



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**TRATTAMENTO DI SEMI DI ORZO DA BIRRA CON ACIDO FERULICO E CARBONATO DI
SODIO PER IL CONTROLLO DEL FUNGO *FUSARIUM GRAMINEARUM***

Relatore:

Dott. Luca Sella

Laureando:

Giovanni Scarso

Matricola 625768

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

INDICE

| | |
|---|----|
| RIASSUNTO..... | 5 |
| ABSTRACT..... | 6 |
| 1 INTRODUZIONE..... | 7 |
| 1.1 La birra..... | 7 |
| 1.2 Produzione della birra..... | 8 |
| 1.2.1 Maltazione..... | 8 |
| 1.2.2 Ammostatura..... | 9 |
| 1.2.3 Filtrazione..... | 10 |
| 1.2.4 Cottura..... | 11 |
| 1.2.5 Fermentazione..... | 11 |
| 1.3 Il fungo patogeno <i>Fusarium graminearum</i> | 13 |
| 1.4 Problematiche associate all'uso di semi infettati da <i>F. graminearum</i> nella produzione della birra..... | 15 |
| 1.5 Trattamenti anti-fungini e uso di inibitori "naturali"..... | 17 |
| 2 SCOPO DELLA TESI..... | 21 |
| 3 MATERIALI E METODI..... | 22 |
| 3.1 Allevamento di <i>F. graminearum</i> e produzione di conidi..... | 22 |
| 3.2 Analisi delle sementi e loro preparazione..... | 22 |
| 3.3 Crescita radiale di <i>F. graminearum</i> su piastra..... | 23 |
| 3.4 Infezioni <i>in vitro</i> di semi di <i>Hordeum vulgare</i> | 23 |
| 3.5 Infezione <i>in vivo</i> delle piante di <i>Hordeum vulgare</i> | 23 |
| 3.6 Trattamenti con gli inibitori "naturali" acido ferulico e carbonato di sodio..... | 24 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.7 | Valutazione della germinabilità dei semi..... | 24 |
| 3.8 | Livello di infezione dei semi di orzo <i>in vitro</i>..... | 25 |
| 3.9 | Quantificazione della micotossina deossinivalenolo (DON) con test ELISA..... | 25 |
| 4 | RISULTATI..... | 27 |
| 4.1 | Crescita radiale di <i>F. graminearum</i> in presenza di inibitori “naturali”..... | 27 |
| 4.2 | T Trattamenti dei semi di orzo con acido ferulico..... | 28 |
| 4.2.1 | Effetto dei trattamenti pre-infezione <i>in vitro</i>..... | 28 |
| 4.2.1.1 | Germinabilità dei semi di orzo..... | 28 |
| 4.2.1.2 | Livello di infezione dei coleottili di orzo..... | 29 |
| 4.2.2 | Effetto dei trattamenti post-infezione <i>in vitro</i>..... | 32 |
| 4.2.2.1 | Germinabilità dei semi di orzo..... | 32 |
| 4.2.2.2 | Livello di infezione dei coleottili di orzo..... | 33 |
| 4.2.3 | Effetto dei trattamenti post-infezione <i>in vivo</i>..... | 34 |
| 4.2.3.1 | Germinabilità dei semi di orzo..... | 34 |
| 4.2.3.2 | Livello di infezione dei coleottili di orzo..... | 36 |
| 4.3 | T Trattamenti dei semi di orzo con carbonato di sodio..... | 37 |
| 4.3.1 | Effetto dei trattamenti post-infezione <i>in vitro</i>..... | 37 |
| 4.3.1.1 | Germinabilità dei semi di orzo..... | 37 |
| 4.3.1.2 | Livello di infezione dei coleottili di orzo..... | 38 |
| 4.3.2 | Effetto dei trattamenti post-infezione <i>in vivo</i>..... | 40 |
| 4.3.2.1 | Germinabilità dei semi di orzo..... | 40 |
| 4.3.2.2 | Livello di infezione dei coleottili di orzo..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4 Quantificazione della micotossina deossinivalenolo (DON) su tessuti infetti e trattati con inibitori “naturali”..... | 42 |
| 5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI..... | 44 |
| 6 BIBLIOGRAFIA..... | 47 |

RIASSUNTO

La birra è la bevanda più diffusa dopo il tè, le bibite gassate e il latte e tra le alcoliche è la più consumata, raggiungendo i 1.846 milioni di ettolitri nel 2010. Per la produzione di questo prodotto a livello industriale, artigianale e biologico la principale materia prima è il malto di orzo, ricavato dalla germinazione e successiva torrefazione dei semi di *Hordeum vulgare*. La qualità dei semi non maltati deve essere elevata per poter raggiungere il 95% di germinabilità durante la fase di maltazione. Uno dei rischi principali per la qualità delle sementi è la presenza del fungo patogeno *Fusarium graminearum*, la cui infezione in campo è in grado di causare la Fusariosi della spiga (FHB), una delle principali e più dannose malattie dei cereali; questa si può manifestare già dalle prime fasi della spigatura fino alla maturazione cerosa ed è in grado di provocare gravi perdite di resa e qualità delle sementi (McMullen et al., 1997), intesa come riduzione del contenuto amidaceo e proteico del seme, riduzione della germinabilità e contaminazione da micotossine. *F. graminearum* infatti è in grado di secernere micotossine appartenenti al gruppo dei tricoteceni, tra cui il deossinivalenolo (DON), una tossina pericolosa per la salute umana ed animale che può persistere nel prodotto alimentare anche dopo l'eliminazione del patogeno. Se le sementi di orzo infette sono utilizzate per la produzione della birra possono causare difetti nel prodotto finito come il "gushing", che consiste in un'improvvisa fuoriuscita del prodotto dal contenitore. La lotta al fungo è effettuata con diverse tecniche che prevedono l'eliminazione diretta del fungo, la decontaminazione dalle micotossine e la separazione delle cariossidi sane dalle infette, attraverso l'uso di mezzi fisici, chimici e biologici. L'identificazione di inibitori "naturali" efficaci contro la crescita di *F. graminearum* a basse concentrazioni e non tossici per la salute umana e animale, potrebbe consentire di effettuare trattamenti alternativi all'impiego di sostanze più aggressive nei confronti della materia prima e non idonee alla produzione alimentare. Nella presente tesi sono state testate due sostanze naturali, l'acido ferulico e il carbonato di sodio; entrambe sono risultate efficaci nel contenere lo sviluppo di *F. graminearum*. In particolare l'acido ferulico, efficace già a basse concentrazioni, riduce anche la contaminazione da parte della micotossina DON in coleottili e semi di orzo trattati.

ABSTRACT

Beer is the world's most popular beverage after tea, soft drinks and milk and among the alcoholic is the most consumed in the world, reaching 1.846 million hectoliters in 2010. The main raw material for its production, whether industrial, hand-made or biological, is barley malt obtained from germination and subsequent roasting of *Hordeum vulgare* seeds. The quality of the unmalted seeds has to be high in order to achieve a germination of 95% during the phase of malting. One of the important risks to the quality of the seeds is the presence of the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. Infections by this pathogen in the field can cause the *Fusarium* head blight (FHB), one of the main and most damaging cereal diseases. This disease may occur from early stages of earing to waxy maturation and can cause severe losses of yield and seed quality (McMullen et al., 1997). Such as reduction of protein and starch content of the seed, reduction in germination and mycotoxin contamination. In fact, *F. graminearum* is able to secrete mycotoxins belonging to the group of trichothecenes including deoxynivalenol (DON), a toxin hazardous to human and animal health that may persist in food products even after the elimination of the pathogen. If used for the production of beer, the infected seeds may cause defects in the finished product such as “gushing” which consists of a sudden escape of the product from the container. The control of this fungus is performed by physical, chemical and biological treatments that provide for the direct elimination of the fungus, the decontamination of mycotoxins and the separation of healthy from infected kernels. The identification of "natural" inhibitors effective against *F. graminearum* at low concentration and not toxic to human and animal health, could allow to perform alternative treatments preferable to the use of substances more aggressive in respect of the raw material and not suitable for food production. In the present thesis two natural substances, ferulic acid and sodium carbonate, were tested; both treatments resulted effective in reducing *F. graminearum* growth. In particular, ferulic acid, already effective at low concentration, reduced also DON mycotoxin contamination in treated barley coleoptyls and seeds.

1 INTRODUZIONE

1.1 La birra

La birra è la bevanda alcolica con la maggiore diffusione globale, con una produzione totale che nel 2010 ha raggiunto i 1.846 milioni di ettolitri (+33,8% rispetto all'anno precedente) e un consumo procapite di 27 litri. Nel 2010 i maggiori produttori sono risultati la Cina con 448 milioni di ettolitri (+103,6% rispetto all'anno precedente) e un consumo procapite di 33 litri, seguita dagli Stati Uniti con 228 milioni (-2,1%) e 76 litri procapite, il Brasile con 114 milioni (+37,3%) e 58 litri procapite, la Russia con 103 milioni (+87,3%) e 78 litri procapite e la Germania con 96 milioni (-12,7%) e 107 litri procapite. Il paese con più alto consumo di birra è la Repubblica Ceca con 144 litri procapite consumati nel 2010 seguita dalla Germania con 107 litri, dall'Austria con 106 litri e dall'Irlanda con 99 litri. Nel 2010 l'Italia si è collocata al 12° posto in Europa come produzione, con circa 13 milioni di ettolitri prodotti ed un consumo procapite di 28 litri (Dati: Bath Report). Un tale incremento di produzione nei nuovi mercati va di pari passo con l'esposizione ai rischi sanitari. Secondo la legge n. 1354 del 16 agosto 1962 e sue successive modifiche, la birra è il prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica con ceppi di *Saccharomyces carlsbergensis* o di *Saccharomyces cerevisiae* di un mosto di birra preparato con malto anche torrefatto, di orzo o di frumento o di loro miscele, amaricato con luppolo o suoi derivati o con entrambi. La materia prima più utilizzata per la produzione della birra è l'orzo (*Hordeum vulgare*), anche se esistono birre di frumento, segale, mais, riso, avena e altri cereali (è consentito l'impiego di estratti di malto anche torrefatto e degli additivi consentiti con D.M. 209/96). Il malto di orzo o di frumento può essere sostituito con altri cereali interi o macinati o sotto forma di fiocchi o con materie prime amidacee e zuccherine nella misura massima del 40% calcolato sull'estratto secco del mosto di birra. La fermentazione alcolica del mosto di birra può essere integrata con una fermentazione lattica. *Hordeum vulgare* è una specie molto coltivata nel mondo, in particolare nei paesi produttori di birra. Ha una spiga tipicamente esastica, cioè costituita da sei file di carioidi, ma esistono anche varietà con quattro file (i tetrastici) e con due sole file (i distici), preferiti nella produzione della birra perché la spiga è più lunga, presenta grani più grossi e quindi contiene una percentuale maggiore di amido. Ogni spiga d'orzo è formata da una serie di nodi o rachidi, ciascuno sostenente sei potenziali fiori. La distinzione tra le tre varietà d'orzo è basata sul numero di fiori (due, quattro o sei), che sono resi fertili sviluppando dei pari numeri di semi su rachidi (Pepe, 2010). L'orzo esastico ha un maggiore potere diastatico (livello di enzimi più elevato) e in generale si presenta con il guscio più grosso. Le carioidi d'orzo hanno caratteristiche generali simili a quelle di tutti i

cereali e si presentano allungate e compresse. Il chicco è composto esternamente da un involucro formato dalle glume, più internamente dal pericarpo, dalla testa semipermeabile e dall'aleurone, struttura proteica importante per la produzione di enzimi coinvolti nella germinazione. Le parti basale e dorsale contengono l'embrione, di piccole dimensioni in quanto costituisce solo il 3% del volume del chicco, mentre il resto, circa l'83%, è costituito dall'endosperma che contiene prevalentemente amido. Dopo la trebbiatura le cariossidi rimangono vestite dalle glume. Le caratteristiche più importanti che deve possedere l'orzo utilizzato nei birrifici sono l'umidità, non inferiore al 15%, una germinabilità non inferiore al 95%, la ricchezza enzimatica e il contenuto proteico e amidaceo.

1.2 Produzione della birra

Il processo di produzione della birra può essere semplificato in cinque fasi: maltazione, ammostatura, filtrazione, cottura, fermentazione.

1.2.1 Maltazione

La maltazione è un processo fondamentale per ottenere l'arricchimento enzimatico del seme. Avviene nelle malterie e permette di ottenere come risultato finale il malto d'orzo attraverso la germinazione controllata del seme. Le principali trasformazioni alle quali è soggetto l'orzo nel corso della maltazione avvengono a carico delle proteine e dell'amido. Gli enzimi con maggiore importanza sono quelli che degradano l'amido (α - e β -amilasi e destrinasi); enzimi citolitici (endo- ed eso- β -glucanasi e xilanasi); enzimi che degradano le proteine (proteasi e peptidasi) e infine enzimi che degradano i grassi (lipasi) (Pepe, 2010). Ad eccezione dell' α -amilasi che non è ancora presente nei semi di orzo non germinati, tutti gli altri enzimi sono presenti seppur in minime quantità. In una prima fase i semi sono puliti con ventole, magneti e aspiratori per evitare la presenza di sostanze estranee, poi in seguito sono calibrati e lavati. La seconda fase di macerazione consiste in diversi cicli di immersione in serbatoi cilindrici riempiti di acqua a pH alcalino, una pratica tradizionale prevedeva l'uso della calce (Charlene et al., 2007). L'umidità interna del seme raggiunge una percentuale compresa tra il 42 e il 47% a seconda del tipo di malto (Sicheri, 1983). Questa fase dura circa 50-80 ore ed è effettuata a una temperatura di 12-14 °C per rallentare lo sviluppo di eventuali microrganismi. Quando l'umidità interna del seme raggiunge il 30%, i semi sono spostati in camere apposite e lasciati germinare per 5-7 giorni a 12-13 °C, fino a che la lunghezza del coleotile è pari a $\frac{3}{4}$ del seme (Zambonelli et al., 1999). Con l'avvio della germinazione, l'embrione sintetizza ormoni della crescita, i quali sono inviati allo stato aleuronico

che a sua volta biosintetizza enzimi proteolitici, emicellulosolitici e idrolitici. Per indurre la formazione di questi enzimi, che avviene in parallelo con la respirazione, la temperatura è alzata lentamente per 25 ore da 16 a 30 °C (Cantoni, 1990). Gli enzimi proteolitici solubilizzano l'albume, costituito da proteine quali l'albumina e la globulina del corpo farinoso, trasformandolo in peptoni e aminoacidi. Gli enzimi emicellulosolitici liberano le amilasi che passano dallo scutello al corpo farinoso e dopo l'azione degli enzimi proteolitici, iniziano a idrolizzare l'amido in maltodestrine e maltosio; tuttavia la degradazione dell'amido nell'endosperma avviene in misura minima. I prodotti della degradazione sono quindi utilizzati dall'embrione come nutrienti per permettere la formazione del coleotile e delle radichette. I semi sono poi asciugati per 12 ore a 50 °C per prevenire la distruzione degli enzimi. La germinazione è quindi una fase critica del processo di produzione: infatti la percentuale minima richiesta di germinazione è del 95% e ogni fattore esterno che condiziona la germinabilità darà al malto una qualità inferiore. La terza fase consiste nella torrefazione, un vero e proprio essiccamento ad alta temperatura che oltre a produrre diverse tipologie di malto per colore e aroma, ha lo scopo di preservare gli enzimi formati durante la germinazione (Charlene, 2007). Per i malti chiari la temperatura di torrefazione raggiunge 60-80 °C, per gli scuri i 105 °C e per quelli ancora più colorati i 180-220 °C. L'umidità complessiva finale è del 4% (Pirova, 1973). Poiché il contenuto di albumina nelle cariossidi influenza il colore del malto durante la torrefazione, per le birre chiare si usano cereali con il 9-12% di albumina, per le birre scure cereali con l'11-13% (Pepe, 2010). Infine si esegue la deculminazione del seme, ovvero una spazzolatura con lo scopo di eliminare le radichette che causano sapori amari (Cantoni, 1990), lo stoccaggio dei semi nei silos o magazzini per alcune settimane al fine di re-distribuire l'umidità residua all'interno del seme e infine la spedizione ai birrifici.

1.2.2 Ammostatura

Una volta che le sementi raggiungono i birrifici, può iniziare il processo produttivo. Dopo una macinazione o molitura grossolana del malto con lo scopo di rendere estraibili i componenti solubili e facilitare l'azione degli enzimi, le porzioni di semi d'orzo sono immerse in acqua calda leggermente acida in una caldaia di miscela (Zambonelli et al., 1999). Questa fase è chiamata ammostatura e consente l'idrolisi dell'amido in amilosio e amilopectina attraverso il controllo di tre parametri fondamentali: la temperatura, il pH dell'acqua e la durata dell'immersione dei grani. Gli enzimi più importanti in questa fase sono le α - e β -amilasi; le prime attaccano i legami α -1,4-glucosidici e idrolizzano l'amilopectina in lunghe catene di polimeri di glucosio e destrine; le seconde attaccano i legami α -1,4-glucosidici e scindono l'amilosio in dimeri di maltosio, ma anche

in glucosio e malto triosio (Pirova, 1973). Controllando i parametri che favoriscono le attività dei due enzimi si ottengono mosti con caratteristiche ben diverse. Infatti le β -amilasi sono più attive nel range di temperatura tra 62-67 °C e a un pH di 5.0, determinando la produzione di un mosto di birra con alte concentrazioni di zuccheri fermentescibili che conferiscono al prodotto finale secchezza e un maggiore grado alcolico. Le α -amilasi invece sono più attive tra 72-76 °C e a un pH di 5.6 producendo nel mosto di birra zuccheri non fermentescibili che danno origine a un prodotto finale più dolce e corposo. Oltre alle amilasi, molto importante è il ruolo svolto dalle proteasi, le quali sono attive a temperature più basse (circa 52 °C) e idrolizzano le proteine in peptidi a basso peso molecolare con liberazione di singoli aminoacidi, favorendo la formazione della schiuma e la crescita dei lieviti (Charlene, 2007). La fase di ammostatura può avvenire in due modi, per infusione o per decozione. Nell'infusione il malto si impasta con acqua a 40 °C, quindi si aggiunge acqua a 80 °C fino a portare la massa a 63-65 °C in circa mezz'ora. La massa è tenuta in agitazione per un'ora a questa temperatura. Se invece è utilizzata la decozione, il malto si impasta con acqua fredda, poi la metà del mosto è trasferita in un tino di saccarificazione, dove è riscaldata fino a ebollizione e ritrasferita nel primo tino. Tale operazione è ripetuta più volte, fino a che la massa arriva a una temperatura di circa 75-80 °C (Vitagliano, 2002). Al termine di entrambi i metodi di ammostatura la temperatura deve raggiungere gli 80 °C; a questa temperatura si ha l'inattivazione degli enzimi e la stabilizzazione della saccarificazione.

1.2.3 Filtrazione

Al termine della fase di ammostatura il mosto liquido di birra è scaricato nei tini di chiarificazione o filtrazione per poterlo separare dalle parti solide dette trebbie. Il sistema più comune, chiamato "lauter tun" consiste nel trasferire la miscela di mosto di birra e fecce in un tino con un falso fondo provvisto di fenditure (Zambonelli et al., 1999). La miscela è pompata dal basso per ridurre al minimo fenomeni ossidativi e man mano che il livello aumenta, per gravità si viene a formare un letto di trebbie (Cantoni, 1990). Questo letto ha la funzione di un filtro naturale: il mosto di birra è fatto drenare attraverso le fecce, scaricato nel falso fondo e inviato infine nel tino di bollitura. In seguito avviene un lavaggio con acqua calda a circa 78 °C che permette una resa maggiore d'estrazione dalle trebbie. L'orzo esastico presenta un guscio più spesso e si presta meglio alla filtrazione (Pirova, 1973). Dopo essiccamento il letto di trebbie è utilizzato come sottoprodotto nel settore mangimistico dei ruminanti, suini e volatili.

1.2.4 Cottura

Al termine della fase di filtrazione, il mosto di birra limpido è trasferito nei tini di cottura e portato a bollitura per 1-2 ore con lo scopo di inattivare gli enzimi, portare alla coagulazione delle albumine, concentrare il mosto, eliminare i microrganismi non desiderati e portare alla formazione di reazioni di Maillard che inscuriscono il mosto. Con la cottura inoltre si esegue il luppolamento che consiste nell'aggiunta di infiorescenze femminili di *Humulus lupulus* sottoforma di coni o di pellet. *Humulus lupulus* contiene α - e β -acidi come la luppolina, umulene, α -umulone, β -lupulone, oli essenziali e tannini in grado di conferire alla birra note aromatiche e il tipico sapore amaro (Vitagliano, 2002). La quantità di luppolo aggiunto è maggiore per le birre chiare (150-400 g/hl), rispetto alle birre scure (100-200 g/hl) (Pepe, 2010). Il luppolo agisce anche come conservante stabilizzando la birra e mantenendone le caratteristiche organolettiche, ha inoltre proprietà antibatteriche, antiossidanti e agisce sulla persistenza della schiuma. Dopo il processo di bollitura si ha una separazione dei tannini del luppolo e delle sostanze proteiche che sono precipitate per coagulazione in vasche di decantazione, o separate per mezzo di separatori “whirlpool” e centrifughe (Zambonelli et al., 1999). Quindi il mosto di birra caldo è trasferito nei tini di fermentazione dove è raffreddato in modo controllato con uno scambiatore di calore con cui si porta la temperatura finale a valori ambientali, se necessario la temperatura è successivamente abbassata in base al processo di fermentazione desiderato (vedi paragrafo 1.2.5).

1.2.5 Fermentazione

La fermentazione è un processo fondamentale in cui un lievito è inoculato nel mosto di birra a una temperatura desiderata secondo il tipo di birra da produrre. L'attività del lievito trasforma zuccheri e amminoacidi in alcol, anidride carbonica e sostanze aromatiche. I lieviti sono selezionati in base alle loro caratteristiche fisiologiche e in particolar modo in base al loro potere fermentativo, al loro adattamento a precise temperature, alla capacità di formare schiuma, al loro potere flocculante e in base alla capacità di produrre composti aromatici. Nella produzione della birra si distinguono due tipologie di fermentazione (alta e bassa) che si differenziano per ceppo di lievito utilizzato e temperatura di fermentazione. Il lievito che innesca l'alta fermentazione è il *Saccaromyces cerevisiae*: questo lievito agisce tra i 16 e i 23 °C (Sicheri, 1983) ed è caratterizzato dal fatto che durante la gemmazione, le nuove cellule restano attaccate alla cellula madre formando lunghe ramificazioni. Durante la fermentazione queste cellule ramificate tendono a salire in superficie andando a formare un caratteristico strato detto “tappo” o “coperchio” che viene in seguito asportato. I lieviti sono aggiunti al mosto fino ad una concentrazione di 10^7 cellule/ml. Le

fermentazioni alta e bassa sono suddivise in due fasi: la fermentazione primaria o tumultuosa, con la quale si ha prevalentemente la produzione di alcol e anidride carbonica, e la fermentazione secondaria o maturazione, in cui si completa la fermentazione degli zuccheri fermentescibili e si formano altri composti che caratterizzano il sapore e l'aroma del prodotto finale (Charlene, 2007). Nelle birre ad alta fermentazione, la fermentazione primaria avviene a una temperatura tra i 16-23 °C e dura 2-3 giorni. La fermentazione secondaria può mancare del tutto o avere una durata di 7-21 giorni (Sicheri, 1983). Nel caso della birra a bassa fermentazione, innescata dal lievito *Saccharomyces carlsbergensis*, la fermentazione primaria avviene a una temperatura di 5-8 °C per una durata di 6-10 giorni. In questa fase il lievito si moltiplica consumando ossigeno e inizia a fermentare; lo sviluppo di anidride carbonica porta alla formazione di un sottile strato di schiuma bianca che nei successivi giorni virerà in bruna raggiungendo il massimo spessore. Col rallentamento della fermentazione la schiuma si trasforma in uno strato bruno e il lievito floccula raccogliendosi come sedimento sul fondo. Nella fermentazione secondaria la birra è travasata in altri serbatoi, dove è lasciata maturare prima a una temperatura di cinque °C ed in seguito a 0 o -1 °C per un tempo che varia dai 7 ai 30 giorni. L'andamento delle fermentazioni è controllato mediante la misurazione della densità della birra, che costituisce un indice della riduzione degli zuccheri e della presenza di alcol e anidride carbonica. Una volta raggiunto il grado desiderato di riduzione dello zucchero, la birra può essere filtrata, imbottigliata sotto pressione e pastorizzata. Per una maggiore stabilità microbica nella produzione industriale le bottiglie o le lattine sono sottoposte al trattamento di pastorizzazione a 70 °C per 20-30 secondi. L'instabilità biologica della birra è data dal suo pH 5.6 leggermente acido, poco selettivo nei confronti di microrganismi contaminanti e alteranti quali batteri lattici, acetobatteri, sporigeni e altri lieviti. Per ovviare a questa instabilità è possibile acidificare il mosto con acido cloridrico e acido fosforico oppure, come regolamentato in Italia (D.M. 2 maggio 1996, n. 325), con l'impiego di batteri lattici del genere *Lactobacillus*. In particolare è utilizzato *Lactobacillus delbrueckii* sottospecie *delbrueckii* (D.M. n. 325 del 1996) perché è una specie omofermentante e termofila, quindi in grado di produrre acido lattico e di non crescere alle basse temperature di produzione. Può essere aggiunto durante la fase d'immersione dell'orzo prima della germinazione o nel mosto di birra prima della luppolatura (Lowe and Arendt, 2004).

1.3 Il fungo patogeno *Fusarium graminearum*

La “Fusariosi” è una malattia che provoca gravi danni alle colture erbacee. Gli agenti eziologici di questa malattia sono le specie fungine appartenenti al genere *Fusarium*; presenti comunemente nel terreno, questi ascomiceti sono agenti fitopatogeni responsabili di marciumi radicali, disseccamento delle cariossidi e alterazioni a carico dell'apparato vascolare dei cereali, indicate con il termine di tracheofusariosi. Tra le specie appartenenti a questo genere, *Fusarium graminearum* (telomorfo: *Gibberella zeae*), è uno dei principali agenti causali della malattia nota con il nome di Fusariosi della spiga (FHB) (Parry et al., 1995): questo fungo attacca numerose graminacee come il frumento, l'orzo, la segale, l'avena, il triticale, il sorgo e il riso, utilizzati come fonte amidacea diretta per la nutrizione umana e animale e per la produzione di numerosi prodotti alimentari derivati, come per esempio la birra. In Asia, Canada, Europa e America meridionale la Fusariosi da spiga è stata riconosciuta come uno dei maggiore fattori limitanti nella produzione di frumento (Stack, 1999). Il fungo infetta la pianta ospite attaccando e colonizzando i tessuti fiorali, per cui la fioritura è la fase di maggior suscettibilità dei cereali. La tassonomia di *F. graminearum* è complessa: a livello morfologico è difficile ottenere una distinzione dalle altre specie di *Fusarium* e la forma dei macroconidi è uno dei caratteri distintivi della specie. Il ciclo di infezione di *F. graminearum* incomincia da macroconidi (spore asessuali) che si conservano durante l'inverno nei residui colturali; la germinazione dei macroconidi produce un micelio da cui si differenzia un corpo fruttifero chiamato peritecio, che rilascia le ascospore (spore sessuali) durante la fase di infiorescenza dei cereali. Le condizioni ambientali favorevoli per l'inizio dell'infezione in campo sono una superficie umida per 48-60 ore e una temperatura di 25 °C, comunque non inferiore ai 15 °C. I caratteristici sintomi di FHB sono il disseccamento parziale o totale dei tessuti conduttori del rachide con conseguente prematuro ingiallimento della spiga, raggrinzimento e riduzione in peso della cariosside (Rubella et al., 2004); questi sintomi si possono manifestare dalle prime fasi della spigatura fino alla maturazione cerosa. La malattia è in grado di provocare gravi perdite di resa nel raccolto e riduzione della qualità finale delle sementi (McMullen et al., 1997), intesa come riduzione di peso del seme, in particolare del contenuto amidaceo e proteico, riduzione della germinabilità e contaminazione delle cariossidi infette con micotossine. Infatti *F. graminearum*, come molte specie appartenenti allo stesso genere, in particolari condizioni è in grado di produrre alcune micotossine appartenenti al gruppo dei tricoteceni. (Schwarz et al., 1995). I tricoteceni si dividono in quattro gruppi, di cui solo i primi due hanno importanza tossicologica: il gruppo A, che comprende le tossine T-2, HT-2 e diacetossiscirpenolo (DAS), e quelli del gruppo B che includono il deossinivalenolo (DON) o vomitossina e il nivalenolo (NIV). La micotossina più importante

secretata da *F. graminearum* è il DON (Clear et al., 1996). Tuttavia l'infezione del fungo non sempre determina la presenza di micotossine nei tessuti infetti in quanto le condizioni ottimali di sviluppo del fungo non combaciano con quelle ottimali per la produzione delle micotossine, che sono considerate una risposta del fungo a condizioni di stress ambientale: le micotossine possono infatti essere prodotte per difendere risorse nutrizionali, per impedire ad altri funghi o animali di consumarle, ma possono anche svolgere un ruolo importante nel processo infettivo. Ad esempio il DON, sintetizzato dal *F. graminearum* durante la fase di infezione della spiga, è considerato un fattore di virulenza del fungo su frumento (Bai et al., 2001); questi metaboliti secondari sono in grado di interferire con la sintesi proteica della pianta ospite impedendole di sintetizzare efficaci sistemi di difesa e favorendo quindi l'infezione fungina. Durante l'infezione la concentrazione di DON è molto più alta rispetto alla crescita in coltura, poiché probabilmente segnali generati dalle piante hanno un importante ruolo nell'indurre la biosintesi di DON (Mudge et al., 2006). La contaminazione da DON causa ingenti perdite economiche a causa della diminuzione della qualità degli alimenti: elevate concentrazioni di micotossina possono infatti causare effetti negativi sulla salute umana, quali un'attività immunosoppressiva e inappetenza, e sulla salute degli animali da reddito, in cui può causare vomito e anche morte. La classificazione sulla base del rischio cancerogeno per l'uomo le inserisce nell'ultimo gruppo per la loro presunta non cancerogenicità. I più frequenti casi di micotossicosi sono stati riscontrati nei Paesi in via di sviluppo. Una delle maggiori motivazioni di preoccupazione è la presenza di micotossine anche in alimenti non visibilmente ammuffiti ma contaminati dal fungo. I livelli massimi di micotossine nei diversi alimenti sono stabiliti dal Reg. CE 856/2005 e dai suoi aggiornamenti 1881/2006, in cui si specifica il livello massimo di DON nei cereali non trasformati (1,25 ppm) ad esclusione di grano duro, avena e granturco, e 1126/2007, riguardante solo il frumento (1 ppm); il livello massimo di assunzione di DON per l'uomo è di 1 ppb ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) al giorno per chilogrammi di peso corporeo. Anche le principali micotossine che contaminano l'orzo infetto da Fusariosi da spiga appartengono al gruppo dei tricoteceni (Schwarz et al., 1995). Nell'orzo da birra infetto sono state inoltre rilevate tossine appartenenti al gruppo zearalenone (ZEA). La presenza di micotossine nei cereali utilizzati nella produzione della birra è stata confermata in Canada (Wolf-Hall and Schwanz., 2002), Germania (Müller et al., 1997), Sud Africa (Odhav, 2005), Camerun (Roger, 2011), rendendo la contaminazione da micotossine una problematica globale.

1.4 Problematiche associate all'uso di semi infettati da *F. graminearum* nella produzione della birra

La presenza di *F. graminearum* nell'orzo e in altri cereali utilizzati come materia prima per la produzione della birra può dare origine a diverse problematiche. La contaminazione fungina pre-raccolta e durante lo stoccaggio è la principale causa di perdita di qualità delle sementi, intesa come riduzione di dimensioni, peso, contenuto di amido, cellulosa, proteine (Boyacioglu et al., 1992) e della germinabilità nella fase di maltazione, che non deve essere inferiore al 95% (Gyllang et al., 1981). Infatti l'attività proteolitica del fungo nei confronti delle proteine dei cereali è stata dimostrata causare un incremento di aminoacidi e peptidi (Haikara, 1983). Inoltre il fungo determina una pigmentazione anomala del malto infetto, con conseguente perdita qualitativa del prodotto finale (Charlene et al 2007). Per evitare la crescita fungina i parametri da tenere sotto controllo sono la temperatura e l'umidità. Soprattutto queste ultime, che sono aumentate per favorire la germinabilità dei semi, è associata all'incubazione dei semi in acqua con pH basico per contrastare lo sviluppo fungino; in ogni modo non si hanno effetti durevoli contro l'eventuale crescita fungina e produzione di micotossine durante le fasi successive al trattamento antifungino (Charlene et al., 2007). La presenza di micotossine prodotte dal fungo contaminante può essere individuata attraverso un test rapido a campione (Casale et al. 1988) o con metodi gas cromatografici (Buiatti et al., 2006). È necessario quindi fare un'iniziale cernita delle sementi con allontanamento del lotto infetto prima della fase produttiva. È infatti riscontrato che dopo cinque giorni dalla germinazione la concentrazione di DON aumenta dal 19% al 114%, preceduta da un notevole incremento dell'ergosterolo, una molecola che indica lo sviluppo della massa fungina (Carene. 2007). Con la sterilizzazione, che avviene durante la bollitura del mosto di birra, eventuali funghi sviluppati nelle fasi precedenti non consistono più un pericolo. Le micotossine sono invece altamente resistenti ai trattamenti chimico-fisici dei processi tecnologici e di trasformazione; si è riscontrata elevata resistenza delle micotossine durante le diverse fasi di produzione della birra, a partire dalla maltazione (Munar e Subree, 1997) fino alla filtrazione, bollitura e fermentazione (Scott, 1996). Durante la maltazione, le temperature che si raggiungono nella maggior parte dei malti utilizzati per la birrificazione non sono sufficienti per denaturare il DON, termostabile anche a temperature superiori ai 170 °C a pH neutro e acido (Wolf e Bullerman, 1998). Anche dopo la fase di filtrazione a caldo delle trebbie di malto, è stato dimostrato che l'80-93% di DON resta in forma attiva nel mosto di birra; a causa della solubilità in acqua di questa micotossina (Roger D.D., 2011). Inoltre ulteriori ricerche hanno dimostrato che alcune micotossine tra cui il DON sono in grado di superare le condizioni che si raggiungono durante la fermentazione (Magan e Aldred, 2007). Anche

la pastorizzazione della birra confezionata è quasi completamente inefficiente nei confronti di tricoteceni, zearalenone, fumonisine prodotti da funghi del genere *Fusarium* e aflatoxina e ocratossina A prodotte da funghi del genere *Aspergillus* (Charlene et al., 2007). Altro punto critico riguarda la feccia del letto di filtrazione che è destinata come mangime agli animali da reddito. Tracce di DON idrosolubile e di zearalenone (ZEA) sono state riscontrate nei grani esausti (Scott, 1996). Principalmente *F. graminearum* (Haikara, 1983a), assieme ad altri funghi dei generi *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, sono inoltre responsabili dell'alterazione del prodotto finale definito come "gushing" o "fontana di schiuma" (Charlene, 2007), che consiste in un'improvvisa, spontanea e vigorosa sovra produzione di schiuma all'apertura della bottiglia (Tuija Sarlin et al., 2005). Esistono due differenti tipi di "gushing": il primario; indotto dai metaboliti fungini presenti nel malto o negli altri cereali, difetto associato principalmente alla Fusariosi della spiga; il secondario, causato dalla presenza nelle bottiglie di impurità come ioni metallici, cristalli di ossalato di calcio, residui di agenti pulenti. Il fenomeno di "gushing" può rivelarsi un difetto della qualità, con il risultato di perdita del prodotto direttamente al consumatore, ed è causato da condizioni umide durante l'immagazzinamento che favoriscono lo sviluppo fungino responsabile del grande incremento di micro bolle nella birra. Il fattore responsabile del "gushing" è stato individuato in alcuni componenti solubili prodotti dal fungo in campo o durante la germinazione ma non direttamente correlati con la presenza di DON nel malto (Tuija Sarlin et al., 2005). Sebbene le cause precise di questo difetto siano ancora sconosciute, la presenza di una classe di proteine nota con il nome di idrofobine a una concentrazione di 250 µg/g di malto è direttamente associata alla formazione di "gushing"(Tuija Sarlin et al., 2005). Le idrofobine sono presenti nella parete cellulare dei funghi, e quindi di spore e miceli. Aastrup et al., (2003) hanno osservato che l'aggiunta di un enzima proteolitico nell'estratto di malto riduceva la tendenza al "gushing", e di conseguenza hanno concluso che i fattori induttori potrebbero essere principalmente proteine o polipeptidi. Le idrofobine non hanno tuttavia conseguenze negative sulla stabilità della schiuma nella birra"(Tuija Sarlin et al., 2005). I fattori di "gushing" sono molecole attive in superficie che stabilizzano le bolle di anidride carbonica formando uno strato attorno alle micro bolle: questo strato previene la rottura delle bolle guidandole verso la formazione della "fontana di schiuma" all'apertura del prodotto (Haikara, 1983).

1.5 Trattamenti anti-fungini e uso di inibitori “naturali”

Poiché la presenza di *F. graminearum* e/o della sua principale tossina DON nei semi di orzo può dare origine a diverse problematiche nella produzione della birra, sono stati testati numerosi approcci per limitare le contaminazioni delle sementi da parte di questo fungo patogeno. Questi trattamenti possono essere classificati in tre categorie: quelli atti a rimuovere o separare le cariossidi infette; quelli atti a prevenire o inibire la crescita del fungo; quelli che mirano a decontaminare o eliminare le micotossine presenti nei grani (Charlene, 2007).

Un metodo di separazione delle cariossidi infette è basato sul fatto che i semi colpiti da FHB possono essere distinti in base al loro peso, che risulta inferiore rispetto ai semi sani. Infatti, i semi colonizzati da *F. graminearum* si presentano generalmente più piccoli e avvizziti (Kazan et al., 2011). Le cariossidi infette possono essere rimosse con l'uso di un separatore per gravità (Clear et al., 1996); tuttavia si è riscontrato che in caso di infezioni avvenute dopo lo sviluppo delle cariossidi, l'avvizzimento è minimo e questa separazione risulta inefficiente. Un'altra tecnica prevede la separazione delle glume dal seme poiché si è riscontrato che la maggior parte del tessuto fungino e della tossina DON sono presenti nella parte esterna del seme. Questo trattamento fisico danneggia l'embrione e fa decrescere la percentuale di germinazione rendendo questa tecnica impraticabile per l'orzo da malto (Kunze, 1996).

I metodi atti a prevenire o inibire la crescita del fungo possono essere distinti in fisici, chimici e biologici. Tra i primi sono compresi la pastorizzazione, trattamenti con acqua calda e l'irradiazione ionica, il più efficace in quanto permette anche un controllo sui livelli di DON con un minimo impatto sulla qualità del malto (Kottapalli et al., 2006); l'unico limite di questo trattamento è l'alto costo di questa tecnologia che ne sfavorisce la grande diffusione. I trattamenti chimici hanno portato a risultati confortanti, ma l'utilizzo di sostanze come la formaldeide, l'ipoclorito di mercurio ed il cloruro mercurico non è accettato dai produttori che temono eventuali residui e potenziali reazioni dannose per la salute (Charlene, 2007). Anche i trattamenti con fungicidi sono scoraggiati per la persistenza di residui tossici nei grani e per lo sviluppo di resistenza nei patogeni (McMullen, 1997). Agenti sanitizzanti come l'ipoclorito di sodio sono risultati in grado di eliminare *Fusarium culmorum* inoculato su orzo e ridurre il livello delle micotossine (Ramakrishna et al., 1991); tuttavia una limitazione a questo trattamento consiste nel fatto che alti livelli di sanitizzanti possono reagire con il materiale organico del grano e addirittura, durante la fermentazione, abbassare le performance dei lieviti, con un effetto negativo sul prodotto finale (Charlene et al 2007). Un promettente metodo prevede l'uso dell'ozono che è rapidamente decomposto ad ossigeno senza

rilasciare residui chimici: i risultati sembrano positivi sia per la sanitizzazione che per la detossificazione dell'orzo da aflatoSSine, ocratossina A e zearalenone (McKenzie et al., 1997).

Tra i trattamenti biologici, buoni risultati sono stati ottenuti con l'aggiunta del fungo antagonista *Geotrichium candidum* come coltura starter durante il processo d'immersione in acqua delle sementi di orzo prima della germinazione. I risultati mostrano una diminuzione dell'86% della contaminazione da *Fusarium* (Boivin and Malandra, 1997). L'utilizzo nel processo produttivo di questo microrganismo di controllo va comunque monitorato per la potenziale produzione di alcune tossine alcaloidi. Anche l'utilizzo di batteri lattici potrebbe essere promettente in quanto sono in grado di produrre sostanze antifungine che proteggono le caratteristiche qualitative del malto (Vaughan et al., 2005).

Sebbene i metodi biologici siano promettenti ed auspicabili, le industrie di maltazione prediligono trattamenti più controllabili durante la fase produttiva come quelli fisico e chimico.

Per quanto riguarda i trattamenti che mirano a decontaminare o a eliminare le micotossine presenti nella granella, quelli più efficaci nel ridurre i livelli di DON sono i trattamenti chimici con bisolfito di sodio, cloro e ammoniaca; in particolare, soluzioni alcaline di ipoclorito di sodio consentono la detossificazione dei tricoteceni (Faifer et al., 1994). Tuttavia anche questi trattamenti chimici riducono la qualità delle sementi e producono residui indesiderati. In molti recenti studi sono state testate numerose sostanze "naturali" non tossiche denominate G.R.A.S. ("*generally recognized as safe*") che, oltre ad avere un basso rischio per la salute umana e per l'ambiente ed essere ben accettate dai consumatori, possono ridurre o inibire la germinazione e quindi la crescita dei patogeni fungini e la produzione di micotossine (Janisiewicz, 2004). Le sostanze G.R.A.S. comprendono acidi organici quali l'etanolo, l'acido propionico, l'acido acetico e il sodio propionato, composti fenolici, chitosano, sali inorganici come cloruro di sodio, carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, carbonato di potassio e carbonato di ammonio. Gli acidi organici sono riconosciuti per essere efficaci nel controllo della crescita dei funghi (Higgins e Brnkhaus, 1999). Sali inorganici e organici sono stati dimostrati essere attivi agenti antimicrobici nei confronti di un vasto range di funghi fitopatogeni (Smilanick et al., 1999; Karabulut et al., 2001; Palou et al., 2002). L'efficacia di questi sali inorganici è stata verificata da Shekar et al. (2009) nei confronti del fungo *Aspergillus flavus*, sia in termini di inibizione della crescita del patogeno che di riduzione della concentrazione della micotossina aflatoSSina su mais. Trenholm et al. (1992) ha riscontrato in semi di orzo colpiti da Fusariosi della spiga e trattati per 30 minuti con una soluzione 1 M di carbonato di sodio una riduzione del 75-80% circa nel contenuto in DON e ZEA. Il carbonato di sodio è utilizzato come trattamento sui limoni dalle ditte di confezionamento (Smilanick et al., 1999), e come additivo

alimentare non è sottoposto ad alcuna restrizione per quanto riguarda la regolamentazione europea e nord americana (Lindsay, 1985; Multon, 1988). L'effetto inibitore del carbonato di sodio sembra essere dovuto al suo pH basico (Wolf e Bullerman, 1998); tuttavia, Nigro et al. (2006) hanno dimostrato che i valori di pH dei composti salini hanno un ruolo minore. Valori di pH acido sono noti invece indurre l'espressione dei geni Tri codificanti enzimi e fattori di trascrizione coinvolti nella biosintesi del DON in *F. graminearum* (Ferrarese, 2011). E' stato dimostrato che una soluzione di bicarbonato di sodio 0,1 M, con un valore di pH di 11.5, è attivo verso il patogeno poiché modificando le condizioni ambientali interagisce direttamente con la membrana cellulare alterandone la normale attività, riducendo il turgore delle cellule con conseguente collasso delle ife e delle diverse strutture riproduttive (Nobecourt, 1992). Altri trattamenti naturali potenzialmente efficaci sono quelli con oli essenziali (Magan e Aldres, 2007) derivati dalle piante come la cannella, i chiodi di garofano, lo zafferano, l'origano e la palmarosa; questi composti possiedono un elevato potere inibitore della crescita di diverse specie di *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. graminearum* e delle micotossine DON e ZEA (Marin et al., 2004). Il resveratrolo, una fitoalessina contenuta nella buccia e nei semi di uva, è responsabile della resistenza alla malattia denominata muffa grigia causata dal fungo *Botrytis cinerea*. Marin et al., (2006) hanno testato l'efficacia del resveratrolo su semi di frumento infetto da *F. graminearum* e *F. verticillioides* e hanno riscontrato una diminuzione dell'80% nella contaminazione da ZEA ma non della micotossina fumonisin B₁ (FB₁); tuttavia a causa dell'alto costo dovuto al suo processo di estrazione, l'utilizzo non è preso in considerazione dalle industrie. Al contrario, il prezzo del chitosano, un noto agente bioattivo e antifungino usato in numerose ricerche, è nettamente inferiore poiché deriva dalla chitina ricavata dall'esoscheletro dei crostacei. In particolare, il chitosano è un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina legati da un legame β -(1,4) (El Ghaouth et al., 1992); utilizzato nel trattamento contro i patogeni delle piante, nel terreno, nei semi e nelle foglie, induce la lignificazione del tessuto e di conseguenza una restrizione dell'infezione e della crescita dei funghi (Barbier, e Ride, 1988). Il chitosano sembra determinare numerosi effetti positivi: sembra in grado di ridurre la produzione della micotossina aflatoxina in mais (Cuero et al., 1991); inoltre il trattamento di semi di frumento con chitosano migliora la germinazione e il vigore dei semi e controlla la crescita di *F. graminearum* da seme infetto impedendo l'infezione durante la germinazione (Bhaskara et al., 1999); inoltre il chitosano induce nei semi trattati la sintesi di composti fenolici come l'acido cinnamico e benzoico, e in particolar modo un incremento del 50% di acido ferulico, proporzionale alla concentrazione di chitosano utilizzata (Bhaskara Reddy et al., 1999). Molti composti fenolici sono noti avere un'attività antifungina e sono precursori della

biosintesi di lignina nelle piante. Tra i composti fenolici, il più abbondante nelle pareti cellulari delle specie cerealicole è l'acido ferulico (Kim et al., 2006). Boutigny et al. (2009) hanno monitorato mediante RT-PCR quantitativa l'effetto di trattamenti con acido ferulico su colture di *F. culmorum* e *F. graminearum*: già a basse concentrazioni questo trattamento inibiva l'espressione dei geni Tri e riduceva quindi la sintesi della micotossina DON. E' noto che la produzione di micotossine da parte dei funghi dipende dal livello ossidativo dei tessuti vegetali infetti; ad esempio, i tricoteceni sono sintetizzati a partire da tricodiene con una serie di ossigenazioni (Desjardins et al., 1993). Poiché l'acido ferulico possiede spiccate proprietà antiossidanti (Rice-Evans et al., 1996), potrebbe modificare i livelli ossidativi e interferire quindi con il metabolismo secondario dei funghi determinando una riduzione della produzione di tricoteceni (Boutigny et al., 2009). Le proprietà protettive delle sostanze antiossidanti sono state ampiamente investigate (Galvano et al., 2001). Nesci ed Etcheverry (2006) hanno dimostrato che l'acido ferulico e altri componenti fenolici a basse concentrazioni riducono la crescita del fungo *Aspergillus flavus* e il livello della micotossina aflatossina B₁ del 90%.

2 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro è di verificare l'efficacia di trattamenti con inibitori "naturali" quali l'acido ferulico e il carbonato di sodio nel contrastare l'infezione di semi di orzo da birra da parte del fungo patogeno *Fusarium graminearum*. In primo luogo sono stati effettuati dei test di crescita radiale su piastra per verificare le concentrazioni di acido ferulico e carbonato di sodio più efficaci nell'inibire la crescita di *F. graminearum*. In seguito sono stati effettuati dei trattamenti di diversa durata dei semi di orzo sia prima che dopo l'infezione con *F. graminearum*. L'infezione con i conidi del fungo è stata effettuata sia inoculando i semi di orzo *in vitro* che *in vivo* infettando alcune spighe ottenute da piante di orzo coltivate in laboratorio. L'obiettivo finale è stato verificare l'effettiva efficacia dei trattamenti mediante valutazione della germinabilità delle sementi e del livello di infezione dei coleottili ottenuti dai semi trattati, e mediante quantificazione della micotossina DON su tessuti infetti e/o trattati.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Allevamento di *F. graminearum* e produzione di conidi

Il terreno di coltura utilizzato per la crescita del fungo *F. graminearum* è a base di agar di destrosio di patata (PDA) alla concentrazione di 40 g/litro. 10 ml di PDA sono versati in pastra Petri addizionati con antibiotico aureomicina alla concentrazione finale di 100 µg/ml. La produzione di conidi invece è stata indotta in un terreno di coltura contenente carbossimetilcellulosa (CMC). Per produrre 300 ml di terreno di coltura CMC, 0,3 g di nitrato di ammonio, 0,3 g diidrogeno di potassio, 0,15 g di solfato di magnesio, 0,3 g di estratto di lievito e 4,5 g di CMC sono stati fatti sciogliere in 300 ml di acqua ultra filtrata dopo sterilizzazione in autoclave, 50 ml di terreno sono stati aliquotati in una beuta sterile e sono stati inoculati con 5 tondeilli prelevati da una piastra di PDA contenete micelio di *Fusarium graminearum* WT (ceppo 3827) in attiva crescita. Dopo 7 giorni si è effettuata la conta su microscopio ottico dei conidi mediante una camera di Thoma. Una volta raggiunta la concentrazione minima sufficiente per compiere un'infezione (1×10^5 conidi/ml), il terreno è filtrato in una falcon e i conidi sono conservati a -80 °C dopo aggiunta di 10% glicerolo fino all'uso.

3.2 Analisi delle sementi e loro preparazione

I semi di *Hordeum vulgare* da birra non maltati utilizzati in questo lavoro appartengono alla cv. Adonis. Questa varietà primaverile e distica presenta un ciclo di sviluppo medio ed è dotata di ottima resistenza al freddo. È di taglia bassa, presenta una buona resistenza all'allettamento, la granella formata è ben nutrita e di grosso calibro. Si distingue per un basso livello di proteine, un elevato potere diastatico ed alta fermentescibilità. I semi utilizzati nel presente lavoro erano conciatati, trattati a base del principio attivo fludioxonil, con una germinabilità indicata in etichetta dell'85%. Per ogni esperimento è prevista una fase di preparazione delle sementi, che consiste in più lavaggi con acqua ultra filtrata, con lo scopo di solubilizzare la maggiore quantità possibile di concia dalle sementi. Svuotata l'acqua, i semi sono immersi in una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% per una durata di 5 minuti con l'obbiettivo di ottenere una sterilizzazione superficiale. Dopo il trattamento i semi sono stati lavati con acqua sterile per tre volte e lasciati asciugare nel becker. (Baskara et al., 1999; Shekhar M., et al., 2009).

3.3 Crescita radiale di *F. graminearum* su piastra

Per verificare l'efficacia di acido ferulico e carbonato di sodio nell'inibire la crescita di *Fusarium graminearum* sono state testate diverse concentrazioni di questi potenziali inibitori (2,5-5-10 mM di acido ferulico e 10-20-30-40-50 mM di carbonato di sodio). Le soluzioni di acido ferulico e sodio carbonato sono state sterilizzate per mezzo di un filtro (Minisart) da 0,2 µm. Dopo aver fatto sciogliere in microonde il terreno di coltura PDA, 10 ml di terreno sono stati trasferiti in ogni singola piastra con l'aggiunta di 1 ml di aureomicina (concentrazione finale 100 µg/ml) per evitare la crescita batterica, e un volume variabile di inibitore per ottenere la concentrazione desiderata. Nelle piastre di controllo è necessario aggiungere una soluzione acquosa di etanolo al 20% poiché l'acido ferulico è disciolto in una soluzione simile di etanolo al 20%. Dopo aver trasferito il terreno, le piastre sono agitate delicatamente per poter mescolare la soluzione prima della solidificazione dell'agar. Al centro di ogni piastra sono stati quindi inoculati 6 µl contenenti circa 500 conidi/µl e le piastre sono state incubate in un termostato a 24 °C. Ogni esperimento è stato replicato 4 volte allo scopo di misurare la crescita radiale del fungo in presenza dei vari trattamenti e includeva un controllo contenente solo il terreno, l'antibiotico e l'inoculo fungino. La crescita radiale è stata misurata valutando l'area della piastra occupata dal fungo in crescita (area totale di una piastra Petri 63,6 cm²); il calcolo dell'area è stato effettuato rispettivamente dopo 4 e 7 giorni dall'inoculo.

3.4 Infezione *in vitro* di semi di *Hordeum vulgare*

I semi di orzo sterilizzati sono stati infettati *in vitro* incubandoli in piastre Petri per tre giorni in una soluzione contenente 1x10⁵ conidi/ml di *F. graminearum*. Ogni tesi comprendeva anche un controllo con lo stesso numero di semi sterili messi ad incubare in una piastra Petri con 8,5 ml di acqua sterile. Tutte le piastre sono state chiuse con pellicola Parafilm e incubate in un termostato a 24° C per tre giorni.

3.5 Infezione *in vivo* delle piante di *Hordeum vulgare*

50 semi di *Hordeum vulgare* (varietà Adonis) sono stati seminati per poter effettuare un'infezione direttamente sulla spiga. I semi sono stati dilavati dalla concia e sterilizzati con ipoclorito di sodio all'1% come già descritto precedentemente. I semi sono stati fatti germinare e in seguito si è eseguito un trattamento di vernalizzazione di 7 giorni a 4 °C su piastra Petri. Successivamente le plantule sono state trapiantate in vasi con terriccio universale e incubate in un fitotrone che regola in automatico umidità, temperatura e fotoperiodo (per 2 mesi fotoperiodo 14 ore, temperatura 19/17 °C luce/buio e ulteriori 2 mesi fotoperiodo 14 ore, temperatura 22/20 °C luce/buio). Dopo 4 mesi

nella fase di fioritura delle spighe si è effettuato l'inoculo con *F. graminearum* utilizzando una soluzione 1×10^5 conidi/ml. Per mezzo di un vaporizzatore a pompa, le spighe sono state abbondantemente inoculate con i conidi. Successivamente le spighe sono state chiuse con un sacchetto di plastica umidificato con acqua deionizzata per 3 giorni. Con il progredire dell'infezione si possono osservare i tipici sintomi della presenza del fungo: una colorazione più scura delle spighette che ingialliscono precocemente, un generale raggrinzimento dei semi e in alcuni casi l'evasione di micelio bianco. Alla fine della maturazione delle spighe, le sementi sono state raccolte e sottoposte ad una selezione in base al livello di infezione. I semi più piccoli, più scuri e caratterizzati dalla presenza di micelio biancastro sono stati classificati come più infetti, distinti dai meno infetti e conservati in due falcon separate a +4 °C.

3.6 Trattamenti con gli inibitori “naturali” acido ferulico e carbonato di sodio

I trattamenti con *trans*-acido ferulico (99% purezza) e carbonato di sodio deca idrato sono stati eseguiti prima o dopo l'infezione con i conidi del fungo. Per ogni tesi sono previsti differenti trattamenti; in ogni caso il numero di semi varia per ogni tesi da un minimo di 20 ad un massimo di 25. Come controllo i semi sono stati trattati con acqua sterile pre- o post-infezione. Ogni trattamento è effettuato sotto cappa in un becker in cui i semi sono incubati con 100 ml di soluzione. I trattamenti sono stati eseguiti utilizzando per l'acido ferulico concentrazioni di 2,5-5-10 mM, per il carbonato di sodio 30-40-50 mM. Sono stati eseguiti trattamenti di breve durata, ovvero 15 minuti; che di lunga durata, per 24 ore. Dopo i trattamenti i semi sono stati sciacquati con acqua sterile e lasciati asciugare per alcuni minuti.

3.7 Valutazione della germinabilità dei semi

Dopo infezione *in vitro* o *in vivo* con conidi del fungo *F. graminearum* ed eventuale trattamento, i semi di orzo sono trasferiti su piastre di vetro sterili contenenti due dischi di carta bibula. Le piastre di vetro sono umidificate con pochi ml d'acqua sterile per favorire la germinazione dei semi, successivamente sono sigillate con pellicola Parafilm ed incubate per 7 giorni in un termostato a 24° C. Al termine dei 7 giorni, per ogni tesi è stata calcolata la percentuale di germinazione delle sementi. I valori di germinabilità osservati sono poi stati analizzati statisticamente con il programma ANOVA (analisi della varianza) ad una via completamente randomizzato per mezzo del test di Student-Newman-Keuls con livello di significatività del 95%.

3.8 Livello di infezione dei coleottili da semi di orzo

La lunghezza media di ogni coleottili da semi germinati è di 4 cm. Per mezzo di una pinza e taglierino preventivamente sterilizzati su fiamma, 4 o 5 sezioni di tessuto vegetale prelevati da ogni tesi sono stati sezionati e tagliati perpendicolarmente al loro asse. Le sezioni della lunghezza di circa 1 cm ciascuna sono state effettuate nella parte basale ossia più vicina al seme, nella parte mediana e nella parte apicale del coleottili. L'obiettivo è di avere 5 o 6 sezioni di tessuto per parte basale, mediana ed apicale da poter incunare su piastre Petri contenenti 10 ml di terreno PDA con antibiotico (aureomicina 100 µg/ml). Prima di depositarle sul terreno di coltura le sezioni dei coleottili sono state sterilizzate per 5 minuti in un becker con ipoclorito di sodio all'1% in acqua sterile. In seguito le sezioni sono state lavate tre volte con acqua sterile. Una volta asciutte, le sezioni di tessuto sono state depositate sul terreno di coltura. Nelle piastre di controllo è necessario aggiungere una soluzione acquosa di etanolo al 20% poiché l'acido ferulico è solubile solo in una soluzione debolmente alcolica. Una volta piastrate tutte le sezioni, le piastre sono chiuse con Parafilm, ed incubate in un termostato a 24° C. Le rimanenti sezioni di orzo sono conservate a -80 °C dentro a provette falcon per la successiva analisi ELISA per la quantificazione della micotossina DON. La crescita del fungo dal tessuto infetto è stata monitorata dopo 4 e 7 giorni dall'incubazione. Per ogni piastra viene identificata la percentuale dei coleottili infettati da *F. graminearum* rispetto al numero totale di sezioni della piastra Petri. Il fungo è riconoscibile dalla sua tipica colorazione biancastra del micelio che vira successivamente a giallo-rossastra. I valori medi di infezione osservati sono poi stati analizzati statisticamente per mezzo del test T di Student.

3.9 Quantificazione della micotossina deossinivalenolo (DON) con il test ELISA

Il test ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay) (Romer Labs) utilizzato per la quantificazione del deossinivalenolo (DON) consiste in un test immunoenzimatico per la determinazione della contaminazione da DON in granella, cereali, noci, mangimi e altre matrici. Il range di quantificazione di questo test va da 0,25 a 5,0 ppm.

Il DON è stato estratto da campioni di coleottili e semi infettati *in vivo* e *in vitro*. I campioni sono stati pesati ed estratti con un rapporto 1:5 (w/v) con il solvente di estrazione (acqua deionizzata). Dopo una centrifugazione di 5 minuti, è stato fatto depositare il pellet con le parti di tessuto macinato e si è aspirato il surnatante che è stato poi nuovamente diluito in differenti rapporti con acqua deionizzata per poter determinare le differenti quantità di micotossina all'interno del range. Il filtrato è stato quindi utilizzato per il test ELISA: 100 µl di soluzione di estrazione (o di standard, 0-0,25-1-2-5 ppm) sono stati aggiunti a 200 µl di DON coniugato con un enzima e, dopo aver

mescolato bene, da questa miscela sono stati prelevati 100 µl da pipettare nei pozzetti ai quali sono legati anticorpi specifici per il DON. La micotossina nel campione o negli standard si lega quindi all'anticorpo fissato nel pozzetto e a quello con l'enzima coniugato; dopo una serie di 5 lavaggi con soluzione "wash buffer", con la successiva aggiunta del substrato enzimatico si sviluppa una colorazione blu inversamente proporzionale alla concentrazione di DON nel campione poichè il DON del campione (o dello standard) compete con il coniugato enzimatico per il legame all'anticorpo anti-DON. In seguito 100 µl di stop solution vengono aggiunti per bloccare la reazione e il colore della soluzione passa da blu a giallo. La lettura dell'Assorbanza con spettrofotometro a 450 nm permette di misurare la densità ottica dei campioni e confrontarla con la densità ottica degli standard. I valori della % di Assorbanza (riferita all'Assorbanza dello standard 0 ppm) e del Log_{10} della concentrazione degli standard (ppm) ha consentito di ottenere la retta di taratura; da questa, per interpolazione e considerando le diluizioni effettuate, si è ottenuta la quantificazione della micotossina DON nei tessuti vegetali analizzati.

4 RISULTATI

4.1 Crescita radiale di *F. graminearum* in presenza di inibitori “naturali”

Lo sviluppo radiale del fungo *F. graminearum* è stato valutato dopo 4 e 7 giorni di crescita in piastra contenente un terreno di coltura addizionato con varie concentrazioni di acido ferulico e carbonato di sodio. Con entrambi i trattamenti, all'aumentare della concentrazione l'effetto inibitore è risultato maggiore; nei trattamenti con il carbonato di sodio, l'effetto più evidente si è osservato utilizzando concentrazioni pari o superiori a 30 mM (**Fig. 1B e 2B**). Tutte le concentrazioni di acido ferulico utilizzate hanno mostrato un elevato effetto inibitore sulla crescita del fungo, comparabile con quello osservato utilizzando 40 e 50 mM di carbonato di sodio (**Fig. 1A e 2A**). In particolare, i trattamenti con 10 mM di acido ferulico e 50 mM di carbonato di sodio bloccavano quasi completamente la crescita del fungo (**Fig. 1 e 2**). Le concentrazioni più efficaci dei due inibitori “naturali” (2,5-5-10 mM per acido ferulico e 30-40-50 mM di carbonato di sodio) sono state prese in considerazione per effettuare i successivi trattamenti *in vitro* e *in vivo*.

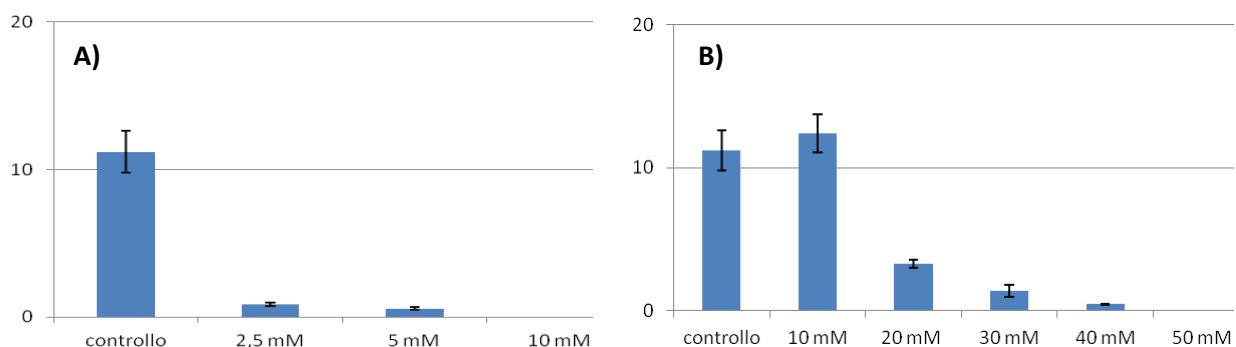


Figura 1: **A)** crescita radiale di *F. graminearum* a 24 °C dopo 4 giorni dall'inoculo in presenza di concentrazioni crescenti di acido ferulico (controllo = assenza di acido ferulico). **B)** crescita radiale di *F. graminearum* a 24 °C dopo 4 giorni dall'inoculo in presenza di concentrazioni crescenti di carbonato di sodio (controllo = assenza di carbonato di sodio). In ordinata è riportata la crescita radiale di *F. graminearum* su piastra, espressa come area di terreno in cm² occupata dal fungo in attiva crescita. In ascissa sono riportate le concentrazioni delle diverse tesi. Le barre rappresentano la deviazione standard. L'esperimento è stato ripetuto 4 volte.

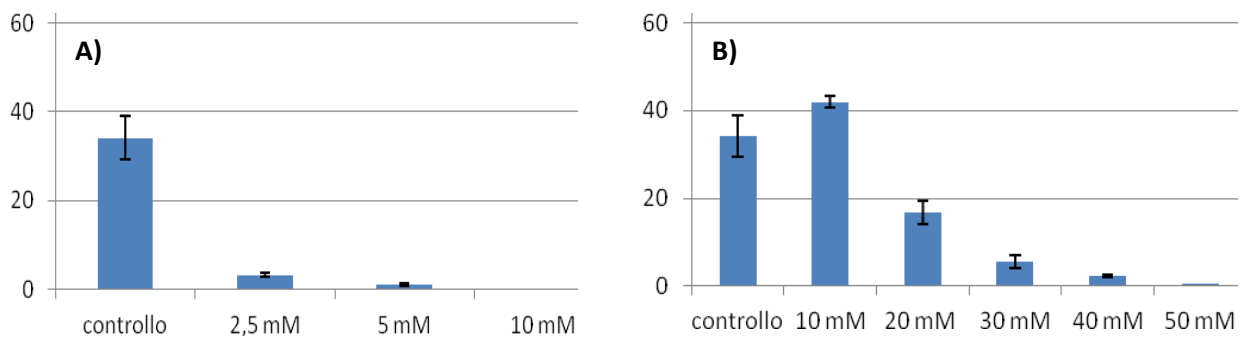


Figura 2: **A)** crescita radiale di *F. graminearum* a 24 °C dopo 7 giorni dall'inoculo in presenza di concentrazioni crescenti di acido ferulico (controllo = assenza di acido ferulico). **B)** crescita radiale di *F. graminearum* a 24 °C dopo 7 giorni dall'inoculo in presenza di concentrazioni crescenti di carbonato di sodio (controllo = assenza di carbonato di sodio). In ordinata è riportata la crescita radiale di *F. graminearum* su piastra, espressa come area di terreno in cm² occupata dal fungo in attiva crescita. In ascissa sono riportate le concentrazioni delle diverse tesi. Le barre rappresentano la deviazione standard. L'esperimento è stato ripetuto 4 volte.

4.2 Trattamenti dei semi di orzo con acido ferulico

Di seguito sono riportati gli effetti del trattamento con acido ferulico dei semi di orzo (cv. Adonis) prima o dopo infezione *in vitro* con il fungo *F. graminearum* sulla germinazione dei semi e sul livello di infezione dei coleottili. I trattamenti della durata di 15 minuti o 24 ore, sono stati effettuati con diverse concentrazioni di acido ferulico.

4.2.1 Effetto dei trattamenti pre-infezione *in vitro*

4.2.1.1 Germinabilità dei semi di orzo

Prima di essere inoculati *in vitro* con conidi di *F. graminearum*, i semi di orzo sono stati pre-trattati con concentrazioni crescenti di acido ferulico per tempi diversi. La % di germinazione è stata valutata dopo 7 giorni dall'inoculo. I semi che avevano subito un trattamento pre-infezione con acido ferulico della durata di 15 minuti mostravano un livello di germinabilità pari o inferiore rispetto a quelli infetti e non trattati con l'inibitore naturale (**Fig. 3A**); rispetto al controllo non infetto (germinabilità dell'88,5%), i semi infetti mostravano una germinabilità pari all'80% circa e comparabile con quella osservata per i semi infetti e trattati con 2,5 mM di acido ferulico. L'analisi statistica non ha rilevato differenze significative tra questi trattamenti (**Tab. 1**). I semi trattati con 5 mM di acido ferulico mostravano invece una germinabilità pari al 70% significativamente ridotta rispetto al controllo (**Fig. 3A e Tab. 1**). Anche i semi pre-trattati con acido ferulico 2,5 mM per 24 ore mostravano un livello di germinabilità non significativamente diverso da quello dei semi di

controllo e dei semi infetti non trattati; i semi trattati con 5 mM di acido ferulico presentavano invece una germinabilità ridotta (55%) significativamente diversa dal controllo (**Fig. 3B e Tab. 1**).

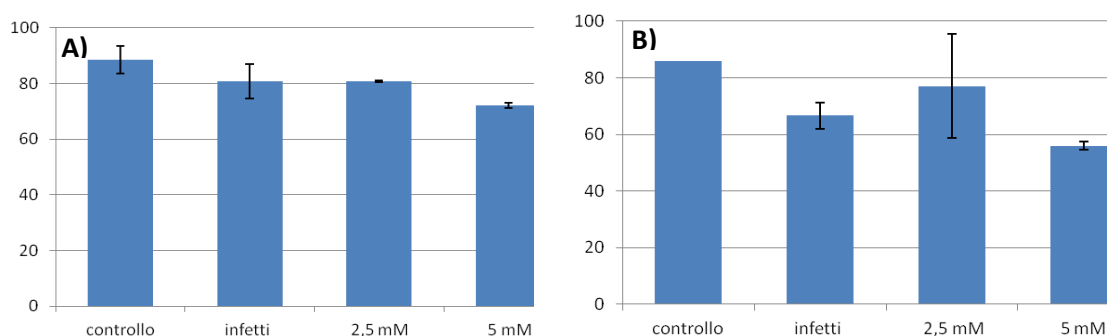


Figura 3: **A)** % di germinazione a 24 °C dei semi di orzo (cv. Adonis) che hanno subito un trattamento pre-infezione della durata di 15 minuti con acido ferulico (2,5-5 mM); **B)** % di germinazione a 24 °C dei semi di orzo (cv. Adonis) che hanno subito un trattamento pre-infezione della durata di 24 ore con acido ferulico (2,5-5 mM). In ordinata sono riportate le % di germinazione, in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con acido ferulico (controllo = semi non trattati e non infetti; infetti = semi non trattati e infettati con *F. graminearum*). Le barre rappresentano la deviazione standard. Gli esperimenti di germinazione sono stati ripetuti 3 volte.

| | Trattamento 15 minuti pre-infezione | Trattamento 24 ore pre-infezione |
|-----------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Controllo | a | a |
| Infetto | ab | bc |
| 2,5 mM acido ferulico | ab | ac |
| 5 mM acido ferulico | b | c |

Tabella 1: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di germinazione ottenute da campioni sani, infetti e trattati per 15 minuti o 24 ore con acido ferulico prima dell'inoculo con il fungo è stata applicata l'analisi della varianza ANOVA ad una via (schema completamente randomizzato), utilizzando il test di Student-Newman-Keuls. Lettere differenti (a, b, c) indicano differenze significative per $p < 0,05$ (livello di significatività del 95%).

4.2.1.2 Livello di infezione dei coleottili di orzo

Il livello di infezione da *F. graminearum* dei coleottili ottenuti dopo germinazione dei semi di orzo che hanno subito un trattamento pre-infezione di 15 minuti è stata verificata incubando sezioni di tessuto per 4 e 7 giorni in piastre Petri contenenti un terreno di coltura per il fungo. Dopo 4 giorni, il 40% circa delle sezioni dei coleottili ottenuti da semi infetti non trattati risultava contaminata da *F. graminearum*. I coleottili di semi pre-trattati con 2,5 mM di acido ferulico mostravano la stessa % di infezione, mentre le sezioni ottenute da semi trattati con 5 mM mostravano un livello di infezione

ridotto (10% circa) (**Fig. 4A**). Dopo 7 giorni, il 65% circa delle sezioni dei coleottili prelevati da semi infetti non trattati risultava infetto da *F. graminearum*. Il trattamento dei semi con acido ferulico alla concentrazione di 5 e 2,5 mM determinava una riduzione del livello di infezione, che mostrava valori compresi tra il 35% e il 45% circa (**Fig. 4B**).

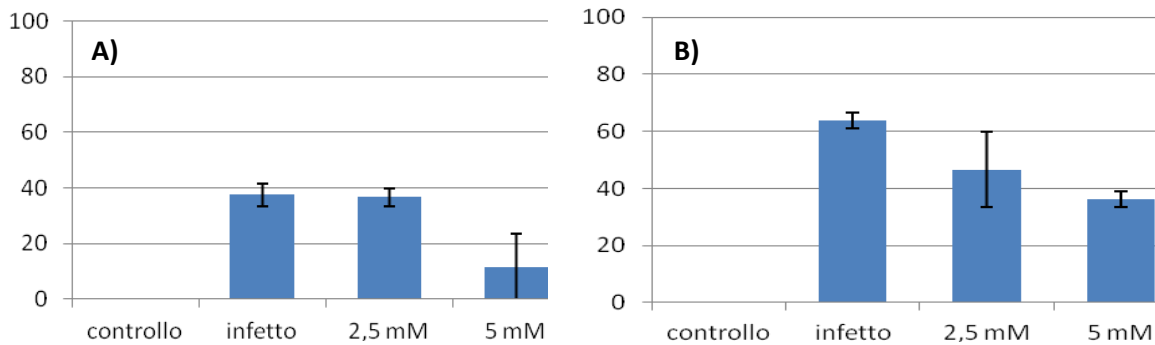


Figura 4: **A)** % media di coleottili infetti, ottenuti da semi pre-trattati con acido ferulico per 15 minuti, dopo 4 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. **B)** % media di coleottili infetti, ottenuti da semi pre-trattati con acido ferulico per 15 minuti, dopo 7 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. In ordinata è riportata la % media dei coleottili infetti, calcolata come % di sezioni infette rispetto al numero totale di sezioni analizzate; in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con acido ferulico (controllo = coleottili da semi non trattati e non infetti; infetto = coleottili da semi non trattati e inoculati con *F. graminearum*). Le barre rappresentano l'errore standard. L'esperimento è stato ripetuto 2 volte.

Tuttavia, l'analisi statistica dei risultati, eseguita utilizzando il test T di Student, ha dimostrato che le % di infezione ottenute con entrambi i trattamenti pre-infezione di 15 minuti con acido ferulico non erano significativamente diverse dalla % di infezione dei coleottili da semi infetti e non trattati (**Tab. 2**).

| Trattamento pre-infezione 15 minuti | 4 giorni | 7 giorni |
|-------------------------------------|----------|----------|
| 2,5 mM acido ferulico | NS | NS |
| 5 mM acido ferulico | NS | NS |

Tabella 2: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di infezione ottenute da campioni non trattati e inoculati con *F. graminearum* e campioni trattati per 15 minuti con acido ferulico prima dell'inoculo con il fungo è stato applicato il test T di Student. P = livello di significatività (p<0,05 = livello di significatività del 95%; p<0,01 = livello di significatività del 99%). NS = non significativo.

Per quanto riguarda il pre-trattamento con acido ferulico per 24 ore, dopo 4 giorni di incubazione delle sezioni di coleottili in piastra, la percentuale di infezione dei tessuti ottenuti da semi infetti e trattati con acido ferulico 2,5 mM e 5 mM era piuttosto alta (tra il 40% e il 60% circa) se confrontato con il 30% dei tessuti prelevati da semi infetti non trattati (**Fig. 5A**). A 7 giorni, il 60% circa dei coleottili prelevati da semi infetti non trattati risultavano contaminati dal fungo, mentre quelli ottenuti dopo trattamento con acido ferulico 2,5 e 5 mM presentavano un livello di infezione tra il 50% e il 60% circa (**Fig. 5B**).

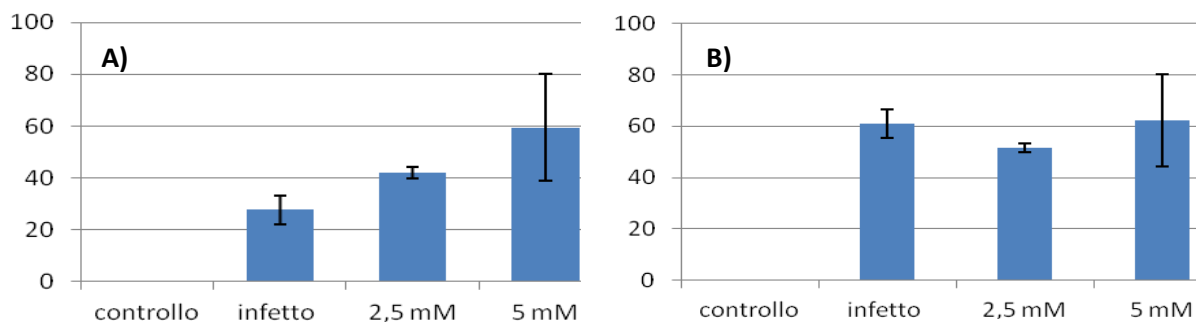


Figura 5: **A)** % media di coleottili infetti, ottenuti da semi pre-trattati con acido ferulico per 24 ore, dopo 4 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. **B)** % media di coleottili infetti, ottenuti da semi pre-trattati con acido ferulico per 24 ore, dopo 7 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. In ordinata è riportata la % media dei coleottili infetti, calcolata come % di sezioni infette rispetto al numero totale di sezioni analizzate; in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con acido ferulico (controllo = coleottili da semi non trattati e non infetti; infetto = coleottili da semi non trattati e inoculati con *F. graminearum*). Le barre rappresentano l'errore standard. L'esperimento è stato ripetuto 2 volte.

Anche in questo caso l'analisi statistica dei risultati con il test T di Student ha dimostrato che le % di infezione ottenute con entrambi i trattamenti pre-infezione di 24 ore con acido ferulico non erano significativamente diverse dalla % di infezione di coleottili da semi infetti e non trattati (**Tab. 3**).

| Trattamento pre-infezione 24 ore | 4 giorni | 7 Giorni |
|----------------------------------|----------|----------|
| 2,5 mM acido ferulico | NS | NS |
| 5 mM acido ferulico | NS | NS |

Tabella 3: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di infezione ottenute da campioni non trattati e inoculati con *F. graminearum* e campioni trattati per 24 ore con acido ferulico prima dell'inoculo con il fungo è stato applicato il test T di Student. P = livello di significatività (p<0,05 = livello di significatività del 95%; p<0,01 = livello di significatività del 99%). NS = non significativo.

4.2.2 Effetto dei trattamenti post-infezione *in vitro*

4.2.2.1 Germinabilità dei semi di orzo

Dopo essere stati inoculati *in vitro* con conidi del fungo, i semi di orzo sono stati trattati con concentrazioni crescenti di acido ferulico per tempi diversi (15 minuti o 24 ore). La % di germinazione è stata valutata dopo 7 giorni dall'inoculo in piastre di vetro con carta bibula. I semi che hanno subito un trattamento post-infezione di 15 minuti con 2,5 mM di acido ferulico mostravano una percentuale di germinabilità non significativamente diversa dal controllo non trattato (germinabilità dell'85% circa); i trattamenti con 5 e 10 mM di acido ferulico presentavano valori di germinabilità dell'80% e 70% circa, non significativamente diversi da quelli dei semi di controllo e dei semi infetti non trattati, che avevano una germinabilità del 65% circa (**Fig. 6A e Tab 4**). Al contrario, i semi trattati post-infezione con acido ferulico per 24 ore hanno mostrato un livello di germinabilità significativamente inferiore rispetto ai semi di controllo (85% circa) e ai semi infetti non trattati (80% circa); più precisamente, i trattamenti con 2,5 mM e 5 mM di acido ferulico riducevano drasticamente la germinabilità a valori compresi tra il 15% e il 25% circa (**Fig. 6B e Tab 4**).

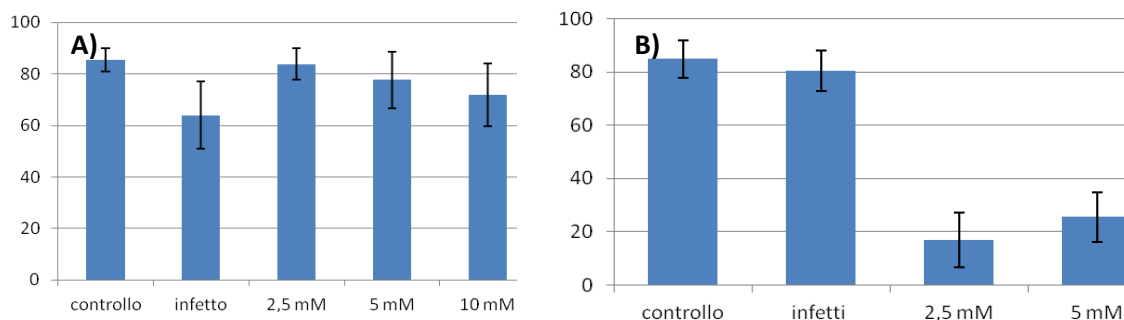


Figura 6: **A)** % di germinazione a 24 °C dei semi di orzo (cv. Adonis) inoculati *in vitro* con *F. graminearum* e trattati post-infezione per 15 minuti con acido ferulico; **B)** % di germinazione a 24 °C dei semi di orzo (cv. Adonis) inoculati *in vitro* con *F. graminearum* e trattati post-infezione per 24 ore con acido ferulico. In ordinata sono riportate le % di germinazione, in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con acido ferulico (controllo = semi non infetti e non trattati; infetti = semi infettati con *F. graminearum* e non trattati). Le barre rappresentano la deviazione standard. Gli esperimenti di germinazione sono stati ripetuti almeno 6 volte per i trattamenti di 15 minuti e 3 volte per quelli di 24 ore.

| | Trattamento 15 ore post-infezione | Trattamento 24 ore post-infezione |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Controllo | a | a |
| Infetto | b | a |
| 2,5 mM acido ferulico | a | b |
| 5 mM acido ferulico | ab | b |
| 10 mM acido ferulico | ab | - |

Tabella 4: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di germinazione ottenute da campioni sani, infetti e trattati per 15 minuti o 24 ore con acido ferulico dopo l'inoculo con il fungo è stata applicata l'analisi della varianza ANOVA ad una via (schema completamente randomizzato), utilizzando il test di Student-Newman-Keuls. Lettere differenti (a, b) indicano differenze significative per $p < 0,05$ (livello di significatività del 95%).

4.2.2.2 Livello di infezione dei coleottili di orzo

Il livello di infezione da *F. graminearum* dei coleottili ottenuta dopo germinazione dei semi di orzo trattati post-infezione per 15 minuti è stata verificata incubando sezioni di tessuto per 4 e 7 giorni in piastre Petri contenenti un terreno di coltura per il fungo. Dopo 4 giorni, il 35% circa delle sezioni dei coleottili ottenuta da semi infetti non trattati risultava contaminata da *F. graminearum*. Le sezioni dei coleottili da semi infetti e trattati con acido ferulico 2,5, 5 e 10 mM presentava una percentuale di infezione rispettivamente del 15, 10 e 7% circa (**Fig. 7A**). Dopo 7 giorni il 60% circa delle sezioni dei coleottili prelevate da semi infetti non trattati risultava infetto da *F. graminearum*. Il trattamento dei semi con acido ferulico alle concentrazioni di 2,5, 5 e 10 mM determinava una riduzione del livello di infezione, con una percentuale di tessuti infetti del 20% circa (**Fig. 7B**).

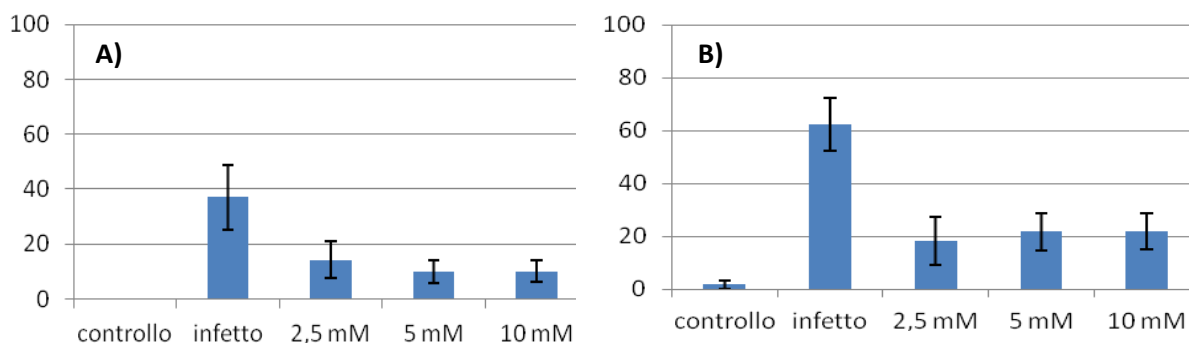


Figura 7: **A)** % di infezione dei coleottili ottenuta da semi trattati post-infezione con acido ferulico per 15 minuti dopo 4 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. **B)** % di infezione dei coleottili, ottenuta da semi trattati post-infezione con acido ferulico per 15 minuti, dopo 7 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. In ordinata è riportata la % media dei coleottili infetti, calcolata come % di sezioni infette rispetto al numero totale di sezioni analizzate; in ascissa le

concentrazioni dei trattamenti con acido ferulico (controllo = coleottili da semi non infetti e non trattati; infetto = coleottili da semi inoculati con *F. graminearum* e non trattati). Le barre rappresentano l'errore standard. L'esperimento è stato ripetuto 8 volte.

L'analisi statistica dei risultati, eseguita utilizzando il test T di Student, ha dimostrato che le % di infezione ottenute con tutti i trattamenti post-infezione di 15 minuti con acido ferulico erano significativamente diverse dalla % di infezione dei coleottili da semi infetti e non trattati. Mentre il trattamento alla concentrazione di 2,5 mM a 4 giorni mostrava un livello di significatività del 95%, i trattamenti alle concentrazioni di 5-10 mM il livello di significatività già del 99% (**Tab. 5**).

| Trattamenti post-infezione 15 minuti | 4 giorni | 7 giorni |
|--------------------------------------|----------|----------|
| 2,5 mM acido ferulico | p < 0,05 | p < 0,01 |
| 5 mM acido ferulico | p < 0,01 | p < 0,01 |
| 10 mM acido ferulico | p < 0,01 | p < 0,01 |

Tabella 5: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di infezione ottenute da campioni non trattati e inoculati con *F. graminearum* e campioni trattati per 15 minuti con acido ferulico dopo dell'inoculo con il fungo è stato applicato il test T di Student. P = livello di significatività (p<0,05 = livello di significatività del 95%; p<0,01 = livello di significatività del 99%). NS = non significativo.

Poiché i trattamenti con acido ferulico post-infezione della durata di 24 ore causavano un basso livello di germinabilità, per questo trattamento non è stato valutato il livello di infezione dei coleottili.

4.2.3 Effetto dei trattamenti post-infezione *in vivo*

I semi utilizzati in questi esperimenti sono stati ottenuti da spighe di orzo (cv. Adonis) inoculate con conidi di *F. graminearum*. Di seguito sono riportati gli effetti del trattamento con acido ferulico dei semi dopo infezione *in vivo* sulla germinazione dei semi e sul livello di infezione dei coleottili. I trattamenti, della durata di 15 minuti, sono stati effettuati con 2,5, 5 e 10 mM di acido ferulico.

4.2.3.1 Germinabilità dei semi di orzo

La % di germinazione dei semi di orzo infettati *in vivo* e trattati post-infezione per 15 minuti con acido ferulico è stata valutata dopo 7 giorni di incubazione in piastra su carta bibula bagnata. I semi trattati con 2,5 mM e 5 mM di acido ferulico mostravano una percentuale di germinabilità compresa tra il 40 e 60% significativamente superiore ai semi infetti non trattati (circa 20% di germinazione)

(Fig. 8 e Tab. 6); in particolare, i semi trattati con 2,5 mM di acido ferulico mostravano una germinabilità media del 70% circa, non significativamente diversa da quella del controllo (circa 90% di germinazione). La germinabilità dei semi trattati con 10 mM acido ferulico (35% circa) non era significativamente diversa da quella dei semi infetti non trattati (Fig. 8 e Tab. 6).

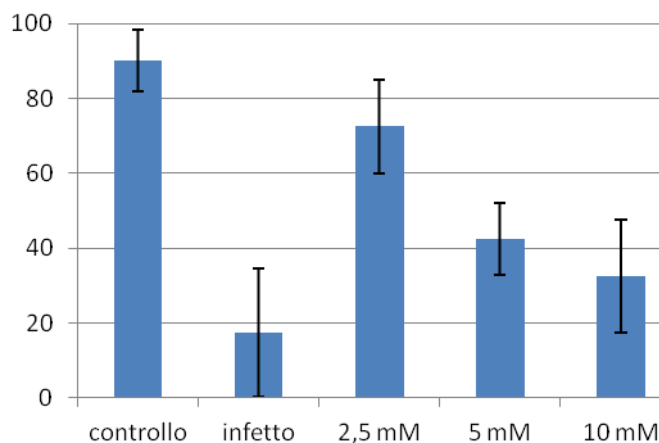


Figura 8: % di germinazione a 24 °C dei semi di orzo (cv. Adonis) infettati *in vivo* trattati post-infezione per 15 minuti con acido ferulico (2,5-5-10 mM). In ordinata sono riportate le % di germinazione, in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con acido ferulico (controllo = semi non trattati e non infetti; infetti = semi non trattati e infettati con *F. graminearum*). Le barre rappresentano la deviazione standard. L'esperimento di germinazione è stato ripetuto almeno 4 volte.

| | Trattamento 15 minuti post-infezione |
|-----------------------|--------------------------------------|
| Controllo | a |
| Infetto | c |
| 2,5 mM acido ferulico | a |
| 5 mM acido ferulico | b |
| 10 mM acido ferulico | bc |

Tabella 6: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di germinazione ottenute da campioni sani, infetti e trattati per 15 minuti con acido ferulico dopo l'inoculo *in vivo* con il fungo è stata applicata l'analisi della varianza ANOVA ad una via (schema completamente randomizzato), utilizzando il test di Student-Newman-Keuls. Lettere differenti (a, b, c) indicano differenze significative per $p < 0,05$ (livello di significatività del 95%).

4.2.3.2 Livello di infezione dei coleottili di orzo

Il livello di infezione da *F. graminearum* dei coleottili ottenuta da semi di orzo infettati *in vivo* e poi trattati per 15 minuti con acido ferulico è stata verificata dopo 4 e 7 giorni di incubazione in piastre Petri contenenti terreno di coltura per il fungo. Sia a 4 che a 7 giorni dall'incubazione la percentuale di infezione dei coleottili dei semi infetti trattati è risultata inferiore rispetto a quella dei coleottili di semi infetti non trattati. In particolare, dopo 4 giorni, mentre quasi l'80% dei coleottili di semi infetti non trattati era contaminato da *F. graminearum*, i coleottili di semi trattati con 2,5-5 e 10 mM di acido ferulico presentavano un livello di infezione medio del 30%, 45% e 40% circa, rispettivamente (**Fig. 9A**). Dopo 7 giorni quasi il 90% dei coleottili da semi infetti non trattati era contaminato dal fungo mentre i coleottili da semi trattati con 2,5-5 e 10 mM di acido ferulico mostravano una percentuale di infezione del 45%, 60% e 55% circa, rispettivamente (**Fig. 9B**).

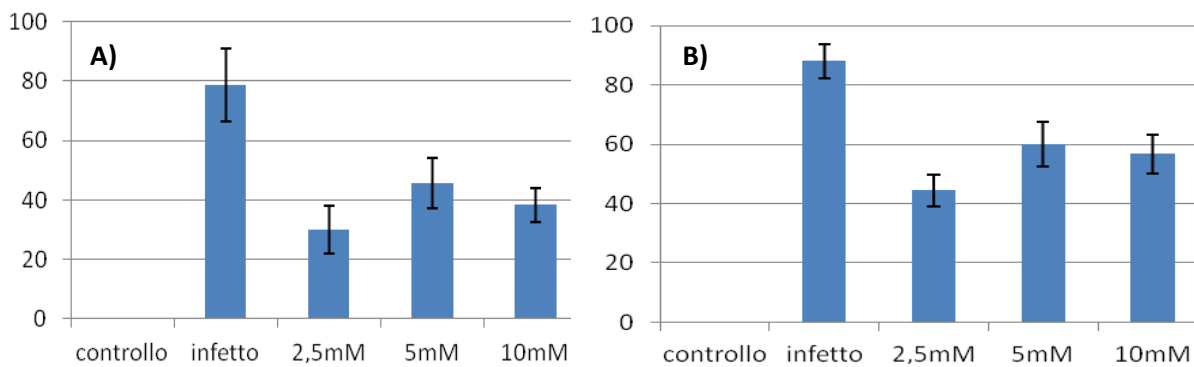


Figura 9: **A)** % di infezione dei coleottili, ottenuta da semi inoculati *in vivo* e trattati 15 minuti con acido ferulico, dopo 4 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. **B)** % di infezione dei coleottili, ottenuta da semi inoculati *in vivo* e trattati 15 minuti con acido ferulico, dopo 7 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. In ordinata è riportata la % media dei coleottili infetti, calcolata come % di sezioni infette rispetto al numero totale di sezioni analizzate; in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con acido ferulico (controllo = coleottili da semi non trattati e non infetti; infetto = coleottili da semi inoculati con *F. graminearum* e non trattati). Le barre rappresentano l'errore standard. L'esperimento è stato ripetuto almeno 6 volte.

L'analisi statistica dei risultati, eseguita utilizzando il test T di Student, ha dimostrato che le % di infezione ottenute trattando i semi infetti con acido ferulico per 15 minuti erano significativamente diverse dalla % di infezione dei coleottili prelevati da semi infetti e non trattati (**Tabella 7**). In particolare, i livelli di infezione erano significativamente diversi ad entrambi i tempi analizzati (4 e 7 giorni) e con tutte le concentrazioni di acido ferulico testate, con un livello di significatività del 99% dopo 7 giorni.

| Trattamento post-infezione 15 minuti | 4 giorni | 7 giorni |
|--------------------------------------|----------|----------|
| 2,5 mM acido ferulico | p < 0,01 | p < 0,01 |
| 5 mM acido ferulico | p < 0,05 | p < 0,01 |
| 10 mM acido ferulico | p < 0,05 | p < 0,01 |

Tabella 7: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di infezione ottenute da campioni non trattati inoculati *in vivo* con *F. graminearum* e campioni trattati post-infezione per 15 minuti con acido ferulico è stato applicato il test T di Student. P = livello di significatività (p<0,05 = livello di significatività del 95%; p<0,01 = livello di significatività del 99%). NS = non significativo.

4.3 Trattamenti dei semi di orzo con carbonato di sodio

Di seguito sono mostrati gli effetti del trattamento di 15 minuti con carbonato di sodio dopo infezione *in vitro* e *in vivo* con *F. graminearum* sulla germinazione dei semi di orzo (cv. Adonis) e sul livello di infezione dei coleottili ottenuti.

4.3.1 Effetto dei trattamenti post-infezione *in vitro*

4.3.1.1 Germinabilità dei semi di orzo

Dopo essere stati inoculati *in vitro* con conidi del fungo, i semi di orzo sono stati trattati con concentrazioni crescenti di carbonato di sodio per 15 minuti. La % di germinazione è stata valutata dopo 7 giorni dall'inoculo in piastre di vetro con carta bibula. I semi che avevano subito un trattamento con sodio carbonato 50 mM mostravano un livello di germinabilità dell'85% circa, non significativamente diverso da quello delle sementi sterili del controllo e significativamente maggiore del livello di germinabilità delle sementi infette non trattate (**Fig. 10** e **Tab. 8**). I restanti trattamenti (30-40 mM) presentavano invece una percentuale di germinabilità non significativamente diversa da quella dei semi infetti non trattati (circa 65%) (**Fig. 10** e **Tab. 8**).

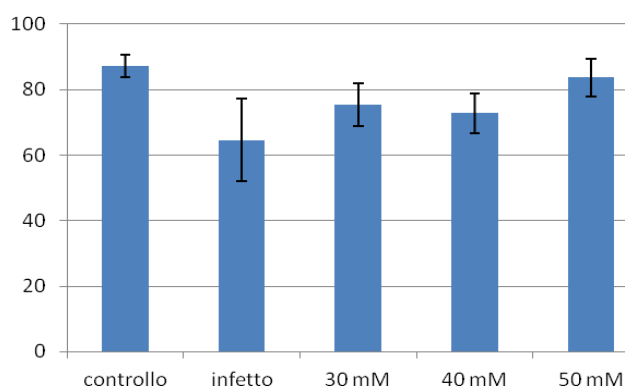


Figura 10: % di germinazione a 24 °C dei semi di orzo (cv. Adonis) infettati *in vitro* e che hanno subito un trattamento post-infezione di 15 minuti con carbonato di sodio (30-40-50 mM). In ordinata sono riportate le % di germinazione, in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con carbonato di sodio (controllo = semi non trattati e non infetti; infetti = semi non trattati e infettati con *F. graminearum*). Le barre rappresentano la deviazione standard. L'esperimento di germinazione è stato ripetuto almeno 5 volte.

| | Trattamento 15 minuti post-infezione |
|--------------------------|--------------------------------------|
| Controllo | a |
| Infetto | c |
| 30 mM carbonato di sodio | bc |
| 40 mM carbonato di sodio | bc |
| 50 mM carbonato di sodio | ab |

Tabella 8: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di germinazione ottenute da campioni sani, infetti e trattati per 15 minuti con sodio carbonato dopo l'inoculo con il fungo è stata applicata l'analisi della varianza ANOVA ad una via (schema completamente randomizzato), utilizzando il test di Student-Newman-Keuls. Lettere differenti (a, b, c) indicano differenze significative per $p < 0,05$ (livello di significatività del 95%).

4.3.1.2 Livello di infezione dei coleottili di orzo

Il livello di infezione da *F. graminearum* delle sezioni di coleottili ottenute da semi di orzo infettati *in vitro* e poi trattati per 15 minuti con carbonato di sodio è stata verificata dopo 4 e 7 giorni di incubazione in piastre Petri contenenti terreno di coltura per il fungo. Dopo 4 giorni, circa il 35% dei coleottili di semi infetti non trattati risultava contaminato da *F. graminearum*, mentre i coleottili di semi trattati con 30, 40 e 50 mM di carbonato di sodio presentavano un livello di infezione medio del 30%, 45% e 5% circa, rispettivamente (**Fig. 11A**). Dopo 7 giorni quasi il 60% dei coleottili da semi infetti non trattati era contaminato dal fungo mentre coleottili da semi trattati con 30, 40 e 50

mM di carbonato di sodio mostravano una percentuale di infezione rispettivamente del 50, 70 e 15% circa (**Fig. 11B**).

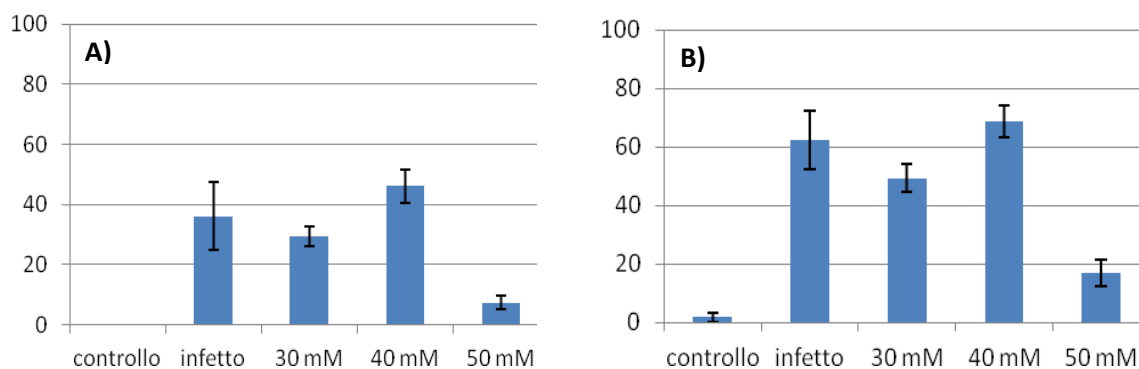


Figura 11: **A)** % di infezione dei coleotili, ottenuta da semi inoculati *in vitro* e trattati 15 minuti con carbonato di sodio, dopo 4 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. **B)** % di infezione dei coleotili, ottenuta da semi inoculati *in vitro* e trattati 15 minuti con carbonato di sodio, dopo 7 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. In ordinata è riportata la % media dei coleotili infetti, calcolata come % di sezioni infette rispetto al numero totale di sezioni analizzate; in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con carbonato di sodio (controllo = coleotili da semi non trattati e non infetti; infetto = coleotili da semi inoculati con *F. graminearum* e non trattati). Le barre rappresentano l'errore standard. L'esperimento è stato ripetuto 10 volte.

L'analisi statistica dei risultati, eseguita utilizzando il test T di Student, ha dimostrato che solo il trattamento con 50 mM di carbonato di sodio dava una % di infezione significativamente diversa dalla % di infezione dei coleotili prelevati da semi infetti e non trattati, con un livello di significatività del 99% sia a 4 che a 7 giorni dall'incubazione in piastra (**Tab. 9**).

| Trattamenti post-infezione 15 minuti | 4 giorni | 7 giorni |
|--------------------------------------|----------|----------|
| 30 mM carbonato di sodio | NS | NS |
| 40 mM carbonato di sodio | NS | NS |
| 50 mM carbonato di sodio | p < 0,01 | p < 0,01 |

Tabella 9: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di infezione ottenute da campioni non trattati inoculati *in vitro* con *F. graminearum* e campioni trattati post-infezione per 15 minuti con carbonato di sodio è stato applicato il test T di Student. P = livello di significatività (p<0,05 = livello di significatività del 95%; p<0,01 = livello di significatività del 99%). NS = non significativo.

4.3.2 Effetto dei trattamenti post-infezione *in vivo*

I semi utilizzati in questi esperimenti sono stati ottenuti da spighe di orzo (cv. Adonis) inoculate con conidi di *F. graminearum*. Di seguito sono riportati gli effetti del trattamento con carbonato di sodio dopo infezione *in vivo* sulla germinazione dei semi e sul livello di infezione dei coleottili. I trattamenti della durata di 15 minuti, sono stati effettuati con 30, 40 e 50 mM di carbonato di sodio.

4.3.2.1 Germinabilità dei semi di orzo

Dopo essere stati inoculati *in vivo* con conidi del fungo, i semi di orzo sono stati trattati con concentrazioni crescenti di carbonato di sodio per 15 minuti. La % di germinazione è stata valutata dopo 7 giorni dall'inoculo in piastre di vetro con carta bibula. Tutte le concentrazioni di carbonato di sodio testate davano % di germinazione dei semi significativamente superiori alle sementi infette non trattate ma significativamente inferiori al controllo (**Fig. 12** e **Tab. 10**). In particolare, mentre il controllo mostrava una % di germinazione dell'85% e i semi infetti non trattati del 10% circa, con 30, 40 e 50 mM di carbonato di sodio si aveva un livello di germinabilità del compresa tra il 35% e il 50% (**Fig. 12**).

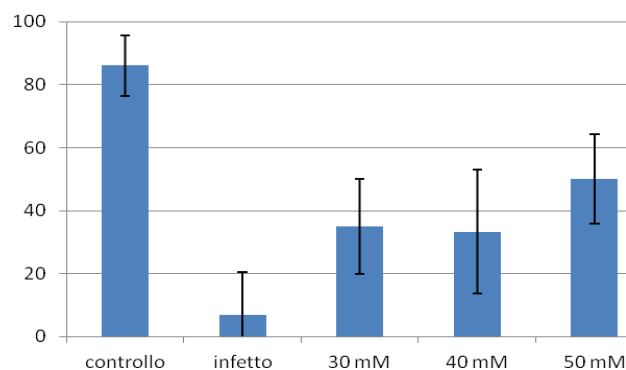


Figura 12: % di germinazione a 24 °C dei semi di orzo (cv. Adonis) infettati *in vivo* e che hanno subito un trattamento post-infezione di 15 minuti con carbonato di sodio (30-40-50 mM). In ordinata sono riportate le % di germinazione, in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con carbonato di sodio (controllo = semi non trattati e non infetti; infetti = semi non trattati e infettati con *F. graminearum*). Le barre rappresentano la deviazione standard. L'esperimento di germinazione è stato ripetuto almeno 6 volte.

| | Trattamento 15 minuti post-infezione |
|--------------------------|---|
| Controllo | a |
| Infetto | c |
| 30 mM carbonato di sodio | b |
| 40 mM carbonato di sodio | b |
| 50 mM carbonato di sodio | b |

Tabella 10: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di germinazione ottenute da campioni sani, infetti e trattati per 15 minuti con carbonato di sodio dopo l'inoculo con il fungo è stata applicata l'analisi della varianza ANOVA ad una via (schema completamente randomizzato), utilizzando il test di Student-Newman-Keuls. Lettere differenti (a, b, c) indicano differenze significative per $p < 0,05$ (livello di significatività del 95%).

4.3.2.2 Livello di infezione dei coleottili di orzo

Il livello di infezione da *F. graminearum* dei coleottili ottenuti da semi di orzo infettati *in vivo* e trattati per 15 minuti con carbonato di sodio è stata verificata dopo 4 e 7 giorni di incubazione in piastre Petri contenenti terreno di coltura per il fungo. Dopo 4 giorni il 35% delle sezioni di coleottili da semi trattati con 50 mM di sodio carbonato erano infetti, una percentuale nettamente inferiore rispetto ai coleottili da semi infetti non trattati (80% circa). Con concentrazioni di 30 e 40 mM di carbonato di sodio, il livello d'infezione dei coleottili risultava comparabile con quello dei coleottili da semi infetti non trattati (**Fig. 13A**). Dopo 7 giorni, circa il 45% dei coleottili trattati con 50 mM di carbonato di sodio erano infetti, mentre il livello d'infezione dei coleottili di semi infetti non trattati e trattati con 30 e 40 mM raggiungeva il 90% circa (**Fig. 13B**).

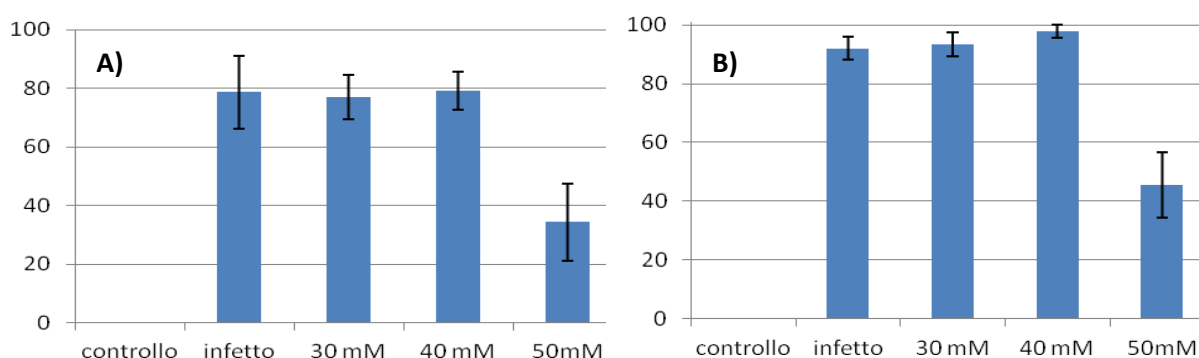


Figura 13: **A)** % di infezione dei coleottili, ottenuta da semi inoculati *in vivo* e trattati 15 minuti con carbonato di sodio, dopo 4 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. **B)** % di infezione dei coleottili, ottenuta da semi inoculati *in vivo* e trattati 15 minuti con carbonato di sodio, dopo 7 giorni di incubazione in piastra a 24 °C. In ordinata è riportata la %

media dei coleottili infetti, calcolata come % di sezioni infette rispetto al numero totale di sezioni analizzate; in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con carbonato di sodio (controllo = coleottili da semi non trattati e non infetti; infetto = coleottili da semi inoculati con *F. graminearum* e non trattati). Le barre rappresentano l'errore standard. L'esperimento è stato ripetuto almeno 6 volte.

L'analisi statistica dei risultati, eseguita utilizzando il test T di Student, ha dimostrato che solo il trattamento con 50 mM di carbonato di sodio era significativamente efficace nel limitare l'infezione fungina, con un livello di significatività del 95% e del 99% dopo 4 e 7 giorni, rispettivamente (**Tab. 11**).

| Trattamenti post-infezione 15 minuti | 4 giorni | 7 giorni |
|--------------------------------------|----------|----------|
| 30 mM carbonato di sodio | NS | NS |
| 40 mM carbonato di sodio | NS | NS |
| 50 mM carbonato di sodio | p < 0,05 | p < 0,01 |

Tabella 11: Per verificare la significatività delle differenze tra le % medie di infezione ottenute da campioni non trattati inoculati *in vivo* con *F. graminearum* e campioni trattati post-infezione per 15 minuti con carbonato di sodio è stato applicato il test T di Student. P = livello di significatività (p<0,05 = livello di significatività del 95%; p<0,01 = livello di significatività del 99%). NS = non significativo.

4.4 Quantificazione della micotossina deossinivalenolo (DON) su tessuti infetti e trattati con inibitori

I trattamenti risultati più efficaci nel contenere l'infezione di *F. graminearum* (15 minuti post-infezione con 2,5 e 5 mM acido ferulico e 50 mM carbonato di sodio) sono stati testati per valutarne l'efficacia nel ridurre la contaminazione da DON nei tessuti infetti. Per questa analisi sono stati selezionati campioni di semi infettati *in vitro* ed *in vivo* e coleottili ottenuti da questi semi infetti. I risultati del test ELISA hanno mostrato che l'infezione *in vitro* causava sia nei semi che nei coleottili una contaminazione da DON inferiore a 0,5 ppm (dati non mostrati) e quindi di molto inferiore al limite di legge fissato per i cereali non trasformati (1,25 ppm). Per questo motivo i dati ottenuti non sono risultati significativi.

Per quanto riguarda i campioni ottenuti da infezioni *in vivo*, sia i coleottili che i semi sono risultati pesantemente contaminati da DON (65 e 20 ppm, rispettivamente). Tuttavia nei coleottili trattati con i due inibitori "naturali" si è verificata una significativa diminuzione della quantità di DON rispetto ai campioni infetti non trattati; in particolare, il trattamento con 2,5 mM di acido ferulico ha ridotto la concentrazione di DON a 5 ppm, il trattamento con 5 mM a 25 ppm, mentre il trattamento con 50 mM di carbonato di sodio a 20 ppm circa (**Fig. 14A**). Per quanto riguarda i semi, solo i

trattamenti con acido ferulico sono risultati efficaci nel ridurre significativamente la contaminazione da DON; rispetto ai semi infetti (circa 20 ppm) il trattamento con acido ferulico 2,5 mM ha dimezzato la contaminazione di DON, mentre il trattamento con 5 mM ne ha limitato a 2,5 ppm la concentrazione. Anche il carbonato di sodio 50 mM ha ridotto livello di micotossina nei semi infetti ma solo parzialmente (**Fig. 14B**).

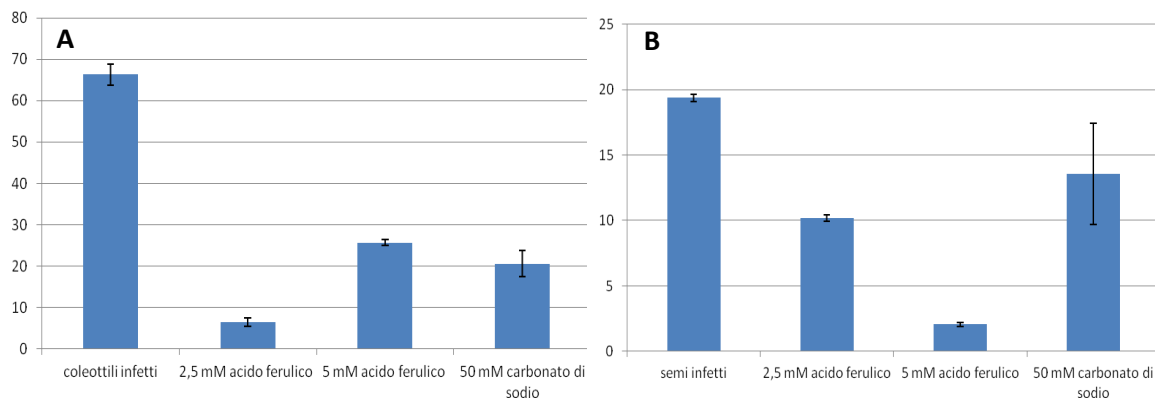


Fig 14: **A)** quantificazione della micotossina DON in coleottili da semi inoculati *in vivo* con *F. graminearum* e trattati 15 minuti post-infezione con acido ferulico e carbonato di sodio. **B)** quantificazione della micotossina DON in semi inoculati *in vivo* con *F. graminearum* e trattati 15 minuti post-infezione con acido ferulico e carbonato di sodio. In ordinata è riportata la concentrazione di DON espressa in ppm (mg/Kg); in ascissa le concentrazioni dei trattamenti con acido ferulico (2,5 e 5 mM) e carbonato di sodio (50 mM). Coleottili infetti e semi infetti = tessuti inoculati con *F. graminearum* e non trattati. Le barre rappresentano la deviazione standard. L'esperimento è stato ripetuto 3 volte.

| Trattamento 15 minuti post-infezione <i>in vivo</i> | Coleottili | Semi |
|---|------------|------|
| Infetto | a | a |
| 2,5 mM acido ferulico | c | b |
| 5 mM acido ferulico | b | c |
| 50 mM carbonato di sodio | b | b |

Tabella 12: Per verificare la significatività delle differenze tra le concentrazioni della tossina DON nei tessuti vegetali infetti e/o trattati per 15 minuti con acido ferulico (2,5-5 mM) e carbonato di sodio (50 mM) dopo inoculo *in vivo* con *F. graminearum* è stata applicata l'analisi della varianza ANOVA ad una via (schema completamente randomizzato), utilizzando il test di Student-Newman-Keuls. Lettere differenti (a, b, c) indicano differenze significative per $p < 0,05$ (livello di significatività del 95%).

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il fungo patogeno *F. graminearum* può contaminare le sementi di orzo da birra e quindi determinare sia una perdita quantitativa, dovuta a riduzione delle dimensioni, del peso e delle componenti amidacee, cellulolitiche e proteiche dei semi, sia qualitativa dovuta alla contaminazione delle sementi da micotossine tricoteceni quali il DON, di cui il fungo è noto produttore (Clear et al., 1996). Inoltre il fungo causa importanti riduzioni della percentuale di germinazione dei semi di orzo durante la fase di maltazione ed è responsabile del difetto chiamato “gushing” poiché produce nel malto ottenuto da seme infetto elevati livelli di idrofobine (Tuija Sarlin et al., 2005).

Per ridurre la contaminazione delle sementi di orzo da birra da parte di *F. graminearum* e della sua micotossina DON è importante innanzitutto eseguire una efficace lotta preventiva in campo, utilizzando pratiche agricole quali l'avvicendamento colturale, la corretta gestione del terreno per quanto riguarda fertilizzazione e irrigazione, l'utilizzo di sementi conciate e la scelta di varietà resistenti al fungo. Tuttavia la lotta a questo fungo può essere effettuata anche durante la fase di post-raccolta attraverso il controllo di parametri quali la temperatura e l'umidità e l'esecuzione di lavaggi con acqua basica. Inoltre per limitare le problematiche legate all'utilizzo di sementi infette nella fase di maltazione, è possibile eseguire una cernita preventiva delle sementi visibilmente infettate. Tuttavia questo tipo di pratiche e interventi è ancora parzialmente inefficace; risulta quindi importante identificare nuove strategie di lotta nei confronti di questo patogeno, ad esempio utilizzando sostanze G.R.A.S. con attività antimicrobica. Il trattamento con sostanze G.R.A.S. avrebbe il vantaggio di essere accettato dal consumatore in quanto senza conseguenze negative sulla sicurezza igienica e qualitativa del prodotto finale, a differenza dei fungicidi sintetici che pongono problemi di residui tossici nei prodotti trattati (Janisiewicz, 2004). Tra le sostanze G.R.A.S., in questa tesi sono stati presi in esame l'acido ferulico ed il sodio carbonato. L'acido ferulico è un precursore della biosintesi della lignina nelle piante ed è il più abbondante tra i composti fenolici presenti nelle pareti cellulari delle specie cerealicole (Kim et al., 2006), ha attività antifungina ed inoltre è in grado di inibire l'espressione dei geni Tri coinvolti nella sintesi della micotossina DON (Boutigny et al., 2009). Il carbonato di sodio è noto in letteratura per le sue proprietà antifungine, è considerato un decontaminante di DON (Trebholm et al., 1992), viene utilizzato dalle ditte di confezionamento dei limoni (Smilanick et al., 1999) ed è considerato un additivo alimentare non sottoposto a restrizioni.

In questa tesi è stata verificata l'efficacia del trattamento di semi di orzo da birra con acido ferulico e sodio carbonato nei confronti di *F. graminearum*. Inizialmente, mediante esperimenti di crescita radiale, si è verificato quali concentrazioni risultavano più efficaci nel bloccare la crescita del fungo

in vitro. Queste concentrazioni sono state utilizzate per trattare per tempi diversi semi di orzo di una varietà da birra (cv Adonis) sia prima che dopo infezione con conidi del fungo. Negli esperimenti sono stati utilizzati sia semi inoculati *in vitro* che semi ottenuti da spighe infette (*in vivo*).

I trattamenti pre-infezione *in vitro* con acido ferulico (concentrazioni di 2,5-5 mM) sono stati effettuati per 15 minuti e 24 ore, ma sono risultati entrambi inefficaci nel ridurre il livello di infezione dei coleottili ottenuti dai semi di orzo infetti e trattati. Anche i trattamenti post-infezione con acido ferulico sono stati effettuati per 15 minuti e 24 ore; mentre i trattamenti prolungati hanno ridotto drasticamente la germinabilità dei semi rispetto alle sementi infette e non trattate e non sono stati presi in considerazione per ulteriori analisi, il trattamento post-infezione di 15 minuti è risultato il più efficace. In particolare questi trattamenti determinavano una germinabilità comparabile con quella dei semi non infetti di controllo e significativamente maggiore dei semi infetti non trattati, e una riduzione del livello di infezione dei coleottili ottenuti dai semi infetti e trattati rispetto agli infetti non trattati del 65% circa dopo 7 giorni di incubazione. La concentrazione di acido ferulico più efficace è risultata essere 2,5 mM, la più bassa utilizzata. Visti i risultati promettenti ottenuti con i trattamenti post-infezione di 15 minuti, si è deciso di eseguire un trattamento simile anche con il carbonato di sodio. In questo caso solo la concentrazione più alta (50 mM) determinava un aumento della germinabilità dei semi trattati rispetto agli infetti e una riduzione del livello di infezione dei coleottili da semi infetti e trattati rispetto agli infetti non trattati del 70% circa dopo 7 giorni di incubazione. L'efficacia di questi trattamenti è stata successivamente verificata su semi ottenuti da spighe infettate *in vivo*. Anche in questo caso i trattamenti con acido ferulico (2,5 mM) e sodio carbonato (50 mM) sono risultati efficaci nel migliorare la germinabilità dei semi trattati rispetto gli infetti e nel ridurre il livello di infezione dei coleottili ottenuti dai semi trattati; in particolare queste concentrazioni di acido ferulico e sodio carbonato determinavano una riduzione della contaminazione da *F. graminearum* del 50% circa.

Allo scopo di determinare se i trattamenti con acido ferulico 2,5 e 5 mM e carbonato di sodio 50 mM fossero efficaci nel ridurre la concentrazione della micotossina DON nei semi infettati *in vitro* e *in vivo* e nei coleottili ottenuti da questi semi si è proceduto con la quantificazione del DON per mezzo di un test ELISA. I risultati hanno mostrato che nelle infezioni *in vitro* il livello di DON era inferiore al limite di legge stabilito dal reg. CE 1881/2006 (1,25 ppm) e quindi non è stato possibile verificare l'effetto dei trattamenti. Viceversa nei tessuti *in vivo* si è verificata una forte contaminazione da DON nei tessuti infetti, poiché il fungo durante il processo infettivo della spiga produce elevati livelli di micotossina, e in questo caso è stato possibile dimostrare che i trattamenti testati determinavano una diminuzione della quantità di DON sia nei coleottili che nei semi; più

precisamente nei coleottili da semi infetti il trattamento più efficace è risultato quello con 2,5 mM di acido ferulico che determinava una riduzione del DON del 90% circa, mentre i trattamenti con 5 mM di acido ferulico e 50 mM carbonato di sodio riducevano il livello di contaminazione della micotossina del 60% e 70% circa. Per quanto riguarda i semi infetti l'acido ferulico è risultato ancora il trattamento più efficace anche se in questo caso la concentrazione 5 mM era migliore di quella a 2,5 mM, con una riduzione della micotossina del 90% e del 50% circa rispettivamente; in questo caso il trattamento con il carbonato di sodio 50 mM ha consentito solo una parziale riduzione del 30% circa. Considerando questi ultimi risultati, l'inibitore "naturale" più efficace nel contrastare la crescita fungina, ridurre l'infezione dei tessuti e i livelli di micotossina DON nell'orzo da birra è l'acido ferulico, in particolare a bassa concentrazione (2,5 mM).

In ottica produzione di birra, trattamenti con acido ferulico 2,5 mM e 5 mM e carbonato di sodio 50 mM potrebbero essere presi in considerazione durante la fase di pre-germinazione nelle malterie sia perché potrebbero migliorare la sicurezza alimentare per quanto riguarda le contaminazioni da *F. graminearum*, sia perché questi trattamenti sono stati dimostrati incrementare significativamente la germinabilità delle sementi di orzo infette e la germinabilità elevata (> 95%) è un fattore essenziale nella fase di maltazione. Considerando che per un quintale di semi di orzo da birra si utilizzano 150 litri di acqua, un eventuale trattamento con acido ferulico 2,5 mM o carbonato di sodio 50 mM verrebbe a costare al massimo 75 €/q o 130 €/q, rispettivamente. Inoltre, poiché il sinergismo di più sostanze G.R.A.S. ha fornito risultati promettenti, in quanto i trattamenti combinati sono risultati più efficaci nel contrastare lo sviluppo dei patogeni (Janisiewicz, 2004; Conway et al., 1999), sarebbe opportuno testare gli "inibitori naturali" acido ferulico e sodio carbonato in combinazione con altre sostanze "naturali" G.R.A.S. in modo da determinare una massimizzazione del risultato e anche una diminuzione di costo del trattamento. Sarebbe opportuno inoltre che i confortanti risultati ottenuti in laboratorio venissero confermati su larga scala trattando con acido ferulico e carbonato di sodio semente derivata da campo, in modo da poter verificare la reale potenzialità di controllo di *F. graminearum* da parte di questi inibitori "naturali".

6 BIBLIOGRAFIA

- Bai G.H., Desjardins A.E. e Plattner R.D. (2001). Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathol.* 153, 91-98.
- Barbier M. S., Ride J. P. (1988). A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32,185-197.
- Bhaskara Reddy M.V., Arul J., Angers P., Couture L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. Chem.* 47, 1208-1216.
- Boivin P., Malandra M. (1997). Improvement of malt quality and safety by adding starter culture during the malting process. *MBAA Tech. Q.* 34, 96-101.
- Boutigny A.L., Barreau C., Atanasova – Penichon V., Verdal – Bonnin M.N., Pinson – Gadais L., Richard – Forget F. (2009). *Mycological Research* 113, 746-753.
- Boyacioglu D., Hettiarachchy N.S., Stack R.W. (1992). Effect of three sistemi fungicides on deoxynivalenol (vomitoxin) production by *Fusarium graminearum* in wheat. *Can. J. Plant sci.* 72: 93-101.
- Buiatti S., Sensidoni A., Fontana M. (2006). Il controllo qualità dell'orzo e del malto. *Tecnica molitoria.* Università degli Studi di Udine. Udine. Italia.
- Cantoni C. (1990). *Alimenti microbiologici e igiene.* Johannes Krämer. Milano.
- Casale W.L., Pestka J.J., Hart L.P. (1988). Enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxyn) and several analogs. *J. Agric. Food. Chem.* 36, 663-668.
- Charlene E. Wolf-Hall (2007). Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Inter. Journal of Food Microbiology* 119, 89-94.

Clear R.M., Patrick S.K., Platford R.G., Desjardins M. (1996). Occurrence and distribution of *Fusarium* species in barley and oat seed from Manitoba in 1993 and 1994, Can. J. Plant Pathol. 18, 409-414.

Conway W.S., Janisiewicz W.J., Klein J.D., Sams C.E. (1999). Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of "Gala" apples. HortScience 34, 700-704.

Cuero G.G., Duffs E., Osuji G., Pettit R. (1991). Aflatoxin control in preharvest maize: effects of chitosan and two microbial agents. J. Agric. Sci. 117, 165-169.

D.M. 2 maggio 1996, n. 325. Regolamento concernente l'impiego di batteri lattici nell'acidificazione del mosto destinato alla produzione della birra.

Dati: Bath Report. <http://www.beverfood.com/v2/modules/smartsection/item.php?itemid=301>

Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. Microbiology and molecular biology reviews. 57,595-604.

El Ghaouth A., Arul J., Asselin A., Benhamou N. (1992). Antifungal activity of chitosan on post harvest pathogens. Induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. Mycol. Res.. 92, 769-779.

Faifer G.C., Velazco V., Godoy H.M. (1994). Adjustment of the conditions required for complete decontamination of T – 2 toxin residues with alkaline sodium hypochlorite. Environ. Contam. Toxicol. 52, 102-108.

Ferrarese Giulia. (2011). Tesi di Laurea in Biotecnologia Agrarie. Contenuto di tricoteceni in campioni di frumento e fattori coinvolti nella biosintesi delle tossine di *Fusarium graminearum*. Università degli studi di Padova.

Galvano F., Piva A., Ritieni A., Galvano G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. J. food protec. 64, 120-131.

Gyllang G., Kjellen K., Haikara A., Sigsgaard P. (1981). Evaluation of fungal contamination on barley. In: Lacey, J. (Ed.), Trichothecenes and other mycotoxins. Wiley. New York.

Hadwiger L. A., Fristensky B. W., Riggelman, R. (1984). A natural regulation in plant-fungal pathogen interactions increases crop yield. In *Advances in chitin, chitosan and related enzymes*, Zikakis, J. P., Ed.; Academic Press: New York. Pp 291-302.

Haikara A. (1983). Malt and beer from barley artificially contaminated with *Fusarium* in the field. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 19, 401-408.

Haikara A. (1983a). Gushing induced by fungi. *European brewery convention monograph VI*, Helsinki, Brauwelt-Verlag: Nürnberg, pp 251-259.

Higgins and Brinkhaus F. (1999). Efficacy of several organic acids against mold. *J. applied poultry res.* 8, 480-487.

Hohn T.M., Desjardins A.E., McCormick S.P. (1992). The Tri 4 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 248, 95-102.

Janisiewicz W.J. (2004). Control of postharvest diseases of fruits using microbes. Appalachian fruit research station, U.S. department of agriculture-agriculture research service, Kearneysville, West Virginia, USA.

Karabulut O.A., Luire S., Droby S. (2001). Evaluation of the use of sodium bicarbonate, potassium sorbate and yeast antagonists for decreasing postharvest decay of sweet cherries. *Postharvest biol. Technol.* 23, 233-236.

Kazan K., Donald M., Gardiner and Manners J.M. (2011). On the trial of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular plant pathology* 1-15.

Kim K.H., Tsao R., Yang R., Cui S.W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry* 95, 224-235.

Kottapalli B., Wolf-Hall C.E., Schwarz P. (2006). Effect of electron beam irradiation on the safety and quality of *Fusarium* infected malting barley. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 224-231.

Kunze W. (1996). *Technology brewing and malting*. Versuchs und lehranstalt für brauerei, Berlin.

L. 16 agosto 1962, n. 1354. *Disciplina igienica della produzione e del commercio della birra*.

- Lindsay R.C. (1985). Food additives, in food chemistry, ed by Fennema OR, chapter 10, Marcel Decker, New York.
- Lowe D.P., Arendt E.K. (2004). The use and effects of lactic acid bacteria on malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. *J. Inst. Brew.* 110, 163-180.
- Marin S., Ramos A. J., Cuevas D., and Sancis V. (2006). *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* infection and Fumonisin B₁ and Zearalenone accumulation in resveratrol treated corn. Food Technology Department, Lleida University. 12, (4) 353-359.
- Marin S., Velluti A., Munoz A., Ramos A. J., and Sanchis V. (2004). Essential oils inhibition of zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in maize grain. *Food Microbiology* 21, 313-318.
- McKenzie K.S., Sarr A.B., Mayra K., Bailey R.H.M. Miller D.R., Rogers T.D., Norred W.P., Voss K.A., Plattner R.D., Kubena L.F., Phillips T.D. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem. Toxicol.* 35, 807-820.
- McMullen M., Jones R. and Gallenberg D. (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81, 1340-1348.
- Merhij J., Boutigny A.L., Pinson – Gadais L., Richard – Forget F., Barreau C. (2009) Acid pH as a determination of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Additives and Contaminants* 5, 710-717.
- Mudge A. M., Dill-Macky, R., Dong, Y., Gardiner, D. M., White, R.G., and Manners, G. M. (2006). A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonization during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 69, 73-85.
- Müller H.-M., Reimann J., Schumacher U., Schwadorf K. (1997). Natural occurrence of *Fusarium* toxins in an area of southwest Germany. *Mycopathologia* 137, 185-197.
- Multon J.L. (1998). Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias, editorial Acribia, Zaragoza, Spain.

- Munar M., Subree B. (1997). Gushing a maltster's view. *J. Am. Soc. Brew. Chem* 55, 119-122.
- Nigro F., Schena L., Ligorio A., Pentimone I., Ippolito A., Salerno M.G. (2006). Control of table grape storage rots by pre-harvest applications of salts. *Postharvest boil. tech.* 42, 142-149.
- Nobecourt P. (1992). Sur le mecanisme de l'action parasitaire du *Penicillium glaucum* Link et du *Mucor stolonifer* Ehtb. *Compt. Rend. Acad. Sci, Paris* 174, 1720-1722
- Odhav B. (2005). Bacterial contaminants and mycotoxins in beer and control strategies. *Rev. Food Nutr. Tox.* 2, 1-18.
- Palou L., Usall J., Munoz J.A., Smilanick J.L., Vinas I. (2002). Hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue mold of clementine mandarins. *Postharvest boil. Technol.* 24, 93-96.
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals a review. *Plant Pathology.* 44, 207-238.
- Pepe C. (2010). "Caratterizzazione della componente polipeptidica della birra e identificazione di epitopi potenzialmente immunogenici per i pazienti celiaci". Dottorato di ricerca in scienze e tecnologie delle produzioni agro-alimentari. Università degli studi di Napoli Federico II.
- Pirova M. (1973). *Industrie agrarie alimentari. Volume 1. Del Bianco.* Udine.
- Ramakrishna N., Lacey J., Smith J.E. (1991). Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 47-54.
- Reg. CE n. 856/2005 che modifica il Reg. CE 466/2001 per quanto riguarda le *Fusarium* tossine.
- Reg. CE n. 1126/2007 della commissione del 28 settembre 2007 che modifica il regolamento CE n. 1881/2006 che 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.
- Reg. CE n. 1881/2006 della commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminati nei prodotti alimentari.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure antioxydant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine.* 20, 933-956.

- Roger D.D. (2011). Deoxynivalenol (DON) and Fumonisin B₁ (FB₁) in artisanal sorghum opaque beer brewed in north Cameroon. *African Journal of Microbiology Research* Vol.5 (12), pp. 1566-1567.
- Rubella S., Goswami and Corby Kistler H. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crop. USDA ARS Cereal Disease Laboratory, and Department of Plant Pathology, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA.
- Schwarz P.B., Casper H.H., Barr J.M. (1995a). Survey of the natural occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in barley grown in Minnesota, North Dakota and South Dakota during 1993. *MBAA Tech. Q.* 3, 190-194.
- Schwarz P.B., Casper H.H., Beattie S. (1995b). Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53, 121-127.
- Scott P. M. (1996). Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Inter. J. AOAC.*, 79, 857-882.
- Shekhar M., Singh S., Ashraf A., Ali Khan A.A., Kumar S. (2009). Efficacy of inorganic salts and organic acids against colony growth of *Aspergillus flavus* and their use to control aflatoxin level in post harvest maize. *Internet Journal of food safety*, Vol.11, 4-10.
- Smilanick J.L., Margosan D.A., Mlinkota F., Usall J., Michael I.F. (1999). Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant dis.* 83, 139-145.
- Sicheri G. (1983). *Industria agraria*. (Hoepli). Milano.
- Stack R.W. (1999). Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. APSnet feature. APSnet Plants Pathology Online <http://www.apsnet.org/online/feature/FHB/Top.html>
- Trenholm H.L., Charmley L.L., Preluskey D.B., Warner R.M. (1992). Washing procedures using water or sodium carbonate solutions for the decontamination of three cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *J. Agric. Food. Chem.* 40, 2147-2151.

Tuija Sarlin T., Nakari-Setälä M., Linder M., Penttilä and Haikara A. (2005). Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. The Institute of Brewing and Distilling. Finland. Vol. 111, n. 2.

Vaughan A., O'Sullivan T., van Sinderen D. (2005). Enhancing the microbiological stability of malt and beer – a review. J. Inst. Brew. 111, 355-371.

Vitagliano M. (2002). Tecnologie e trasformazione dei prodotti agrari. Calderini Edagricole. Bologna.

Wolf-Hall C.E., Bullerman L.B. (1998). Characterization of *Fusarium graminearum* strains from corn and wheat by deoxynivalenol production and RAPD. J. Food Mycol. 1, 171-180.

Wolf-Hall C.E., Schwarz P.B. (2002). Mycotoxins and fermentation – beer production. In: DeVries, J.W., Jackson, L., Truckess, M. (Eds.), Mycotoxins and Food Safety. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 504. Kluwer academic/Plenum Publishers, New York, pp. 217-226.

Zambonelli C., Tini C., Giudici P., Grazia L. (1999). Microbiologia degli alimenti fermentati. Calderini edagricole. Bologna.