLE R.J., BLANKENSHIP P., (1998); **Effect of inoculum agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts**; Biol. Control, 12(3), pp. 171-176;
- DOWN P.F., (1998); **Involvement in arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions**; In: Mycotoxin in agriculture and food safety. Marcel Dekker Inc, New York, Usa, pp. 307-350;

- DOWN P.F., BENNET G.A., MCGUIRE M.R., NELSEN T.C., SHASHA B.S., SIMMONS F.W., (1999); **Adherent malathion flour granules as an environmentally selective control for chewing insect pests of dent com ears: indirect reduction of mycotoxigenic ear molds**; Journal of Economic Entomology, 92(1), pp. 68-75;
- DRAGONI I, CANTONI C, VALLONE L., PAPA A., (1997); **Muffe, alimenti e micotossicosi**; Città Studi edizioni, Milano, pp. 57-62 277-294;
- DRUZHININA I.S., SEIDL-SEIBOTH V., HERRERA-ESTRELLA A., HORWITZ B.A., KENERLEY C.M., MONTE E., MUKHERJEE P.K., ZEILINGER S., GRIGORIEV I.V., KUBICEK C.P., (2011); **Trichoderma: the Genomics of opportunistic success**; Nature Reviews Microbiology, Vol.9, pp. 749-759;
- DUTTON M.F., (1988); **Enzymes and Aflatoxin Biosynthesis**; Microbiological Reviews, Vol.52, No.2, pp. 274-295;
- E. CHANDLER, NICHOLSON P., R. C. DRAEGER N. E. GOSMAN D. R. DIMPSON & M. THOMSETT., (2003); **Molecular tools to study epidemiology and toxicology of Fusarium head blight of cereals**; Eur. J. Plant Pathol. 109, pp. 691-703;
- EDWARDS S. G., (2009); **Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional barley**; Food Addit. Contam. 2009, 26, pp. 1185-1190;
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY), (2005); **Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed**; In The EFSA Journal, 235, pp. 1-32;
- EFSA., (2010); **Request for a scientific opinion on the risks for public health related to the presence of moniliformin in feed and food**; Mandate M-2010-0312, Reception Date 21-07-2010, Acceptation Date 09-09-2010;
- EHRLICH K.C., CHANG P.K., YU J., COTTY P.J., (2004); **Aflatoxin biosynthesis cluster gene cypA is required for G aflatoxin formation**; Applied and Environmental Microbiology, Nov. 2004, Vol. 70 n° 11;
- EHRLICH V., DARROUNDI F., UHL M., STEINKELLNER H., GANN M., MAJER B.J., EISENBAUER M., KNASMÜLLER S., (2004); **Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells**; Food and Chemical Toxicology 40, pp. 1085-1090;
- EL-HASAN A., WALKER F., SCHÖNE J., BUCHENAUER H., (2007); **Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by Trichoderma harzianum toward Fusarium moniliforme**; Journal of Plant Diseases and Protection, Vol.114, No.2, pp. 62-68;
- ELLISON R.A., KOTSONIS F.N., (1974); **In vitro metabolism of T-2 toxin**; Applied Microbiology. Vol.27, pp. 423-424;
- ESPADA ET AL., (1994); in WHO: www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm;

- EUROPEAN COMMISSION., (2006); **Commission regulation No. 1881/2006, of 10 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in food stuff**; Official Journal of the European Union L 364, pp. 5-24;
- FEIFEL S. C., SCHMIEDERER T., HORNBÖGENT., BERG H., SÜSSMUTH R.D., ZOCHER R., (2006); **In vitro synthesis of new enniatins: Probing the α -D-hydroxy carboxylic acid binding pocket of the multienzyme enniatin synthetase**; ChemBioChem 2007, 8, pp. 1767-1770;
- FERRIGO D., RAIOLA A., BOGIALLI S., BORTOLINI C., TAPPARO A., & CAUSIN R., (2015); **In Vitro Production of Fumonisin by *Fusarium verticillioides* under Oxidative Stress Induced by H₂O₂**; J. Agric. Food Chem., Vol. 63, N°19, pp. 4879–4885;
- FICHEUX A. S., Y. SIBIRIL S. LE GARREC & D. PARENT-MASSIN., (2012); **In vitro myelotoxicity assessment of the emerging mycotoxins Beauvericin, Enniatin B and moniliformin on human hematopoietic progenitors**; Toxicol. 59, pp. 182-91;
- FINK-GREMMELS J., (2008); **Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk; A review**; Food Additives and Contaminants, Vol.25, No.2, pp. 172-180;
- FISHER R. A., YATES F., (1953); **Statistical tables for biological, agricultural and medical research**; Oliver and Boyd eds., pp.126;
- FODOR J., MEYER K., RIEDLBERGER M., BAUER J., HORN P., KOVACS F., KOVACS M., (2006); **Distribution and elimination of fumonisin analogues in weaned piglets after oral administration of *Fusarium verticillioides* fungal culture**; In Food Additives and Contaminants, 23 (5), pp. 492-501;
- FÖLLMANN W., C. BEHM & G. H. DEGEN., (2009); **The emerging *Fusarium* toxin enniatin B: in-vitro studies on its genotoxic potential and cytotoxicity in V79 cells in relation to other mycotoxins**; Mycotox. Res. 25, pp. 11-19;
- FOROUD N.A., EUDES F., (2009); **Trichothecenes in Cereal Grains**; International Journal of Molecular Sciences, Vol.10, pp. 147-173;
- FORSELL J. H. & J. J. PETSKA., (1985); **Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human lymphocyte blastogenesis**; Appl. Environ. Microbiol. 50, pp. 1304-1307;
- FRANCESCHI S., BIDOLI E., BURON A.E., LA VECCHIA C., (1990); **Maize and risk of cancer in the oral cavity, pharynx and esophagus in northeastern Italy**; In Journal Nat. Cancer. Inst. 1990, 82, pp. 1407-1411;
- GAMS W, BISSETT J., (1998); **Morphology and identification of *Trichoderma***; In *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 1; Taylor and Francis, London, pp. 3-34;

- GEISER D., SAMSOM R.A., VARGA J., ROKAS A., WITIAK S.M., (2008); **A review of molecular phylogenetics in *Aspergillus* and prospects for a robust genus-wide phylogeny**; *The Genus Aspergillus*, Vol.1, pp. 17-27;
- GELDERBLOM W.C.A., CAWOOD M.E., SNYMAN S.D., VLEGGAR R. AND MARASAS W.F.O., (1993); **Structure-activity relationships in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assay**; *Food and Chem. Toxicol.* 31, pp. 407-414;
- GELDERBLOM W.C.A., SNYMAN S.D., VAN DER WESTHUZEN L. AND MARASAS W.F.O., (1995); **Mitoinhibitory effect of fumonisin B₁ on rat hepatocytes in primary culture**; *Carcinogenesis* 16, pp. 625-631;
- GELDERBLOM W. C. A., P. G. THIEL W. F. O. MARASAS & K. J. VAN DER MERWE., (1984); **Natural occurrence of fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme*, in corn**; *J. Agr. Food Chem.* 32, pp. 1064-1067;
- GHISALBERTI E.L., SIVASITHAMPARAM K., (1991); **Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma spp***; *Soil Biology & Biochemistry* Vol.23, pp. 1011-1020;
- GILBERT J., FERNANDO W.G.D., (2004); **Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/ *Fusarium graminearum***; *Canadian Journal of Plant Pathology*, Vol.26, pp. 464-472;
- GLENN A. E., ZITOMER N. C., ZIMMERMAN A. M., WILLIAMS L. D., RILEY R. T., PROCTOR R. H., (2007); **Transformation-Mediated Complementation of a FUM Gene Cluster Deletion in *Fusarium verticillioides* Restores both Fumonisin Production and Pathogenicity on Maize Seedlings**; *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2007, 21, pp. 87-97;
- GONZÁLEZ H. H. L., G. A. MOLTÓ, A. PACIN S. L. RESNIK M. J. ZELAYA M. MASANA & E. J. MARTÍNEZ., (2008); **Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires province, Argentina**; *Mycopathologia.* 165, pp. 105-114;
- GRIFFITTS J.S., HASLAM M.S., YANG T., GARCZYNSKI S.F., MULLOY B., MORRIS H., CREMER P.S., DELL A., ADANG M.J., AROIAN R.V., (2005); **Glycolipids as Receptors for *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin**; *Science* 307(5711), pp. 922-925;
- GROOPMAN JD, DEMATOS P., EGNER PS, LOVE-HUNT A., KENSLES TW., (1992); **Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-guanine and serum aflatoxin-albumin adducts predicts chemoprotection by 1,2-dithiole-3-thione in rats**; *In Carcinogenesis* 13, pp. 101-106;
- GROVE J. F., AND M. POPLE., (1980); **The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex**; *Mycopathologia* 70, pp. 103-105;
- GUPTA S., KRASNOFF S. B., UNDERWOOD N. L., RENWICK J. A. A., E ROBERTS D. W., (1991); **Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme var. subglutinans***; *Mycopathologia*, vol. 115, n. 3, pp. 185-189;

- GUTLEB A. C., E. MORRISON & A. J. MURK., (2002); **Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review**; Environ. Toxicol. Pharmacol. 11, pp. 309-320;
- HAOUET N. E. ALTISSIMI S., (2003); **Micotossine negli alimenti e micotossicosi animale e umana**; In Webzine Sanità Pubblica Veterinaria 18, Febbraio 2003;
- HARMAN G.E., HOWELL C. R., VITERBO A., CHET I., LORITO M., (2004); ***Trichoderma* Species Opportunistic, Avirulent, Plant Symbionts**; Nature Reviews, Microbiology, Vol.2, pp. 43-57;
- HEADRICK J.M., PATAKY J.K., JUVIK J.A., (1990); **Relationships among carbohydrate content of kernels, condition of silks after pollination, and the response of sweet corn inbred lines to infection of kernels by *Fusarium moniliforme***; Phytopathology, Vol.80, pp. 487-494;
- HEIDTMARM-BEMVENUTI R., MENDES G.L., SCAGLIONI P.T., BADIALE-FURLONG E., SOUZA-SOARES LA., (2011); **Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review**; African Journal of Food Science Vol. 5, No.16, pp. 861-869;
- HENDRICH S., MILLER K.A., WILSON T.M. AND MURPHY P.M., (1993); **Toxicity of *Fusarium proliferatum* fermented nixtamalized corn-based diets fed to rats: effect of nutritional status**; J. Of Agric. and Food Chem. 41, pp. 1649-1654;
- HERMOSA R., VITERBO A., CHET I., MONTE E., (2012); **Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes**; Microbiology, Vol. 158, pp. 17-25;
- HESTBJERG H., NIELSEN K. F., THRANE U., ELMHOLT S., (2002); **Production of Trichothecenes and Other Secondary Metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on Common Laboratory Media and a Soil Organic Matter Agar: An Ecological Interpretation**; Journal of Agricultural Food Chemistry, Vol.50, pp. 7593-7599;
- HIDAKA H., NAGATSU T., TAKEYA K., TAKEUCHI T., SUDA H., (1969); **Fusaric acid, a hypotensive agent produced by fungi**; J Antibiot (Tokyo) 22, pp. 228-230;
- HIDY P.H., BALDWIN R.S., GREASHAM R.L., KEITH C.L. AND MCMULLAN J.R., (1977); **Zearalenone and some derivatives, production and biological activities**; Adv. Appl. Microbiol, 22, pp. 55-82;
- HIETANIEMI V., RAMO S., MANNINEN P., PARIKKA P., HANKOMAKI J., (2009); **The effect of cleaning and de-hulling on the trichothecene content in oats and barley**; EC *Fusarium* Toxin Forum, Bruxelles, 2009;
- HOPE R., ALDRED D., MAGAN N., (2005); **Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain**; Lett. Appl. Microbiol. 2005, 40, pp. 295-300;
- HOPMANS E.C., HAUCK C.C., HENDRICH S. AND MURPHY P.A., (1997); **Excretion of fumonisin Bi hydrolyzed fumonisin Bi and the fumonisin Bi-fructose adduct in rats**; J. of Agric. and Food Chem. 45, pp. 2618-2625;

- HÖRBERG H.M., (2002); **Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* and *Fusarium culmorum***; European Journal of Plant Pathology 108, pp. 73-80;
- HOWELL C.R., (2003); **Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts**; Plant Disease, Vol.87, No.1;
- HSIEH D.P.H., (1987); **Modes of action of mycotoxin**; In Mycotoxin in food, ed. P. Krogh. Accademie Press, London, pp. 149-176;
- HUANG C., HICKMAN M., HENDERSON G., JONES C., (1995); **Repression of Protein Kinase C and stimulation of cyclic AMP response elements by Fumonisin, a fungal encoded toxin which is a carcinogen**; Cancer Research 55, pp. 1655-1659;
- HUSSEIN S.H., BRASEL J.M., (2001); **Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals**; Toxicology, 167, pp. 101-134;
- IARC., (1993); **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**;; pp. 397-444;
- ICHINOUE M., KURATA H., SUGIURA Y., UENO Y., (1983); **Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone**; Applied and Environmental Microbiology, Vol.46, pp. 1364-1369;
- IMATHIU S., (2008); ***Fusarium langsethiae* infection and mycotoxin production in oats**; PhD Summary Report No. 8;
- INFANTINO A., PUCCI N., CONCA G., SANTORI A., (2007); **First Report of *Fusarium langsethiae* on Durum Wheat Kernels in Italy**; Plant disease, Vol.91, No10, pp. 1362;
- IVANOVA L., E. SKJERVE G. S. ERIKSEN & S. UHLIG., (2006); **Cytotoxicity of enniatins A, A₁, B, B₁, B₂ and B₃ from *Fusarium avenaceum***; Toxicon. 47, pp. 868-876;
- JAIME-GARCIA R., COTTY P.J., (2003); **Aflatoxin contamination in commercial cottonseed in South Texas**; Phytopathology, Vol.93, pp. 1190-1200;
- JAVED T., R. M. BUENTE M. A. DOMBRINKKURTZMAN J. L. RICHARD G. A. BENNET L. M. COTÉ & W. B. BUCK., (2005); **Comparative pathologic changes in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material on purified fumonisin B₁ and moniliformin**; Mycopathologia. 159, pp. 553-564;
- JECFA., (2002); **Evaluation of certain mycotoxins in food**; WHO technical report series 906, 56 report;
- JENKINSON P., PARRY D.W., (1994); **Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum***; Mycological Research 98, pp. 506-510;

- JESTOI M., (2008); **Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin a review**; Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48, pp. 21-49;
- JESTOI M. N., S. PAAVANEN-HUHTALA P. PARIKKA & T. YLI-MATTILA., (2008); **In vitro and in vivo mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains**; Arch. Phytopathol. Plant. Prot. 41, pp. 545-558;
- JESTOI M., M. ROKKA E. JÄRVENPÄÄ & K. PELTONEN., (2009); **Determination of *Fusarium* mycotoxins beauvericin and enniatins (A, A₁, B, B₁) in eggs of laying hens using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LCMS/ MS)**; Food Chem. 115, pp. 1120-1127;
- JONSSON M., JESTOI M., NATHANAIL A.V., KOKKONEN U. M., ANTTILA M., KOIVISTO P., KARHUNEN P., PELTONEN K., (2013); **Application of OECD guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin**; Food Chem. Toxicol. 53, pp. 27-32;
- JOUANY J. P., (2007); **Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds**; Animal Feed Science and Technology, 137, pp. 342-362;
- JOW G. M., CHOU C. J., CHEN B. F., E TSAI J. H., (2004); **Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: the causative role of calcium**; Cancer Lett., vol. 216, n. 2, pp. 165-173;
- JUN D. Y., J. S. KIM H. S. PARK W. S. SONG Y. S. BAE & Y. H. KIM., (2007); **Cytotoxicity of diacetoxyscirpenol is associated with apoptosis by activation of caspase-8 and interruption of cell cycle progression by down-regulation of cdk4 and cyclin B₁ in human Jurkat T cells**; Toxicol. Pharmacol. 222, pp. 190-201;
- JURADO M., MARÍN P., NARESH M. & GONZÁLEZ-JAÉN M. T., (2008); **Relationship between Solute and Matric Potential Stress, Temperature, Growth, and FUM1 Gene Expression in Two *Fusarium verticillioides* Strains from Spain**; Appl. Environ. Microbiol., Vol. 74, N° 7, pp. 2032-2036;
- JURADO M., VÁZQUEZ C., PATIÑO B., GONZÁLES-JAÉN M.T., (2005); **PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides***; Systematic and Applied Microbiology 28, pp. 562-568;
- KABAK B., (2009); **The fate of mycotoxins during thermal food processing**; Journal of the Science of Food and Agriculture International, Vol.84, No.4, pp. 549-555;
- KAMP H.G., TURESKY R., SCHLATTER J., EISENBRAND G., JANZOWSKI C., (2005); **Ochratoxin A: induction of oxidative DNA damage in primary rat tubular cells and in rats**; Arch. Pharmacol. 369, pp. R124-495;

- KAMYAR M., RAWNDUZI P., STUDENIK C. R., KOURI K., E LEMMENS-GRUBER R., (2004); **Investigation of the electrophysiological properties of enniatins**; Arch. Biochem. Biophys., vol. 429, n. 2, pp. 215-223;
- KAMYAR M. R., K. KOURI P. RAWNDUZI C. STUDENIK & R. LEMMENS-GRUBER., (2006); **Effects of moniliformin in presence of cyclohexadepsipeptides on isolated mammalian tissue and cells**; Toxicol. Vitro. 20, pp. 1284-1291;
- KANG Z., BUCHENAUER H., (2002); **Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue**; European Journal of Plant Pathology 108, pp. 653-660;
- KANG Z., BUCHENAUER H., (2000); **Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum***; Mycological Research, Vol.104, No.9, pp. 1083-1093;
- KING R.R., MCQUEEN R.E., LEVESQUE D., GREENHALGH R., (1984); **Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms**; J. Agric. Food Chem., 32, pp. 1181-1183;
- KLICH M.A., (2007); ***Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin**; Molecular Plant Pathology, Vol.8, No.6, pp. 713-722;
- KNASMÜLLER S., N. BRESGEN F. KASSIE V. MERSCH-SUNDERMANN W. GELDERBLOM E. ZÖHRER & P. M. ECKL., (1997); **Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins, fumonisin B₁, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes**; Mutat. Res. 391, pp. 39-48;
- KOKKONEN M., L. OJALA P. PARIKKA & M. JESTOI., (2010); **Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions**; Int. J. Food Microbiol. 143, pp. 17-25;
- KOLATTUKUDY P.E., (1980); **Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin**; Science, 208, pp. 990;
- KOLATTUKUDY P.E., (1985); **Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens**; Annu Rev Phytopathol, 23, pp. 223;
- KONGA E.B., SUTTON J.C., (1988); **Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues**; Can. J. Plant Pathol. Vol.10, pp. 232-239;
- KONIGS M., SCHWERDT G., GEKLE M., HUMPF H.U., (2008); **Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on human primary hepatocytes**; Molecular Nutrients and Food Research, Vol.52, pp. 830-839;

- KONSTANTINOVA P., YLI-MATTILA T., (2004); **IGS-RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense***; International Journal of Food Microbiology 95, pp. 321-331;
- KOURI K., M. LEMMENS & R. LEMMENS-GRUBER., (2003); **Beauvericin-induced channels in ventricular myocytes and liposomes**; Biochim. Biophys. Acta. 1609, pp. 203-210;
- KROGH P., (1974); **Mycotoxin nephropathy**; in Mycotoxins, Purchase, I.F.H., ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 419-428;
- KRŠKA R., BAUMGARTNER S., JOSEPHS R., (2001); **The state-of-the-art in the analysis of type-A and-B trichothecene mycotoxins in cereals**; Fresenius Journal of Analytical Chemistry, Vol.371, pp. 285-299;
- KRŠKA R., SCHUHMACHER R., GRASSERBAUER M., LEMMENS M., LEMMENS-GRUBER R., ADLER A., LEW H., (1997); **Effects of beauvericin to mammalian tissue and its production by Austrian isolates of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans***; Mycotoxin Res. 13, pp. 11-16;
- KUBICEK C.P., HARMAN G.E., (1998); ***Trichoderma* and *Gliocladium***; Vol. 1; Taylor and Francis, London;
- KUIPER-GOODMAM T., SCOTT P.M., WATANABE H., (1987); **Risk assessment of the mycotoxin zearalenone**; Regul Toxicol Pharmacol. 7, pp. 253-306;
- LAMPRECHT S. C., W. F. O. MARASAS E. W. SYDENHAM P. G. THIEL P. S. KNOXDAVIES & P. S. VAN WYK., (1989); **Toxicity to plants and animals of an undescribed, neosolaniol monoacetateproducing *Fusarium* species from soil**; Plant Soil. 114, pp. 75-83;
- LANGSETH W., RUNDBERGET T., (1999); **The occurrence of HT-2 toxin and others trichothecenes in Norwegian cereals**; Mycopathologia 147, pp. 157-165;
- LAUTRAITE S., B. RIO J. GUINARD & D. PARENTMASSIN., (1997); **In vitro effects of diacetoxyscirpenol (DAS) on human and rat granulo-monocytic progenitors**; Mycopathologia. 140, pp. 59-64;
- LEESON S., GONZALO J.D.G., SUMMERS J.D., (1995); **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**; University Books, Guelph, Ontario, Canada;
- LEONARD K.J., BUSHNELL W.R., (2003); ***Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley**; APS Press, St. Paul, MN, USA;
- LESLIE J.F., SUMMERELL B.A., (2006); **The *Fusarium* Laboratory Manual**; Blackwell, Oxford, UK;

- LIU W., SUNDHEIM L., LANGSETH W., (1998); **Trichothecene production and the relationship to vegetative compatibility groups in *Fusarium poae***; Mycopathologia 140, pp. 105-114;
- LOGRIECO A., A. MORETTI A. RITIENI J. CHELKOWSKI C. ALTOMARE A. BOTTALICO, AND G. RANDAZZO., (1993); **Natural occurrence of beauvericin in preharvest *Fusarium subglutinans* infected corn ears in Poland**; J. Agric. Food Chem. 41, pp. 2149-2152;
- LOGRIECO A., MORETTI A., FORNELLI F., FOGLIANO V., RITIENI A., CAIAFFA M., ET AL., (1996); **Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, SF-9 insect cells, and IARC/LCL 171 human B-lymphocytes**; Applied Environment Microbiology, 62, pp. 3378-3784;
- LOGRIECO A., MULÈ, G., MORETTI A., & BOTTALICO A., (2002); **Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe**; European Journal of Plant Pathology, 108, pp. 597-609;
- LORITO M., (1998); **Chitinolytic enzymes and their genes**; In *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications, Taylor and Francis, London, pp. 73-99;
- MAGG T., BOHN M., KLEIN D., MERDITAJ V., MELCHINGER A.E., (2003); **Concentration of moniliformin produced by *Fusarium* species in grains of transgenic Bt maize hybrids compared to their isogenic counterparts and commercial varieties under European maize borer pressure**; Plant Breed. 122, pp. 322-327;
- MAHNINE N., G. MECA A. ELABIDI M. FERHAOUI A. SAOIABI G. FONT J. MAÑES & A. ZINEDINE., (2011); **Further data on the levels of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins (A, A₁, B, B₁), beauvericin and fusaproliferin in breakfast and infant cereals from Morocco**; Food Chem. 124, pp. 481-485;
- MAIORANO A., REYNERI A., MAFFIOLI G. AND RAMPONI C., (2007); **Stima del "rischio fumonisine" nella granella di mais**; L'Informatore Agrario, 7, pp. 52-57;
- MALEKINEJAD H., MASS-BAKKER R.F., FINK-GREMMELS J., (2005); **Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation**; Veterinary Research, 36, pp. 799-810;
- MARASAS W. E NELSON P., (1987); **Mycotoxicology: introduction to the mycology, plant pathology, chemistry, toxicology, and pathology of naturally occurring mycotoxins in animals and man**; Pennsylvania State University Press;
- MARASAS W.F.O., NELSON P.E., TOUSSOUN T.A. (EDS.), (1984); **Toxigenic *Fusarium* species, identity and mycotoxicology**; The Pennsylvania State University Press, University Park Pennsylvania, pp. 328;
- MARIJANOVIC ET AL., (1991); in WHO www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm;

- MARIN S., COMPANYS R., SANCHIS V., RAMOS A.J., MAGAN N., (1998); **Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi**; Mycological Research, Vol.120, No.8, pp. 959-964;
- MARQUARDT R.R., AND FRÖHLICH A.A., (1992); **A review of recent advances in understanding ochratoxigenesis**; J. Anim. Sei. 70, pp. 3968-3988;
- MARSH S.F., PAYNE G.A., (1984); **Preharvest Infection of Corn Silks e Kernels by *Aspergillus flavus***; Phytopathology, Vol.74, No.11, pp. 1284-1289;
- MARZOCCO S., R. RUSSO G. BIANCO G. AUTORE & L. SEVERINO., (2009); **Proapoptotic effects of nivalenol and deoxynivalenol trichothecenes in J774A.1 murine macrophages**; Toxicol. Lett. 189, pp. 21-26;
- MAZZONI E., SCANDOLARA A., GIORNI P., PIETRI A., BATTILANI P., (2011); **Field control of *Fusarium* ear rot, *Ostrinia nubilalis* (Hubner), and fumonisins in maize kernels**; Pest Management Science, Vol.67, pp. 458-465;
- MECA G., A. ZINEDINE J. BLESÁ G. FONT & J. MAÑES., (2010b); **Further data on the presence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on the Spanish markets**; Food Chem. Toxicol. 48, pp. 1412-1416;
- MECA G., G. FONT & M. J. RUIZ., (2011); **Comparative cytotoxicity study of enniatins A, A₁, A₂, B, B₁, B₄ and J₃ on Caco-2 cells, Hep-G2 and HT-29**; Food Chem. Toxicol. 49, pp. 2464-2469;
- MECA G., J. M. SORIANO A. GASPARI A. RITIENI A. MORETTI & J. MAÑES., (2010a); **Antifungal effects of the bioactive compounds enniatins A, A₁, B, B₁**; Toxicon. 56, pp. 480-485;
- MEDINA A., F. M. VALLE-ALGARRA M. JIMÉNEZ & N. MAGAN., (2010); **Different sample treatment approaches for the analysis of T-2 and HT-2 toxins from oats-based media**; J. Chromatogr. B. 878, pp. 2145-2149;
- MENCARELLI M., ACCINELLI C., VICARI A., (2012); **Implications of European Corn Borer infestation in a *Aspergillus flavus* biocontrolled corn**; Pest and disease management, online die. 2012;
- MENTEWAB A., REZANOOR H.N., GOSMAN N., WORLAND A.J., NICHOLSON P., (2000); **Chromosomal location of *Fusarium* head blight resistance genes and analysis of the relationship between resistance head blight and brown foot rot**; Plant Breeding, Vol.119, pp. 15-20;
- MERRILL A.H., SCHMELZ E.M., DILLEHAY D.L., (1997); **Sphingolipids-the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology**; In Toxicol. Appi. Pharmacol, 142, pp. 208-225;

- MERRILL A.H., SULLARDS M.C., WANG E., VOSS K.A., RILEY R.T., (2001); **Sphingolipid Metabolism: Roles in Signal Transduction and Disruption by Fumonisin**; Environmental Health Perspectives; Vol.109, No.2;
- MILLER J.D., (1995); **Fungi and mycotoxins in grain: implication for stored product research**; Journal of Stored Products Research, 31, pp. 1-16;
- MIROCHA C.J., PATHRE S.V., CHRISTENSEN C.M., (1977); **Zearalenone**; In: Rodricks J.V., Hesselstine C.W., Mehlman, M.A. (Eds), Mycotoxin in Human and Animal Health. Pathox Pub, Park Forest South, IL, pp. 345-364;
- MIROCHA C.J., PATHRE S.V., ROBINSON T.S., (1981); **Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk**; Food and cosmetics Toxicology. 19, pp. 25-30;
- MIURA K., Y. NAKAJIMA N. YAMANAKA K. TERAOKA T. SHIBATO & S. ISHINO., (1998); **Induction of apoptosis with fusarenon-X in mouse thymocytes**; Toxicology. 127, pp. 195-206;
- MORETTI A., LOGRIECO A., BOTTALICO A., (2006); **Micotossine nella filiera cerealicola**; Informatore Fitopatologico, 2, pp. 7-13;
- MORETTI A., A. LOGRIECO A. BOTTALICO A. RITIENI G. RANDAZZO, AND P. CORDA., (1995); **Beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas**; Mycol. Res. 99, pp. 282-286;
- MORETTI A., A. LOGRIECO A. BOTTALICO A. RITIENI V. FOGLIANO, AND G. RANDAZZO., (1997); **Diversity in beauvericin and fusaproliferin production by different populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*)**; Sydowia 48, pp. 44-56;
- MORETTI A., MULÉ, G., RITIENI A., LÁDAY M., STUBNYA V., HORNOK L., & LOGRIECO A., (2008); **Cryptic subspecies and beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from Europe**; International Journal of Food Microbiology, 127, pp. 312-315;
- MOSCA G., (2006); **Gestione del rischio micotossine nella filiera produttiva del mais**; In: mais e sicurezza alimentare. Veneto agricoltura, pp. 30-34;
- MOSCHINI M., GALLO A., PIVA G., MASOERO F., (2008); **The effects of rumen fluid on the in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and in vivo release of the sequestered toxin**; Anim. Feed Sci. Technol;
- MULLER H.M., REIMANN J., SCHUMACHER U., SCHWADORF K., (1998); **Natural occurrence of *Fusarium* toxins in oats harvested during five years in an area of southwest Germany**; Food and Additives Contaminants 15, pp. 801-806;
- MUNKVOLD G. P., (2003); **Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears**; European Journal of Plant Pathology, 109, pp. 705-713;

- MUNKVOLD G., STAHR H. M., LOGRIECO A., MORETTI A., RITIENI A., (1998); **Occurrence of fusaproliferin and beauvericin in *Fusarium* contaminated livestock feed in Iowa**; Appl. Environ. Microbiol. 64, pp. 3923-3926;
- NADUBINSKÁ, M., RITIENI A., MORETTI A., & ŠROBÁROVÁ, A., (2003); **Chlorophyll content in maize plants after treatment with fusariotoxins**; Biologia Bratislava, 58, pp. 115-119;
- NAGASHIMA H., H. NAKAGAWA & K. IWASHITA., (2006); **Cytotoxic effects of nivalenol on HL60 cells**; Mycotoxins. 56, pp. 65-70;
- NELSON L. D., COX M.M., (2003); **Introduzione alla biochimica**; di Lehninger 3a ediz., Zanichelli Editore;
- NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., COOK R.J., (1981); ***Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy***; Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA;
- NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., MARASAS W.F.O., (1983); ***Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification***; Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA;
- NESCI A.V., BLUMA R.V., ETCHEVERRY M.G., (2005); **In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production**; Eur. J. Plant Pathol., 113(2), pp. 159-171;
- NGANJE W.E., BANGSUND D.A., LEISTRITZ F.L., WILSON W.W., TIAPO N.M., (2002); **Estimating the economic impact of a crop disease: the case of *Fusarium* head blight in U.S. wheat and barley**; National *Fusarium* Head Blight Forum Proceedings 2002, pp. 275-281;
- NIELSEN J.K.S., VIKSTRØM A.C., TURNER P., KNUDSEN L.E., (2011); **Deoxynivalenol transport across the human placental barrier**; Food and Chemical Toxicology Vol.49, pp. 2046-2052;
- NORRED W.P., BACON C.W., PORTER J.K. AND VOSS K.A., (1990); **Inhibition of protein synthesis in rat primary hepatocytes by extracts of *Fusarium moniliforme* contaminated corn**; Food Chem. Toxicol. 28, pp. 89-94;
- O'BRIAN G.R., GEORGIANNA D.R., WILKINSON J.R., YU J., ABBAS H.K., BHATNAGAR D., CLEVELAND T.E., NYERMAN W., PAYNE G.A., (2007); **The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis**; Mycologia, Vol.99, No.2, pp. 232-239;
- OBRECHT-PFLUMIO S AND DIRHEIMER G., (2000); **In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A**; Chmico-Biological Interactions. 127, pp. 29-44;
- OJCIOUS D.M., ZYCHLINSKY A., ZHENG L.M., YOUNG J.D., (1991); **Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes**; Experimental Cell Research 197, pp. 43-49;

- OMURTAG G. Z., A. TOZAN O. SIRKECIOGLU , V. KUMBARACI, & S. ROLLAS., (2007); **Ocurrence of diacetoxyscirpenol (anguidine) in processed cereals and pulses in Turkey by HPLC**; Food Control. 18, pp. 970-974;
- OUESLATI S., MECA G., MLIKI A., GHORBEL A., MAÑES J., (2011); **Determination of *Fusarium* mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia**; Food Control, 22, pp. 1373-1377;
- OZBAI N., NEWMAN S., (2004); **Biological control with *Trichoderma spp.* with emphasis on *T. harzianunr***; Pakistan journal of Biological Sciences Vol.7, No.4, pp. 478-484;
- PALUMBO J.D., BAKER J.L., MAHONEY N.E., (2006); **Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds**; Microb. Ecol., 52(1), pp. 45-52;
- PAPST C., UTZ H.F., MELCHINGER A.E., EDER J., MAGG T., KLEIN D., BOHN M., (2005); **Mycotoxins produced by *Fusarium spp.* in Isogenic Bt vs. non-Bt maize hybrids under European maize borer pressure**; Agron. J. 97, pp. 219-224;
- PARIKKA P., HIETANIEMI V., RÄMÖ S., JALLI H., (2007); **The effect of cultivation practices on *Fusarium langsethiae* infection of oats and barley**; Proceedings of the COST SUSVAR *Fusarium* workshop: *Fusarium* diseases in cereals - potential impact from sustainable cropping systems, pp. 15-18;
- PARK D.L., (2002); **Effect of Processing on Aflatoxin**; Mycotoxins and Food Safety, Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol.504, pp. 173-179;
- PARRY D.W., JENKINSON P., MCLEOD L., (1995); ***Fusarium* ear blight (scab) in small grains cereals: a review**; Plant Pathology 44, pp. 207-238;
- PARRY D.W., NICHOLSON P., (1996); **Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat**; Plant Pathology 45, pp. 383-391;
- PASTER N., PUSHINSKY A., MENASHEROV M., CHET H., (1992); **Inibitory effect of *Aspergillus niger* on the growth of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus flavus*, and on aflatoxin formation**; Journal of the Science of Food and Agriculture, 58, pp. 589-591;
- PATEY A.L., GILBERT J., (1989); **Fate of *Fusarium* mycotoxins in cereals during food processing and methods for their detoxification**; In Chenkowski J., ed., *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*, Amsterdam: Elsevier, pp. 399-420;
- PATTERSON D.S.P., GLANCY E.M., ROBERTS B.A., (1980); **The 'carry over' of aflatoxin into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁**; Food and Cosmetics Toxicology Vol. 18, No.1, pp. 35-37;
- PAUL P.A., LIPPS P.E., HERSHMAN D.E., MCMULLEN M.P., DRAPER M.A., MADDEN L.V., (2008); **Efficacy of triazole-based fungicides for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol control in wheat: A multivariate meta-analysis**; Phytopathology, Vol.98, pp. 999-1011;

- PAUL P.A., MCMULLEN M.P., HERSHMAN D.E., MADDEN L.V., (2010); **Meta-analysis of the effects of triazole-based fungicides on wheat yield and test weight as influenced by *Fusarium* head blight intensity**; *Phytopathology*, Vol.100, pp. 160-171;
- PAYNE G.A., CASSEL D.K., ADKINS C.R., (1986); **Reduction of aflatoxin contamination in corn by irrigation and tillage**; *Phytopathology*, Vol.76, No.7, pp. 679-685;
- PELTONEN K., JESTOI M., ERIKSEN G., (2010); **Health effects of moniliformin: a poorly understood *Fusarium* mycotoxin**; *World Mycotoxin J.* , 3, pp. 403-414;
- PERAICA M., DOMIJAN A. M., (2001); **Contamination of Food with Mycotoxins and Human Health**; *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, Vol.52, pp. 23-35;
- PEREYRA S.A., DILL-MACKY R., SIMS A.L., (2004); **Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue**; *Plant Disease*, Vol.88, pp. 724-730;
- PERRONE G., SUSCA A., COZZI G., EHRLICH K., VARGA J., FRISVAD J.C., MEIJER M., NOONIM P., MAHAKARNCHANAKUL W., SAMSON W.A., (2007); **Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products**; *Studies in Mycology* Vol.59, pp. 53-66;
- PETTERSSON H., HEDMAN R., ENGSTRØM B., ELWINGER K., FOSSUM O., (1995); **Nivalenol in Swedish cereals: occurrence, production and toxicity toward chickens**; *Food Additives and Contaminants* 12, pp. 373-376;
- PETTERSSON H., (2009); **T-2 and HT-2 toxins in oats and oat products. Update from CEEREAL on the status of the research activities of the European oat milling industry**; *EC Fusarium Toxin Forum*, Bruxelles;
- PIETRI A., (2001); **Contaminazione di alimenti da aflatossine: risultati dello studio, aspetti pratici e proposte di controllo**; In: *Aflatossine nel latte e negli alimenti zootecnici: metodiche analitiche e anamnesi di allevamento. Progetto regionale: Ricerca dei determinanti la qualità del latte per l'applicazione del Reg. CE 1525 del 16 luglio 1998. Palazzo della regione Lombardia, 7 maggio 2001*, pp. 59-71;
- PIETRI A., (1998); **Micotossine la situazione odierna in Italia**; *Rivista di avicoltura*; (1/2), pp. 32-38;
- PIETRI A., BARNABUCCI U., REYNERI A., VISCONTI A., (2004); **Come prevenire le aflatossine nel latte**; *L'Informatore Agrario*, 14, pp. 49-50;
- PIETRI A., BERTUZZI T., PALLARONI L., PIVA G., (2001); **Occurrence of ochratoxin A in Italian wines**; *Foods Additives and Contaminants*, 18, pp. 647-654;
- PINTO S. R. C., AZEVEDO J. L., PEREIRA J. O., VIEIRA M. L. C., & LABATE C. A., (2000); **Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency**; *New Phytologist*, 147, pp. 609-615;

- PINTOS VARELA C., AGUÍN CASAL O., CHAVES PADIN M., FERREIROA MARTINEZ V., SAINZ OSES M. J., SCAUFLAIRE J., MUNAUT F., BANDE CASTRO M. J., MANSILLA VÁZQUEZ J. P., (2013); **First Report of *Fusarium temperatum* Causing Seedling Blight and Stalk Rot on Maize in Spain**; The American Phytopathological Society – Volume 97, Number 9, pp. 1252;
- PITEL DW, VINING LC., (1970); **Accumulation of dehydrofusaric acid and its conversion to fusaric and 10-hydroxyfusaric acids in cultures of *Gibberella fujikuroi***; Can J Biochem 48, pp. 623-630;
- PITT J. I., (2000); **Toxigenic fungi and mycotoxins**; Br Med Bull 56, pp. 184;
- PLACINTA C. M., D’MELLO J. P. F., & MACDONALD A. M. C., (1999); **A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins**; Animal Feed Science and Technology, 78, pp. 21-37;
- POAPOLATHEP A., S. POAPOLATHEP Y. SUGITAKONISHI K. IMSILP T. TASSANAWAT C. SINTHUSING Y. ITOH & S. KUMAGAIS., (2008); **Fate of Fusarenon-X in broilers and ducks**; Poultry Sci. 87, pp. 1510-1515;
- POAPOLATHEP A., Y. SUGITA-KONISHI K. DOI & S. KUMAGAI., (2003); **The fates of trichothecene mycotoxins, nivalenol and fusarenon-X, in mice**; Toxicon. 41, pp. 1047-1054;
- POMPA G., (1994); **Aflatoxine**; Tossicologia Veterinaria C. Beretta ed. Casa editrice Ambrosiana, Milano, Italy, pp. 360-365;
- PONTS N., COUEDELO L., PINSON-GADAIS L., VERDAL-BONNIN M.-N., BARREAU C. & RICHARD-FORGET F., (2009); ***Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent**; FEMS Microbiology Letters, Vol. 293, Issue 2, pp. 255–262;
- PONTS N., PINSON-GADAIS L., VERDAL-BONNIN M.-N., BARREAU C. & RICHARD-FORGET F., (2006); **Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum***; FEMS Microbiology Letters, Vol. 258, Issue 1, pp. 102–107;
- PORTER JK, BACON CW, WRAY EM, HAGLER WM JR., (1995); **Fusaric acid in *Fusarium moniliforme* cultures, corn, and feeds toxic to livestock and the neurochemical effects in the brain and pineal gland of rats**; Nat Toxins 3, pp. 91-100;
- PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L., ROTTER B.A., MILLER J.D., SAVARD M.E., YEUNG J.M. AND SCOTT P.M., (1996b); **Biological fate of fumonisin Bt in food-producing animals**; Advances in Exp. Med. and Biol. 392, pp. 265-278;
- RAMAUTAR A, MABANDLA M, BLACKBURN J, DANIELS WMU., (2012); **Inhibition of HIV-1 tat-induced transactivation and apoptosis by the divalent metal chelators, fusaric acid and picolinic acid-implications for HIV-1 dementia**; Neurosci Res 74, pp. 59-63;

- RASMUSSEN R.R., I. M. L. D. STORM O. H. RASMUSSEN J. SMEDSGAARD & K. F. NIELSEN., (2010); **Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS**; Anal. Bioanal. Chem. 397, pp. 765-776;
- RAZZAZI-FAZELI E., BOHM J., JARUKAMJORN K., ZENTEK J., (2003); **Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry**; J. of Chromatography B 796, pp. 21-23;
- REYNERI A., (2005); **La diffusione delle micotossine nelle produzioni italiane di mais**; L'Informatore Agrario(10), pp. 47-51;
- REYNERI A., (2006); **The Role of Climatic Condition on Micotoxin Production in Cereal**; Veterinary Research Communications, Vol.30, No.1, pp. 87-92;
- RHEEDER J. P., MARASAS W. F. O., & VISMER H. F., (2002); **Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species**; Applied and Environmental Microbiology, 68, pp. 2101-2105;
- RICE L.G. AND ROSS P.F., (1994); **Methods for detection and quantification of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta**; J. of Food Prot. 57, pp. 536-540;
- RICHARDSON M., (1991); **Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Methods in plant biochemistry V 5: amino acids, proteins and nucleic acids**; Dey P.M. & Harborne J.B. (eds), Academic Press, London, pp. 259-305;
- RITIENI A., MORETTI A., LOGRIECO A., BOTTALICO A., RANDAZZO G., MONTI S. M., FERRACANE R., FOGLIANO V., (1997); **Occurrence of fusaproliferin, fumonisin B₁, and beauvericin in maize from Italy**; J. Agric. Food Chem., 45, pp. 4011-4016;
- ROHÁCIK T., HUDEC K., (2005); **Influence of agro-environmental factors on *Fusarium* infestation and population structure in wheat kernels**; Annals of Agricultural and Environmental Medicine 12, pp. 39-45;
- ROSSI V., LANGUASCO L., PATTORI E., GIOSUÉ S., (2002); **Dynamics of airborne *Fusarium* macroconidia in wheat fields naturally affected by head blight**; Journal of Plant Pathology 84, pp. 53-64;
- ROTTER B.A., PRELUSKY D.B., PESTKA J.J., (1996); **Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)**; Journal of Toxicology and Environmental Health 48, pp. 1-34;
- RYALS J.A., NEUENSCHWANDER U.H., WILLITS M.G., MOLINA A., STEINER H. Y., HUNT M.D., (1996); **Systemic Acquired Resistance**; The Plant Cell, Vol.8, pp. 1809-1819;
- S. UHLIG & G. S. ERIKSEN, IVANOVA L., E. SKJERVE., (2006); **Cytotoxicity of enniatins A, A₁, B, B₁, B₂ and B₃ from *Fusarium avenaceum***; Toxicon. 47, pp. 868-876;

- SALAS B., STEFFENSON B.J., CASPER H.H., TACKE B., PROM L.K., FETCH T.G., SCHWARZ P.B., (1999); ***Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins**; Plant Disease 83, pp. 667-674;
- SAMUELS G.J., (1996); ***Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus**; Mycological research, Vol.100, No.8, pp. 923-935;
- SANHUEZA C.E.P., DEGROSSI M.C., (2004); **Moniliformin, a *Fusarium* mycotoxin**; Revista Mexicana de Micologia 19, pp. 103-112;
- SANTINI A., RITIENI A., FOGLIANO V., RANDAZZO G., MANNINA L., LOGRIECO A. ET AL., (1996); **Structure and absolute stereochemistry of fusaproliferin, a toxic metabolite from *Fusarium proliferatum***; Journal of Natural Production, 59, pp. 109-112;
- SAREMI H., BURGESS L.W., BACKHOUSE D., (1999); **Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem**; Soil Biology and Biochemistry 31, pp. 941-947;
- SARGEANT K.C.R.B.A.A.R., (1963); **Chemistry and origin of aflatoxins**; In Chemical Ind. London, pp. 53-55;
- SCARPINO V., BLANDINO M., NEGRE M., REYNERI A., VANARA F., (2013); **Moniliformin analysis in maize samples from North-West Italy using multifunctional clean-up columns and the LC-MS/MS detection method**; Food Addit. Contam. A 30 (5), pp. 876-884;
- SCAUFLAIRE J., GOURGUE M., CALLEBAUT A., MUNAUT F., (2012); ***Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize**; Eur. J. Plant. Pathol. 133, pp. 911-922;
- SCAUFLAIRE J., GOURGUE M., MUNAUT F., (2011); ***Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans***; Mycologia 103, pp. 586-597;
- SCAUFLAIRE J., MAHIEU O., LOUVIEAUX J., FOUCART G., RENARD F., & MUNAUT F., (2011b); **Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium**; European Journal of Plant Pathology, 131, pp. 59-66;
- SCHEIDEGGER K.A., PAYNE G.A., (2003); **Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics**; In J. Toxicol.-Toxin. Rev, 22, pp. 423-459;
- SCHNEPF E., CRICKMORE N., VAN RIE J., LERECLUS D., BAUM J., FEITELSON J., ZEIGLER D.R., DEAN D.H., (1998); ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins**; Microbiol Mol Biol Rev 62(3), pp. 775-806;
- SCHOLLENBERGER M., H. M. MÜLLER, M. RÜFLE, S. SUCHY, S. PLANK & W. DROCHNER, (2006); **Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany**; Mycopathologia. 161, pp. 43-52;

- SCHROEDER H.W., CHRISTENSEN J.J., (1963); **Factors affecting resistance of wheat scab caused by *Gibberella zeae***; *Phytopathology* 53, pp. 831-838;
- SCOTT P.M., LAWRENCE G.A., (1994); **Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods**; *Journal of AOAC International*, Vol.77, pp. 541-545;
- SCUDAMORE K.A., PATEL S., (2000); **Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom**; *Food Additives and Contaminants* 15, pp. 30-55;
- SCUDELLARI D., MAROCCO A., REGGIANI R., POLI M., CARNEVALI G., (2007); **Concimazione, gli effetti dell'azoto e del potassio**; In: *Mais: il rischio micotossine*. Agricoltura, marzo 2007, pp. 126-129;
- SHARMA P., (2007); **Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control**; *Australian Journal of Crop Science*; Vol.5, No.8, pp. 1027-1038;
- SHARMA D., R. K. ASRANI, D. R. LEDOUX, N. JINDAL, G. E. ROTTINGHAUS & V. K. GUPTA, (2008); **Individual and combined effects of Fumonisin B₁ and Moniliformin on clinicopathological and cell-mediated immune response in Japanese quail**; *Poultry Sci.* 87, pp. 1039-1051;
- SHEPHARD G. S., SEWRAM V., NIEUWOUDT T. W., MARASAS W. F. O., & RITIENI A., (1999); **Production of the mycotoxins fusaproliferin and beauvericin by South African isolates in the *Fusarium* section *Liseola***; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp. 5111-5115;
- SHORESH M., HARMAN G.E., MASTOURI F., (2010); **Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents**; *Annual Reviews of Phytopathology*, Vol.48, pp. 21-43;
- SHREEVE B.J., PATTERSON DS. P., ROBERTS B.A., (1979); **The 'carry-over' of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows**; *Food and Cosmetics Toxicology*, Vol.17, No.2, pp. 151-152;
- SIGA INTA., (2014); **Sistema de información y gestión agrometeorológico**; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina (INTA) (2014) (Available at <http://siga2.inta.gov.ar/>);
- SINGH R.S., TIWARY A.K., BHARI R., (2008); **Screening of *Aspergillus* species for occurrence of lectins and their characterization**; *Journal of Basic Microbiology*, Vol.48, pp. 112-117;
- SMITH J.C., WESSELINK C., PARR J.M., SPROSEN J.M., FOWKE E.A., TOWERS N.R. AND LABOYRIE D., (1995); **Effect of Zearalenone on ewe pregnancy rates**; In: *Toxicology and Food Safety*. Toxicology and Food Safety Research Group. Ruakura Research Center, Hamilton, New Zealand, pp. 41-43;
- SMITH J.E., MOSS M.O., (1985); **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**; John Wiley and Sons, Chichester, pp. 36-41;

- SNIJDERS C.H.A., PERKOWSKI J., (1990); **Effects of Head Blight Caused by *Fusarium culmorum* on Toxin Content and Weight of Wheat Kernels**; *Phytopathology* Vol.80, No.6, pp. 566-570;
- SNYDER W.C., NASH S.M., (1968); **Relative incidence of *Fusarium* pathogens of cereals in rotation plots at Rothamsted**; *Transactions of the British Mycological Society* 51, pp. 417-425;
- SOBROVA P., ADAM V., VASATKOVA A, BEKLOVA M., ZEMAN L., KIZEK R., (2010); **Deoxynivalenol and its Toxicity**; *Interdisciplinary Toxicology*, Vol.3, No.3, pp. 94-99;
- SOMMA S., C. ALVAREZ, V. RICCI, L. FERRACANE, A. RITIENI, A. LOGRIECO & A. MORETTI, (2010); **Trichothecene and beauvericin mycotoxin production and genetic variability in *Fusarium poae* isolated from wheat kernels from northern Italy**; *Food Addit. Contam.* 27, pp. 729-737;
- SONG J.J., YEE N.K., (2001); **A concise synthesis of fusaric acid and (S)-(+)-fusarinolic acid**; *J Org Chem* 66, pp. 605-608;
- SORENSEN J.L., K. F. NIELSEN P. H. RASMUSSEN & U. THRANE., (2008); **Development of a LCMS/ MS method for the analysis of enniatins and beauvericin in whole fresh and ensiled maize**; *J. Agri. Food Chem.* 56, pp. 10439-10443;
- SOSTANE B E VUKELIC M., (1991); **Characteristics of urinary tract tumors in the area of Balkan endemic nephropathy in Croatia**; In *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*. IARC Scientific Publications no. 115, Bartsch, Editors, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 29-65;
- SPOLTI P., DE JORGE B.C., DEL PONTE E.M., (2012); **Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides**; *Tropical Plant Pathology*, Vol.37, No.6, pp. 419-423;
- SPOTTI M., POMPA G. AND CALONI F., (2001); **Fumonisin B₁ metabolism by bovine liver microsomes**; *Vet. Res. Com.* 25, pp. 511-516;
- SPROSEN J.M., E TOWERS N.R., (1995); **Urinary zearalenone metabolite concentration in herds with fertility problems**; In: *Toxicology and Food Safety*. Toxicology and Food Safety Research Group. Ruakura Research Center, Hamilton, New Zealand, pp. 45-46;
- SROBAROVA A., MORETTI A., FERRACANE R., RITIENI A., LOGRIECO A., (2002); **Toxigenic *Fusarium* species of *Liseola* section in pre-harvest maize ear rot, and associated mycotoxins in Slovakia**; *Eur. J. Plant Pathol.*, 108, pp. 299-306;
- STENGLEIN S. A., (2009); ***Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention**; *J Plant Pathol.* 91, pp. 25-36;

- STEYN P.S., (1971); **Ochratoxin and other dihydroisocoumarins**; In Microbial Toxin: Fungal Toxins (A. Cielger, S. Kadis, and S.J. Ajl, Eds), Academic Press, New York. Vol. V, pp. 179-205;
- STEYN P.S., (1984); **Ochratoxin and other dihydroisocoumarins**; In Mycotoxin- Production, Isolation, Separation and Purification (V. Betaina, Ed), Elsevier Amsterdam, pp. 183-216;
- STEYN M., THIEL P. G., VAN SCHALKWYK G. C., (1978); **Isolation and purification of moniliformin**; J.-Assoc. Off. Anal. Chem., 61, pp. 578-580;
- STOLL C., (1954); **Über Stoffwechsel und biologisch wirksame Stoffe von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll**; dem Erreger der Bakanaekrankheit. Phytopathol Z 22, pp. 233-274;
- SUDAKIN D.L., (2003); **Trichothecenes in the environment: relevance to human health**; Toxicology letters, 143, pp. 97-107;
- SUGIURA Y., FUKASAKU K., TANAKA T., MATSUI Y., UENO Y., (1993); ***Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, fungi responsible for the natural occurrence of nivalenol in Hokkaido**; Applied and Environmental Microbiology 59, pp. 3334-3338;
- SWEENEY M.J., DOBSON A.D.W., (1999); **Molecular biology of mycotoxin biosynthesis**; FEMS Microbiology Letters, Vol. 175, pp. 149-163;
- SYDENHAM E.W., VAN DER WESTHUIZEN L., STOCKENSTROM S., SHEPHARD G.S., THIEL P.G., (1994); **Fumonisin-contaminated maize: physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments**; Journal of Food Additives Contaminants, Vol.11, pp. 25-32;
- SZÓKE C., ZSUBORI Z., PÓK I., RÁCZ F., ILLÉS O., SZEGEDI I., (2002); **Significance of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hóbn.) in maize production**; Acta Agronomica Hungarica 50, pp. 447-461;
- TEREJ J., VARGA J., KEVEI E., RINYU E., KOZAKIEWICZ Z., (1996); **Ochratoxin production by *Aspergillus* species**; Applied and Environmental Microbiology, 62, pp. 4461-4464;
- THIEL P.G., SHEPHARD G.S., SYDENHAM E.W., MARASAS W.F.O., NELSON P.E., WILSON T.M., (1991); **Levels of fumonisins B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia**; J. Agric. Food Chem. 39, pp. 109-111;
- THRANE U., A. ADLER P. E. CLASEN F. GALVANO W. LANGSETH H. LEW A. LOGRIECO K. F. NIELSEN & A. RITIENI., (2004); **Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides***; Int. J. Food Microbiol. 95, pp. 257-266;
- TOMEJ J.F.C., VAN DER WERF T.S., (2001); **Pulmonary aspergillosis**; The Netherlands Journal of Medicine; Vol.59, pp. 244-258;

- TONSHIN A. A., V. V. TEPLOVA M. A. ANDERSSON & M. S. SALKINOJA-SALONEN., (2010); **The *Fusarium* mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidate phosphorylation and ion homeostasis**; *Toxicol.* 276, pp. 49-57;
- TORELLI E., (2005); **Mais, funghi e micotossine: stato dell'arte**; Atti del Convegno ERSA, Filiere di qualità di mais, soia e frumento: sicurezza alimentare rispetto a micotossine, OGM e tracciabilità delle produzioni; Università di Udine;
- TORP M., LANGSETH W., (1999); **Production of T-2 toxin by a *Fusarium* resembling *Fusarium poae***; *Mycopathologia* 147, pp. 89-96;
- TORP M. & H. I. NIRENBERG., (2004); ***Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe**; *Int. J. Food Microbiol.* 95, pp. 247-256;
- TORRES A., RAMOS A.J., SOLER J., SANCHIS V., MARIN S., (2003); **SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain**; *International Journal of Food Microbiology*, Vol.81, pp. 185-193;
- TORRES A., REYNOSO M. M., ROJO F., RAMÍREZ M. L., CHULZE S., (2001); **Fungal and mycotoxin contamination in home grown maize harvested in the north area of Argentina**; *Food Addit. Contam.*, 18, pp. 836-843;
- TRAIL F., XU H., LORANGER R., GADOURY D., (2002); **Physiological and Environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*)**; *Mycologia* Vol.94, No.2, pp. 181-189;
- TRENHOLM H.L., FRIEND D.W., HAMILTON R.M.G., THOMPSON B.K., MARTIN K.E., (1986); **Incedence and toxicology of deoxynivalenol as an emerging mycotoxin problem**; In: Proc. VI International Coni. On the mycoses. Pan American Health Organization, Washington, DC;
- TRUCKSESS M.W., STOLOFF L.F., YOUNG K., WYATT R.D., MILLER B.L., (1983); **Aflatoxicology and Aflatoxins B₁ and M₁ in Eggs and Tissues of Laying Hens Consuming Aflatoxin-Contaminated Feed**; *Poultry Science*, Vol. 62, No.11, pp. 2176-2182;
- TURNER W.B., ALDERIDGE D.C., (1983); **Fungal Metabolites II**; Academic Press, London, UK;
- UHLIG S., TORP M., JARP J., PARICH A., KRŠKA R., (2004); **Moniliformin in Norwegian grain**; *Food Addit. Contam.*, 21, pp. 598-606;
- VAN DER FELS-KLERX H.J., STRATAKOU I., (2010); **T-2 toxin and HT-2 toxin in grain and grain-based commodities in Europe: occurrence, factors affecting occurrence, cooccurrence and toxicological effects**; *World Mycotoxin Journal*, Vol.3, No.4, pp. 349-367;
- VAN DER MERWE K.J., STEYN P.S., FOURIE L., (1965a); **Ochratoxins A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh**; *Nature*, 205, pp. 1112-1113;

- VAN DER MERWE K.J., STEYN P.S., FOURIE L., (1965b); **Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh;** Journal of the Chemical Society, pp. 7083-7088;
- VARGO R.H., BAUMER J.S., (1996); ***Fusarium sporotrichioides* as Pathogen of Spring Wheat;** Plant Disease, Vol.70, pp. 629-631;
- VEY A., HOAGLAND R.E., BUTT T.M., (2001); **Toxic metabolites of fungal biocontrol agents; in Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential;** CAB International, Bristol, pp. 311-346;
- VINALE F., SIVASITHAMPARAM K., GHISALBERTI E L., MARRA R., WOO S.L., LORITO M., (2008); ***Trichoderma*-plant-pathogen interactions;** Soil Biology & Biochemistry, Vol.40, pp. 1-10;
- VISCONTI V., HAIDUKOWSKI E.M., PASCALE M., SILVESTRI M., (2004); **Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking;** Toxicology Letters, Vol.153, pp. 181-189;
- VOGEL R., TRAUTSCHOLD I., WERLW E., (EDS), (1968); **Natural proteinase inhibitors;** Acad. Press, New York;
- VOSS K.A., (2007); **Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity;** Animal Feed Science and Technology, 137, pp. 299-325;
- VUJANOVIC V., SMORAGIEWICZ W., KRZYSZTYNIAK K., (2001); **Airborne Fungal Ecological Niche Determination as One of the Possibilities for Indirect Mycotoxin Risk Assessment in Indoor Air;** Environmental Toxicology, Vol.16, No1, pp. 1-8;
- VUKELIC M, SOSTARIC B, BELICZA M., (1992); **Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy;** Food Chem. Toxicol. 30, pp. 193-200;
- WAGACHA J.M, MUTHOMI J.W., (2006); ***Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat;** Crop Protection, Vol.26, pp. 877-885;
- WAGACHA J.M., OERKE E. C., DEHNE H. W., STEINER U., (2012); **Interactions of *Fusarium* species during prepenetration development;** Fungal Biology, Vol.116, pp. 836-847;
- WANG H, NG TB., (1999); **Pharmacological activities of fusaric acid (5butylpicolinic acid);** Life Sci 65, pp. 849-856;
- WANG Y. Z. & MILLER J. D., (1988); **Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance;** Journal of Phytopathology, 122, pp. 118-125;

- WARFIELD CY, GILCHRIST DG., (1999); **Influence of kernel age on fumonisin B₁ production in maize by *Fusarium moniliforme***; Applied and environmental microbiology;65(7), pp. 2853-2856;
- WÄTJEN W., DEBBAB A., HOHLFELD A., CHOVOLOU Y., KAMPKÖTTER A., EDRADA R. A., EBEL R., HAKIKI A., MOSADDAK M., TOTZKE F., KUBBUTAT M. H. G., E PROKSCH P., (2009); **Enniatins A₁, B and B₁ from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation**; Mol. Nutr. Food Res., vol. 53, n. 4, pp. 431-440;
- WHO: BOLGER M., COCKER R.D., DINOVI M., GAYLOR D., GELDERBLOM W., AND OLSEN M., (2001); **In safety evaluation of certain mycotoxins in food**; Edited by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO, Rome, pp. 103-280;
- WINDHAM G.L., WILLIAMS W.P., DAVIS F.M., (1999); **Effects of the Southwestern Corn Borer on *Aspergillus flavus* Kernel Infection and Aflatoxin Accumulation in Maize Hybrids**; Plant Disease, Vol.83, No.6, pp. 535-540;
- WIŚNIEWSKA A., BASINSKI T., CHETKOWSKI J., PERKOWSKI J., (2011); ***Fusarium sporotrichioides* SHERB. Toxins Evaluated in Cereal Grain with *Trichoderma harzianum***; Journal of Plant Protection Research, Vol.51, No.2, pp. 134-139;
- WOO S.L., LORITO M., (2007); **Exploiting the Interactions between Fungal Antagonists, Pathogens and the Plant for Biocontrol**; in M. Vurro and J. Gressel (eds.), Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management, pp. 107-130;
- WOTTON H.R., STRANGE R.N., (1987); **Increased susceptibility and reduced phytoalexin accumulation in drought-stressed peanut kernels challenged with *Aspergillus flavus***; Applied and Environmental Microbiology, Vol.53, pp. 270-273;
- WU S.N., H. CHEN Y. C. LIU & H. T. CHIANG., (2002); **Block of L-type Ca²⁺ current by beauvericin, a toxic cyclopeptide in the NG 108-15 Neuronal Cell Line**; Chem. Res. Toxicol. 15, pp. 854-860;
- WU X., LESLIE J. F., THAKUR R. A., SMITH J. S., (2003); **Purification of fusaproliferin from cultures of *Fusarium subglutinans* by preparative high-performance liquid chromatography**; J. Agric. Food Chem., 51, pp. 383-388;
- XIAO FL, MARQUIARDT R.R., FRÖHLICH A.A., AND LING Y.Z., (1995); **Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A**; J. Agric. Food Chem. 43, pp. 524-530;
- XIAO FL., MADHYASTA S., MARQUIARDT R.R., LI. S., VODEIA J.K., FRÖHLICH A.A., AND KEMPPAINEN B.W., (1996); **Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships**; Toxicol. Appl. Pharmacol. 137, pp. 182-192;

- XU X., (2003); **Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight**; European Journal of Plant Pathology 109, pp. 683-689;
- XU X., PARRY D., NICHOLSON P., THOMSETT M., SIMPSON D., EDWARDS S., COOKE B., DOOHAN F., BRENNAN J., MORETTI A., TOCCO G., MULÈ G., HORNOK L., GICZEY G., TATNELL J., (2005); **Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries**; European Journal of Plant Pathology 112, pp. 143-154;
- YATES S.G., TOOKEY H.L., ELLIS J.J., TALLENT W.H., WOLFF I.A., (1969); **Mycotoxins as a possible cause of fescue toxicity**; Journal of Agronomy and Food Chemistry 17, pp. 437-442;
- YEDIDIA I., BENHAMOU N., CHET I., (1999); **Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum***; Applied Environmental Microbiology, Vol.65, pp. 1061-1070;
- YIN Y., YAN L., JIANG J., MA Z., (2008); **Biological control of aflatoxin contamination of crops**; J. Zhejiang Univ. Sei B, 9(10), pp. 787-792;
- YLI-MATTILA T., PAAVANEN-HUHTALA S., JESTOI M., PARIKKA P., HIETANIEMI V., GAGKAEVA T., SARLIN T., HAIKARA A., LAAKSONEN S., RIZZO A., (2008); **Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia**; Archives of Phytopathology and Plant Protection 41, pp. 243-260;
- YLI-MATTILA T., (2010); **Ecology and Evolution of Toxigenic *Fusarium* Species in Cereals in Northern Europe and Asia**; Journal of Plant Pathology, Vol.92, No.1, pp. 7-18;
- YU J., EHRLICH K.C., (2011); **Aflatoxin Biosynthetic Pathway and Pathway Genes**; www.intechopen.com, pp. 41-66;
- ZABLOTOWICZ R.M., ABBAS H.K., LOCKE M.A., (2007); **Population ecology of *Aspergillus flavus* associated with Mississippi Delta soils**; Food Additives and Contaminants, Vol.24, No.10, pp. 1102-1108;
- ZHANG H., LUO W., PAN Y., XU J., XU J. S., CHEN W. Q., FENG J., (2014); **First Report of *Fusarium temperatum* Causing *Fusarium* Ear Rot on Maize in Northern China**; The American Phytopathological Society – Volume 98, Number 7, pp. 1001;
- ZHUKHLISTOVA N. E., TISHCHENKO G. N., TOLSTYKH I. V., E ZENKOVA V. A., (1999); **Molecular and crystal structure of the antibiotic enniatin B, a secondary microbial metabolite**;;
- ZINEDINE A., MECA G., MAÑES J., FONT G., (2011); **Further data on the occurrence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins (A, A₁, B, B₁), fusaproliferin and beauvericin in raw cereals commercialized in Morocco**; Food Control, 22, pp. 1-5;
- ZUCCHI M., MAZZINI C., FAENZA C., (2005); **Linee guida per il mais**; In Terra e Vita n. 27;

Sitografia

- commons.wikimedia.org
- en.engormix.com
- en.wikipedia.org
- eur-lex.europa.eu
- fitopatologia1.blogspot.it
- pubs.rsc.org
- tesi.cab.unipd.it
- www.biosite.dk
- www.chemnet.com
- www.inchem.org
- www.ipm.iastate.edu
- www.iss.it
- www.omafra.gov.on.ca
- www.plantpath.cornell.edu
- www.sciencedirect.com
- www.sigmaaldrich.com
- www.venetoagricoltura.org

