

# INNOVAZIONI PER IL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE NEI CEREALI

Massimo Blandino (a), Valentina Scarpino (a), Michael Sulyok (b), Francesca Vanara (a), Amedeo Reyneri (b)

(a) *Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italia*

(b) *Center for Analytical Chemistry, Department of Agrobiotechnology (IFA), Tulln, Austria*

## Introduzione

Al fine di minimizzare i rischi sanitari, i sistemi colturali del frumento sono disegnati per controllare principalmente la contaminazione della micotossina normata (1, 2) più frequentemente ritrovata, il deossinivalenolo (DON). La combinazione tra i fattori agronomici, quali la rotazione colturale, la gestione dei residui della coltura precedente, la suscettibilità varietale e l'applicazione di fungicidi in fioritura per il controllo della fusariosi della spiga, in percorsi agronomici integrati impatta fortemente sulla contaminazione da DON con gli andamenti meteorologici più frequenti (3, 4, 5). Lo scenario agronomico più favorevole nel ridurre il rischio di contaminazione (aratura, varietà mediamente tollerante, trattamento fungicida in fioritura) riduce fino al 97% il contenuto in DON rispetto a quello più rischioso (minima lavorazione, varietà suscettibile, nessun trattamento di difesa della spiga) (6). Tuttavia, molte altre micotossine e metaboliti secondari prodotti da *Fusarium* e altre specie sono ritrovati nei cereali vernini (7, 8). Vengono definite micotossine emergenti questi composti con probabile azione tossica nei confronti dell'uomo e/o degli animali superiori per le quali mancano ancora dettagliate informazioni scientifiche. L'autorità per la sicurezza alimentare europea (*European Food Safety Authority*, EFSA) sta lavorando per ottenere un'opinione scientifica sul rischio per la salute pubblica relativamente alla presenza di micotossine emergenti negli alimenti e nei mangimi (9, 10). Tuttavia oltre a raccogliere informazioni necessarie a verificare la presenza e il livello di contaminazione di questi metaboliti negli areali cerealicoli e nei prodotti alimentari e verificarne il potenziale tossico, risulta fondamentale verificare l'impatto che le soluzioni agronomiche possano esercitare sulla prevenzione della contaminazione di questi composti sintetizzati sia nella maggior parte dei casi da diverse specie fungine. L'obiettivo di questo contributo è quello di verificare se l'applicazione dei programmi agronomici per controllare il DON possa minimizzare il rischio anche delle micotossine emergenti. Inoltre vengono esposti i risultati di recenti sperimentazioni al fine di individuare l'impatto di nuove soluzioni e alternative agli strumenti attualmente disponibili per il controllo della problematica micotossine nei cereali vernini.

## Materiali e metodi

### Confronti agronomici

Nell'ambito di diverse sperimentazioni in campo (2012-2018) condotte in Nord Italia in condizioni di inoculo naturale sono stati confrontati percorsi agronomici per la coltivazione del frumento tenero con differente suscettibilità al DON, per verificarne l'impatto sulle micotossine emergenti:

– *Gestione dei residui colturali*

Nella località di Poirino (TO) sono stati messi a confronto negli anni 2012 – 2015 tre differenti lavorazioni del terreno, in appezzamenti la cui precessione colturale era mais da granella:

- Aratura, con interrimento a circa 30 cm dei residui coltura, seguito da un affinamento del terreno con un passaggio dell'erpice a dischi e di un erpice rotante, e successiva semina con una seminatrice meccanica per cereali vernini;
- Minima lavorazione, con un interrimento parziale dei residui colturali mediante un doppio passaggio con erpice a dischi e semina del frumento con le modalità descritte per la tesi arata;
- Semina su sodo, ovvero nessun interrimento dei residui coltura e semina diretta in un solco inciso da una specifica seminatrice.

– *Scelta varietale e fungicida*

Nella località di Cigliano (VC) e Carmagnola (TO) nelle campagne agrarie 2011-12 e 2012-13 sono stati confrontati 4 percorsi agronomici ottenuti dalla combinazione di 2 varietà con differente suscettibilità al DON e l'esecuzione del trattamento fusaricida in fioritura (s.a. protioconazolo):

- una varietà di frumento tenero (cv. Generale) moderatamente tollerante la fusariosi della spiga (FHB) trattata con fungicida;
- la varietà di frumento tenero (cv. Generale) non trattata;
- una varietà di frumento duro (cv. Saragolla) sensibile alla FHB trattata con fungicida;
- la varietà di frumento duro (cv. Saragolla) non trattata.

– *Nuove varietà resistenti alla fusariosi della spiga*

Nella località di Cigliano negli anni 2016-2018 sono stati confrontate 4 nuove varietà di frumento duro di recente costituzione con bassa suscettibilità alla FHB (cv. Sy Cysco, Fuego, Odisseo e Secolo) a confronto con un testimone suscettibile (cv. Saragolla).

– *Applicazione di composti naturali con azione antifungina*

Nella località di Buriasco (TO) negli anni 2014-2016 sono stati applicati degli estratti da alghe del genere *Spirulina* e *Nannochloropsis* ad alto contenuto di acidi fenolici sia in piastra sia in pieno campo per verificarne l'azione di contenimento della contaminazione da micotossine a confronto con quella di fungicidi azolici (s.a. tebuconazolo e protioconazolo). Le parcelle sperimentali sono state raccolte meccanicamente e un campione rappresentativo di granella è stato prelevato per l'analisi delle micotossine.

## Analisi HPLC-ESI-MS/MS

Un campione rappresentativo di 3 kg di granella di ciascuna parcella è stato macinato utilizzando un molino ZM 200 Ultra Centrifugal Mill (Retsch GmbH, Haan, Germania) e il macinato integrale ottenuto è stato utilizzato direttamente per l'estrazione. Un sottocampione rappresentativo di 5 g è stato estratto utilizzando 20 mL di una miscela di acetonitrile/acqua/acido acetico 79:20:1 (v/v/v). Dopo l'estrazione i campioni sono stati centrifugati, diluiti 1:1 e iniettati come descritto da Sulyok *et al.* nel 2006 (11).

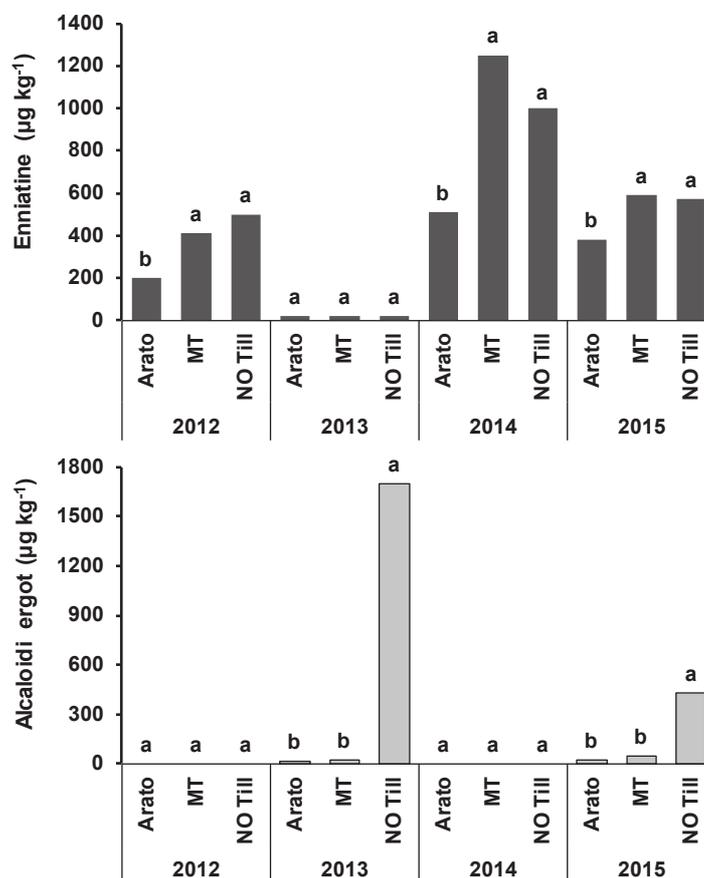
L'identificazione e la quantificazione sono stati eseguiti utilizzando un sistema LC-MS/MS QTrap 5500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). I parametri cromatografici e spettrometrici di massa degli analiti investigate sono descritti da Malachova *et al.* nel 2014 (12). I risultati della concentrazione da micotossine sono stati corretti sulla base del tasso di recupero.

## Risultati e discussione

Oltre al DON, i composti più abbondanti sono stati aurofusarina, culmorina, deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-G), moniliformina ed enniatine. Altri tricoteceni, forme derivate dello zerealenone, tossine da *Alternaria* e alcaloidi dell'ergot sono stati ritrovati a minori concentrazioni e in specifiche condizioni meteorologiche e agronomiche.

### Gestione dei residui colturali

Come noto l'applicazione di tecniche di non lavorazione (No till) o di minima lavorazione che non permettono l'interramento profondo dei residui colturali determina un aumento del rischio di contaminazione da DON in diverse condizioni pedo-climatiche. Queste tecniche di agricoltura conservativa determinano inoltre anche un aumento del rischio di contaminazione da altre micotossine emergenti quali le enniatine (Figura 1). La contaminazione della granella di frumento degli alcaloidi dell'ergot risulta chiaramente associata ad alcune campagne agrarie e in particolare all'adozione di tecniche di semina su sodo.



**Figura 1. Effetto delle minime lavorazioni (MT) e semina su sodo (No Till) sulla contaminazione da enniatine e alcaloidi ergot rispetto all'interramento dei residui colturali con l'aratura. Sperimentazioni condotte a Poirino (TO) nel 2012-2015. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative (P<0,05)**

## Scelta varietale e fungicida

L'applicazione dei percorsi agronomici che derivano dalla combinazione di varietà con differente suscettibilità varietale per minimizzare il rischio di contaminazione da DON riduce significativamente (>84%) la contaminazione di altri metaboliti prodotti dalle specie fungine produttrici del DON, mentre riducono, in misura minore i metaboliti prodotti da altre specie fungine.

Tuttavia l'adozione di percorsi agronomici meno predisponenti l'accumulo di DON nella granello (varietà mediamente tollerante di frumento tenero con l'applicazione di un fungicida in fioritura) permette anche una riduzione significativa e chiara del contenuto in altri metaboliti associati al DON (DON-3-G, culmorina), tossine prodotte da *F. avenaceum* (enniatine e moniliformina) e anche le tossine da *Alternaria* (tentoxina, alternariolo e alternariolo-metil-etere).

**Tabella 1. Impatto di percorsi agronomici ottenuti dalla combinazione di cultivar di frumento tenero e duro e l'applicazione di fungicidi in fioritura per il controllo della fusariosi della spiga sul contenuto in deossinivalenolo 3-glucoside (DON-3-G), culmorina, enniatine, moniliformina e tossine di alternaria (somma di tentoxina, alternariolo e alternariolo-metil-etere)**

Anno	Percorso agronomico	DON-3G		Culmorina		Enniatine		Moniliformina		Tossine da Alternaria	
		(µg kg <sup>-1</sup> )		(µg kg <sup>-1</sup> )		(µg kg <sup>-1</sup> )		(µg kg <sup>-1</sup> )		(µg kg <sup>-1</sup> )	
2011	tenero-fungicida	19	c	54	d	18	c	< LOQ	b	1,6	d
	tenero-non trattato	46	b	84	c	72	b	6	b	2,8	c
	duro-fungicida	386	a	749	b	501	a	117	a	5,9	b
	duro-non trattato	395	a	1038	a	620	a	117	a	7,6	a
2012	tenero-fungicida	52	d	99	c	41	b	19	a	0,9	c
	tenero-non trattato	264	c	579	b	97	ab	31	a	1,5	b
	duro-fungicida	440	b	791	b	147	ab	63	a	4,2	a
	duro-non trattato	1003	a	1988	a	265	a	112	a	5,4	a
2013	tenero-fungicida	38	c	275	c	10	c	< LOQ	b	0,6	b
	tenero-non trattato	75	b	587	b	27	bc	9	ab	1,0	b
	duro-fungicida	121	a	818	b	38	ab	18	a	4,5	a
	duro-non trattato	158	a	1203	a	87	a	31	a	5,1	a

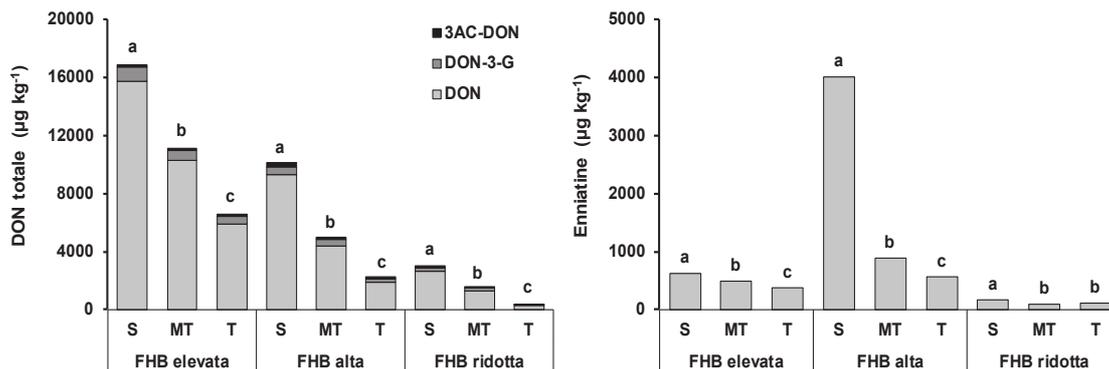
Sperimentazioni condotte a Cigliano (VC) e Carmagnola (TO) dal 2011 al 2013.

Lettere differenti in ciascuna colonna e per ciascuna campagna agraria indicano differenze statisticamente significative (P<0,05)

## Nuove varietà resistenti alla fusariosi della spiga

L'utilizzo di nuove varietà di frumento duro più tolleranti alla fusariosi della spiga permette una chiara riduzione del contenuto in DON totale (somma di DON e delle sue forme acetilate e glucosilodate) rispetto a varietà con elevata e media suscettibilità alla fusariosi della spiga (Figura 2).

Nelle varietà più tolleranti la malattia e nelle campagne con minor presenza della patologia il rapporto DON-3-G/DON risulta superiore, sebbene complessivamente questo non influenzi negativamente l'efficacia di queste varietà sul DON totale. Le varietà più tolleranti della malattia risultano inoltre essere anche quelle con una minor contaminazione da enniatine.



**Figura 2. Contenuto in deossinivalenolo totale (somma di DON, deossinivalenolo 3- glucoside DON-3G e 3 acetil-deossinivalenolo, 3AC-DON) in varietà di frumento duro suscettibili (S), mediamente tolleranti (MT) e tolleranti (T) alla fusariosi della spiga (FHB) in campagne agraria con differente pressione della malattia. Sperimentazioni condotte a Cigliano (VC) nel 2016-2018. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative (P<0,05)**

## Applicazione di composti naturali con azione antifungina

Rispetto all'applicazione di un fungicida fortemente efficace nel controllo degli agenti della fusariosi della spiga (miscela di tebuconazolo + prolioconazolo) l'applicazione di estratti dalle microalghe alla fioritura del frumento non ha permesso un paragonabile vantaggio produttivo, e soprattutto un'adeguata capacità di controllo della severità delle malattie fogliari (complesso della septoriosi). L'applicazione in campo evidenzia una significativa capacità di questi estratti naturali nel contenere i sintomi della fusariosi della spiga rispetto ad un testimone non trattato, con un'efficace simile a quella della s.a. fungicida tebuconazolo, sebbene inferiore rispetto a quella osservata con l'impiego di prolioconazolo (Tabella 2). Tuttavia, l'impiego di questi composti in pieno campo non ha permesso una significativa riduzione della contaminazione della granella in campo.

**Tabella 2. Effetto dell'applicazione in fioritura di estratti dalle microalghe *Spirulina* e *Nannochloropsis* sulla produzione di granella, la severità del complesso della septoriosi e della fusariosi della spiga (FHB) alla maturazione cerosa, e il contenuto in deossinivalenolo nella granella di frumento tenero**

Trattamento	Produzione granella (t/ha)	Severità (%)		DON	
		complesso septoriosi	FHB	T	N (µg/kg)
Testimone non trattato	6,7 c	43,1 a	5,1 a	7,1 a	1532
<i>Spirulina</i> sp.	6,9 bc	38,2 a	3,3 b	7,1 a	1479
<i>Nannochloropsis</i> sp.	6,9 bc	39,3 a	3,1 b	7,0 ab	1336
Tebuconazolo	7,3 ab	28,9 b	3,1 b	6,7 abc	1155
Prolioconazolo	7,7 a	17,6 c	1,1 c	5,7 bc	874
Tebuconazolo + Prolioconazolo	7,5 a	17,7 c	1,3 c	5,5 c	767

Dati medi di 2 anni e 4 ripetizioni. Sperimentazioni condotte a Buriasso (TO) nel 2015-2016. Lettere differenti in ciascuna colonna indicano differenze statisticamente significative (P<0,05)

## Conclusioni

I dati raccolti evidenziano che nei cereali vernini l'adozione delle soluzioni agronomiche e i metodi di lotta impiegati per il controllo del DON permettono anche una riduzione più o meno marcata a seconda della classe di metaboliti, delle micotossine emergenti. L'impatto di innovative strategie di controllo della fusariosi della spiga, quali la selezione di nuove varietà più tolleranti, l'utilizzo di composti naturali ad azione fungicida (estratti algali ad alto potere antiossidante), la distribuzione di biocompetitori al suolo per ostacolare la formazione dell'inoculo, si prospettano tra le soluzioni ecocompatibili nei confronti delle quali la ricerca si sta indirizzando per introdurre innovazioni per il controllo della contaminazione delle micotossine normate ed emergenti nei cereali. Le nuove soluzioni potranno contribuire a ridurre ulteriormente il rischio sanitario nei cereali vernini, ma per ottenere risposte positive debbono essere considerate con attenzione, in particolare per le applicazioni di biocompetitori, le interazioni con il sistema colturale e l'andamento meteorologico. Tuttavia perché queste soluzioni possano essere inserite nei sistemi colturali è fondamentale verificarne non solo l'azione nei confronti della fusariosi della spiga e del contenuto in micotossine, ma anche considerare l'impatto sulle patologie fogliari e il ritorno economico dell'investimento.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 364 del 20.12.2006.
2. Europa. Regolamento (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. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 255/14 del 29.9.2007.
3. Pirgozliev SR, Edwards SG, Hare MC, Jenkinson P. Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals. *Eur J Plant Pathol* 2003;109:731-42.
4. Koch HJ, Pringas C, Maerlaender B. Evaluation of environmental and management effects on Fusarium head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. *Eur J Agron* 2006;24:357-66.
5. Orlando B, Barrier-Guillot B, Gourdain E, Mourmené C. Identification of agronomic factors that influence the levels of T-2 and HT-2 toxins in barley grown in France. *World Mycotoxin J* 2010;3:169-74.
6. Blandino M, Haidukowski M, Pascale M, Plizzari L, Scudellari D, Reyneri A. Integrated strategies for the control of Fusarium head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crop Res* 2012;133:139-49.
7. Jestoi M. Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008;48:21-49.
8. Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Walburga S, Gerrit S, Stroka J. Masked mycotoxins: a review. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(1):165-86.
9. EFSA Request for a scientific opinion on the risks for public health related to the presence of moniliformin in feed and food, Mandate M-2010-0312, Reception Date 21-07-2010, Acceptance Date 09-09-2010.
10. EFSA. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal* 2014;12(8):3802.

11. Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:2649-59.
12. Malachova A, Sulyok M, Beltran E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography - tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all relevant mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 2014;1362:145-56.