



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLE PRODUZIONI VEGETALI

INDIRIZZO PROTEZIONE DELLE COLTURE - CICLO XXI

Dipartimento del Territorio e Servizi Agroforestali TESAF – Sezione Patologia Vegetale

Mais e micotossine: possibilità di controllo.

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Andrea Battisti

Supervisore : Prof. Roberto Causin

Dottorando : Riccardo Rasera

DATA CONSEGNA TESI

02 febbraio 2009

Declaration

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgment has been made in the text.

Legnaro, 2 Febbraio 2009.

A copy of the thesis will be available at <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

Dichiarazione

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

Legnaro, 2 Febbraio 2009.

Una copia della tesi sarà disponibile presso <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

INDICE

Riassunto	I
Summary	IV
1. Introduzione	
1.1 Sicurezza alimentare: food security e food safety.	3
1.2 Sicurezza alimentare e pacchetto igiene.	6
1.3 Sicurezza alimentare e micotossine.	7
Articolo: Fumonisine, guardia ancora alta.	13
2. Mais e micotossine: la situazione del Veneto	17
3. <i>F.verticillioides</i> e mais: vie d'infezione e contaminazione da fumonisine	31
Articolo: Conoscere le vie infettive per combattere le fumonisine	37
Articolo: Sete del mais, facile ingresso alle micotossine	45
4. Mais e micotossine: possibilità di controllo	53
4.1 Strategie di controllo chimico	57
Articolo: Effect of maize seed-treatments on <i>Fusarium verticillioides</i> infection and fumonisin contamination.	61
Articolo: Effects of fungicides on <i>Fusarium verticillioides</i> kernel colonization and fumonisin B ₁ and B ₂ contamination.	77
Articolo: Effetto di trattamenti insetticidi e fungicidi, effettuati in epoche diverse sullo stato fitosanitario del mais.	101

4.2 Strategie di controllo biologico	117
Articolo: <i>Trichoderma harzianum</i> strain T22 seed treatment effect on <i>Fusarium verticillioides</i> maize kernel colonization and fumonisin contamination	121
Articolo: <i>Trichoderma harzianum</i> strain T22 induces in maize systemic resistance against <i>Fusarium verticillioides</i>	147
Articolo: <i>Acremonium zeae</i> maize endophytic colonization, effect on <i>Fusarium verticillioides</i> kernel colonization and fumonisin contamination.	191
5. Discussioni e conclusioni generali	209

Ringraziamenti

Riassunto

La contaminazione dei cereali da micotossine è un problema di sicurezza alimentare che riguarda le produzioni provenienti da tutto il mondo. In particolare, il mais e i prodotti da esso derivanti possono risultare contaminati da diverse classi di micotossine, tra esse, le più importanti sono il deossinivalenolo (DON), lo zearalenone (ZEA), le aflatossine (AF), l'ocratossina (OCRA) e le fumonisine (FUM). Le micotossine sono prodotti secondari del metabolismo di microorganismi fungini (muffe) appartenenti principalmente ai generi *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Nel nord Italia, ma anche in altre regioni del mondo, la classe di micotossine che viene più spesso riscontrata nella granella di mais sono le fumonisine che possono essere presenti anche a livelli tali da sconsigliarne il consumo sia per l'alimentazione umana sia per l'alimentazione delle specie animali più sensibili. Il principale produttore di fumonisine è *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg e visto l'effetto che queste tossine hanno, sia sulla salute umana sia su quella animale, la messa a punto di strategie di controllo capaci di contenere la colonizzazione della granella da parte di *F.verticillioides* e la conseguente contaminazione da fumonisine è diventata un aspetto di prioritario interesse nell'ambito della sicurezza alimentare. Attualmente le linee di difesa disponibili per contenere la contaminazione della granella di mais da micotossine sono legate all'applicazione delle buone pratiche agricole (BPA) seguite dalle buone pratiche di fabbricazione (BPF) (Rac CE 583/2006). Le BPA sono strategie di controllo indiretto volte a modificare le condizioni generali di sviluppo della pianta con lo scopo di ridurre gli stress ambientali promuovendone il fitness al fine di renderla meno suscettibile all'attacco dei patogeni. Tuttavia le diverse caratteristiche climatiche che caratterizzano i diversi areali di produzione del mais, ma anche le annuali fluttuazioni nel clima, rendono variabile il vantaggio ottenuto dall'applicazione delle BPA. L'integrazione tra strategie di controllo indiretto, quali l'applicazione delle BPA, e strategie di controllo diretto, basate sull'impiego di fungicidi o agenti di controllo biologico, può essere una soluzione per ottenere un controllo effettivo e stabile sia della colonizzazione della granella da *F.verticillioides* sia della contaminazione da fumonisine. Al fine di pianificare efficaci strategie di controllo diretto risulta

indispensabile conoscere quali siano le vie attraverso le quali *F.verticillioides* colonizza la pianta di mais. Esso può infettare la pianta di mais attraverso diverse vie di infezione ma la loro importanza relativa può cambiare nelle diverse aree geografiche. La prima serie di esperimenti ha permesso di verificare che, anche in Veneto, la principale fonte di inoculo è rappresentata dalle soluzioni di continuità causate dall'azione trofica della piralide (ECB: *Ostrinia nubilalis* (Hübner)) che è responsabile del 60% del contenuto finale di fumonisine della granella. Anche le infezioni che avvengono attraverso le sete rappresentano una via importante di ingresso mentre la colonizzazione endofitica che inizia dal seme infetto o dalle radici risulta di minore importanza. I test condotti sull'efficacia di diversi fungicidi nel contenere lo sviluppo di *F.verticillioides* hanno confermato l'efficacia degli inibitori dell'ergosterolo ed in particolare dei triazoli. Tuttavia la concia del seme, con fungicidi, ha dimostrato di non essere efficace o di avere un limitato effetto nel contenere la contaminazione da fumonisine e la colonizzazione da *F. verticillioides* della granella alla raccolta. Risultato peraltro atteso poiché le principali vie di infezione, attraverso le sete o le soluzioni di continuità causate dall'azione trofica della piralide, risultano distanti sia nello spazio che nel tempo dal punto di applicazione dei fungicidi. Invece l'applicazione di miscele di prodotti fitosanitari, ed in particolare di Metconazolo + Procloraz, sulle infiorescenze femminili sette giorni dopo la loro emissione ha permesso di ridurre la colonizzazione (-81%) da *F. verticillioides* e la contaminazione da fumonisine (-78%) della granella alla raccolta a livelli inferiori a quelli stabiliti per il mais destinato al consumo alimentare umano (4000 µg/kg). Tuttavia anche se per la distribuzione dei prodotti fitosanitari si è utilizzata una manica d'aria montata su macchina semovente scavalcante (trampolo), attrezzatura già presente in azienda ed impiegata per la distribuzione dei trattamenti insetticidi per il controllo della piralide, attualmente non è disponibile alcun prodotto fitosanitario registrato per l'impiego su mais ed inoltre va tenuto in considerazione quale potrebbe essere l'impatto ecologico che l'applicazione di questi prodotti potrebbe avere su una superficie, che solo in Veneto, è superiore ai 240.000 ha. Un'altra interessante strategia di controllo diretto potrebbe essere l'impiego di strategie di controllo biologico. Tra i diversi agenti di controllo, che in prove di

laboratorio, serra e campo, hanno dimostrato essere in grado di controllare lo sviluppo di *F.verticillioides* interessanti risultati si sono ottenuti dall'applicazione sul seme di *Trichoderma harzianum* ceppo T22 e *Acremonium zeae* ceppo NRRL 13540. Nelle diverse prove sperimentali realizzate si è potuto verificare che la colonizzazione dell'apparato radicale della pianta di mais ad opera di T22 induce nella pianta delle risposte di resistenza in grado di contenere sia la colonizzazione da *F.verticillioides* (-70%) sia la contaminazione da fumonisine (-60%) nella granella alla raccolta. Diverso è il meccanismo di controllo espresso dal ceppo NRRL 13540 infatti la riduzione pari a -60% sia del livello di colonizzazione da *F.verticillioides* sia del livello di contaminazione da fumonisine rilevata nella granella alla raccolta, risulta associata ad un aumento nel livello di colonizzazione endofitica della pianta di mais da parte di *A. zeae*. Questo risultato permettono di ipotizzare una azione diretta di antagonismo da parte di *A. zeae* nei confronti di *F. verticillioides* che può essere legata alla capacità, già dimostrata in prove *in vitro*, di sintesi da parte del BCA delle pirrocidine A e B, molecole con azione antibiotica. Concludendo per ottimizzare l'efficacia delle strategie di controllo diretto quali l'impiego di fungicidi o di agenti di controllo biologico esse devono essere applicate insieme alle BPA in protocolli di lotta integrata che devono essere però pianificati in funzione delle caratteristiche climatiche proprie dei diversi areali di coltivazione del mais.

Summary

Cereal mycotoxin contamination is a worldwide serious problem for human and animal health. Maize products could be contaminated by different kind of mycotoxins. The most important are deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN), aflatoxins (AF), ocratoxin (OCRA) and fumonisins (FUM) produced by fungi belonging to different genera *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. In northern Italy, but also in other world regions, the most frequently occurring class of mycotoxins in maize are fumonisins. These mycotoxins can be present even at concentrations that make maize grain inadvisable for human consumption and feed of more susceptible animal species. The main responsible of maize fumonisin contamination is *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg and because of the harmful effects associate with the presence of fumonisins the spreading of *F. verticillioides* infection has become an important area in food safety. Until now the application of good agricultural practices (GAP) followed by good manufacturing practices (GMP) represent the only line of defence usable to control *Fusarium*-toxins contamination in maize grain (Rac CE 583/2006). GAP are indirect control strategies point out to altering the conditions under which the crop grown reducing environmental stress, promoting plant fitness. Different climate conditions among maize cultivation area and annual fluctuation in weather can change agricultural practices effectiveness in control *Fusarium* colonization and mycotoxin contamination. Integration of indirect control strategies as GAP with direct control strategies base on the application of chemical product or biological control agent (BCA) can be the way to achieve a reliable control of *Fusaria* colonization and fumonisin contamination in maize kernels. *F. verticillioides* is known to infect maize trough several different infection pathways and the relative importance of different pathways may vary among geographic areas. The first set of experiment reveals that, also in Veneto, insect injuries due to European corn borer (ECB: *Ostrinia nubilalis* (Hübner)) larvae activity are the most important infection pathways causing 60% of final fumonisin contamination. Infections through silks are also a significant source of *F. verticillioides* inoculum and fumonisin contamination while seed-borne and soil-borne infections have a lesser importance. Test on different fungicide activity

against *F. verticillioides* confirm the effectiveness of ergosterol synthesis inhibitors (EBIs) and in particular of triazole. However seed chemical treatments have no or limited effect in controlling the final level of *F. verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination because the main fungal infections occur through pathways, silk and insect injuries, both spatially and temporally distant from the point of application of the chemical products. Application of mixture of chemicals and in particular of Metconazole + Prochloraz on silks seven days after female flowering reduce *F. verticillioides* kernel colonization (-81%) and fumonisin contamination (-78%) even at levels that are lower than the one stated for the human consumption (4000 µg/kg). However even if for the distribution of chemical mixtures is possible to employ self-propelled sprayer used for the distribution of insecticide against ECB, no fungicides are registered for the use in maize during flowering and moreover is important to take in consideration the ecological impact of the application of chemicals on a area that only in Veneto region is greater than 240.000 ha. Another interesting control strategy is the use of biological control agent and among several different control agents discover active against *F. verticillioides* interesting results give seed application of *Trichoderma harzianum* strain T22 and *Acremonium zeae* strain NRRL13540. T22 rhizosphere colonization induct systemic resistance response in maize plant and results of field trials (3 years in 2 sites) reveal an effective and stable reduction of *F. verticillioides* kernel colonization (-70%) and fumonisin B₁ and B₂ contamination (-60%). Different is the control mechanism express by NRRL 13540 because the reduction (-60%) of *F. verticillioides* kernel colonization and fumonisin B₁ and B₂ contamination is recorded in association with an enhancement in *A. zeae* endophytic kernel colonization. This results permit to hypothesize a *in loco* inhibition due to the synthesis of compound with antibiotic activity, pyrrocidines A and B. In conclusion to enhance the effectiveness of direct control strategies as application of fungicide or biological control agent they have to be applied with GAP in integrated control protocols that have to be plan in relation with the different environmental conditions characterizing the different maize cultivation areas.

INTRODUZIONE

1.1 Sicurezza alimentare: food security e food safety.

L'importanza di garantire a tutti gli esseri umani l'accesso a cibi che permettano di soddisfare le esigenze nutrizionali dell'organismo e di avere una dieta equilibrata e sana è ancora tutt'oggi, a 70 anni dalla dichiarazione dei diritti dell'uomo che la indica come una condizione imprescindibile al fine di poter vivere una vita dignitosa (Unga, 1948), uno dei principali temi di dibattito che interessa l'agenda internazionale. Le dichiarazioni dei partecipanti al G8 dell'agricoltura (Cismon di Valmarino – 18-20 aprile 2009) e al Vertice Mondiale sulla sicurezza alimentare promosso dalla FAO (Roma, 16-18 novembre 2009) hanno sottolineato come la grave crisi economico-finanziaria che sta affrontando la comunità internazionale abbia portato, da una parte, all'aumento dei prezzi dei prodotti alimentari e alla diminuzione delle disponibilità economiche delle popolazioni più povere e, dall'altra, alla riduzione degli aiuti internazionali determinando una drammatica crescita del numero di persone che soffrono la fame nel mondo (Mipaf, 2009, Fao 2009a). Inoltre entro la metà di questo secolo la popolazione mondiale dovrebbe raggiungere 9,1 miliardi registrando un incremento del 34% rispetto ad oggi e a crescere saranno soprattutto le popolazioni dei paesi in via di sviluppo causando un incremento della domanda alimentare pari al 70%. Domanda che dovrà essere esaudita se non si vuole ulteriormente aggravare il problema della fame nel mondo (Fao, 2009b). Inoltre il vertice ONU di Copenaghen, tenutosi lo scorso novembre, sull'effetto delle attività antropiche nel determinare i cambiamenti climatici ha sottolineato come l'agricoltura sia vittima del cambiamento climatico. Secondo le previsioni l'aumento delle temperature, l'alterazione nel ciclo delle precipitazioni e la maggiore frequenza di eventi estremi come siccità ed inondazioni, soprattutto in regioni che sono già soggette a disastri naturali causati dal clima, potrebbero avere un impatto non trascurabile sulle produzioni agricole mondiali aggravando, soprattutto nei paesi più poveri caratterizzati da economie più fragili, il problema della disponibilità di alimenti per le fasce meno abbienti della popolazione (FAO, 2009b).

Accanto al problema di garantire a tutti l'accesso a una sufficiente quantità di cibo non di minore importanza è quello di garantire alimenti salubri che non danneggino la salute del consumatore (WHO,2002).

Anche l'igiene degli alimenti o "food safety" è un tema che accompagna l'umanità da sempre e che non ha ancora trovato una soluzione. Note storiche sulla sicurezza alimentare risalgono a 12-15.000 anni or sono quando l'uomo di Cro Magnon morì vittima di un'intossicazione alimentare. Le sue ossa fossilizzate hanno conservato traccia di questo avvenimento ma si ignora, ovviamente, se egli abbia ingerito dell'erba erroneamente scelta, ovvero sia stato vittima della maldestra preparazione di un pasto, oppure se questo pasto, anche a base di graminacee, fosse contaminato da sostanze tossiche a livello tale da causarne la morte (Lanzola e Piva, 2004). La relazione tra qualità dei cibi, stato di salute, qualità e aspettativa di vita delle popolazioni è un aspetto ben documentato da Matossian che, nel volume "Poisons of the Past Molds, Epidemics, and History" (1989), esamina, nel periodo intercorrente fra il quattordicesimo e il diciottesimo secolo, la possibile relazione esistente fra la comparsa di grandi epidemie ed il consumo di alimenti, soprattutto certi cereali, sospettati di contenere sostanze tossiche in Europa. Eventi che determinarono una drammatica mortalità e furono responsabili di cicliche gravi depressioni demografiche in Europa condizionando la storia, l'assetto socio-politico e religioso in molte aree (Matossian, 1989).

Sebbene lo sviluppo delle conoscenze dell'uomo in campo scientifico abbia permesso di fare grandissimi passi avanti sia nella tecnica di produzione degli alimenti sia nelle tecniche di conservazione tali da garantire, nei cibi oggi disponibili sul mercato, standard di sicurezza elevati ricorrenti sono i problemi legati alla sicurezza igienica degli alimenti che causano allarmi, non solo a livello nazionale o comunitario, ma addirittura mondiale.

Alcuni esempi di allarmi verificatisi nel passato più recente sono le zoonosi causate da nuovi patogeni, ed in particolare, l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), l'influenza aviaria, la febbre catarrale degli ovini e la peste suina classica (Epicentro, 2009). Ma gravi allarmi hanno causato anche la contaminazione degli alimenti dovute alla presenza di sostanze chimiche indesiderate.

Alcuni esempi sono la contaminazione da diossina degli alimenti di origine animale prodotti in Belgio alla fine degli anni '90 contaminazione che si è stata riscontrata anche recentemente nelle mozzarelle di bufala campane causata dalla errata gestione dei rifiuti urbani (La Repubblica, 2008). Altro esempio è la contaminazione da melamina, sostanza nociva comunemente utilizzata per la produzione di plastiche, di grandi partite di latte di origine cinese. La sostanza aggiunta fraudolentemente al latte al fine di aumentarne il contenuto in proteine, solo in Cina, ha reso necessario per 52.857 bambini il trasferimento in ospedale a causa dei malori accusati dopo aver ingerito il latte adulterato e tuttavia non si esclude che esso possa essere stato presente come ingrediente in cibi confezionati e distribuiti in tutto il mondo.

Accanto a questi eventi gravi ma episodici si stima che, ogni anno nel mondo, un terzo della popolazione dei paesi sviluppati sia colpita da malattie di origine alimentare ed essendo i poveri la fascia di popolazione più colpita si ipotizza che questo problema sia sicuramente più diffuso nei paesi in via di sviluppo. Infatti in questi paesi ogni anno circa 2,2 milioni di persone muoiono a causa di malattie diarroiche dovute all'ingestione di acqua o cibo contaminato. Il verificarsi di malattie diarroiche è il sintomo più comune originato dalle malattie di origine alimentare, tuttavia queste malattie possono causare insufficienze renali ed epatiche, disturbi cerebrali e neurali, e infine nei casi più gravi causare la morte. Altre complicanze di lungo periodo di non secondaria importanza sono l'insorgenza di artriti e paralisi (WHO, 2002).

Il problema della sicurezza alimentare non è solo limitato alla alimentazione umana ma anche a quella animale (Causin, 2009). Infatti l'alimentazione degli animali con mangimi contaminati può avere dei riflessi negativi anche sulla salute umana. Molto preoccupante è il fenomeno del carry-over per cui un contaminante tossico presente nella razione alimentare viene assorbito dall'animale senza che le sue capacità tossiche vengano denaturate dai processi digestivi contaminando anche i prodotti alimentari derivanti dall'animale. Ad esempio la diossina se contenuta nei mangimi determina la contaminazione dei prodotti animali derivati come la carne e le uova, altro esempio è l'accumulo di mercurio nelle carni di pesce o la contaminazione del latte da parte della forma

trasformata della aflatoxina B1 (AA.VV., 2006a). Anche se non di secondaria importanza sono gli effetti economici negativi che l'impiego di mangimi contaminati ha sul comparto zootecnico infatti la presenza di contaminanti tossici nei mangimi può causare un aumento, negli animali, della sensibilità alle malattie, una riduzione della fertilità e della quantità e qualità delle produzioni da essi ottenibile.

1.2 Sicurezza alimentare e pacchetto igiene.

La globalizzazione dei mercati e la notevole complessità dei processi produttivi oggi utilizzati per la produzione o conservazione degli alimenti hanno aumentato il rischio del verificarsi di contaminazioni alimentari imponendo la regolamentazione di tutti gli aspetti riguardanti l'organizzazione degli interscambi e le metodologie di produzione degli alimenti per poter tutelare la salute del consumatore in modo efficace (WHO, 2002). A livello mondiale, gli organismi maggiormente coinvolti in materia di sicurezza degli alimenti sono la FAO (Food and Agriculture Organization) e l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) che congiuntamente già nel 1963 hanno dato vita al Codex Alimentarius, un programma creato per sviluppare standard e linee guida orientate a proteggere la salute dei consumatori. In Europa, il concetto di sicurezza alimentare è diventato una priorità in tempi più recenti. Le prime valutazioni sul tema risalgono all'anno 1997 con il "Libro verde della Commissione sui principi generali della legislazione in materia alimentare dell'Unione Europea" e hanno trovato una formulazione condivisa nel "Libro Bianco sulla sicurezza alimentare" del 2000. Tali documenti fondamentali hanno ispirato l'attuale impianto normativo comunitario in materia di sicurezza alimentare. A partire dal Regolamento CE 178/2002 ("General Food Law"), che introduce il principio fondamentale di un approccio integrato di filiera, si è giunti fino all'entrata in vigore del cosiddetto "Pacchetto Igiene" il 1° gennaio 2006 con cui cambiano definitivamente le regole comunitarie sull'igiene e il controllo ufficiale degli alimenti (ISS, 2009a). Uno dei risultati fondamentali raggiunti dal pacchetto igiene è l'omogeneità dei criteri riguardanti l'igiene delle produzioni alimentari a livello di tutti gli Stati Membri, omogeneità che si

riflette anche nei metodi di controllo applicati che devono presentare i medesimi standard su tutto il territorio della Comunità Europea e vengono applicati anche sugli alimenti che entrano all'interno del mercato europeo provenienti da paesi terzi. Precedentemente esistevano infatti, notevoli differenze tra le legislazioni dei vari paesi riguardo ai concetti, ai principi e alle procedure in materia alimentare. Uniformando le norme sanitarie, si è resa così possibile la libera circolazione di alimenti sicuri contribuendo in maniera significativa al benessere dei cittadini.

I principi generali sui quali verte la nuova legislazione comunitaria sono:

- controlli integrati lungo tutta la catena alimentare;
- interventi basati sull'analisi del rischio;
- responsabilità primaria dell'operatore del settore per ogni prodotto da lui realizzato, trasformato, importato, commercializzato o somministrato;
- rintracciabilità dei prodotti lungo la filiera;
- figura del consumatore come parte attiva della sicurezza alimentare.

1.3 Sicurezza alimentare e micotossine.

Uno tra i fattori di rischio che possono compromettere la sicurezza delle derrate alimentari, siano esse destinati al consumo umano o alla costituzione di mangimi ad uso zootecnico, è la presenza di contaminanti chimici. Essi possono essere di natura e origine diversa come ad esempio residui di pesticidi, metalli pesanti, residui di farmaci utilizzati a scopo profilattico, terapeutico o auxinico in zootecnia, residui di contaminanti ambientali, diossine, ecc. Tra queste sostanze particolare preoccupazione e attenzione va rivolta alle micotossine (ISS, 2009b).

La contaminazione degli alimenti da micotossine è una problematica molto complessa da gestire poiché ad oggi sono conosciute più di trecento micotossine differenti che presentano effetti sulla salute degli organismi superiori molto diversi legati alla loro azione lesiva sulle funzioni cellulari, alcune esplicano azione nefrotossica (ocratossine), epatotossica (aflatossine), immunotossica

(aflatossine, ocratossine), mutagena (aflatossine), teratogena (ocratossine) e cancerogena (aflatossine, ocratossine, fumonisine).

Effetti tra l'altro che possono differire a seconda della frequenza e dalla quantità di micotossina assunta con gli alimenti, dalla tossicità del composto, dal peso corporeo dell'individuo, dalla presenza di altre micotossine e da fattori dietetici, determinando l'insorgenza di micotossicosi croniche o acute. Ad esempio nell'uomo è più frequentemente osservata l'insorgenza di sintomatologie legate all'esposizione cronica a queste tossine, vista la variabilità della dieta assunta e la durata media della vita, mentre negli animali allevati, la breve durata del ciclo produttivo e l'omogeneità della dieta, può portare più frequentemente all'insorgenza di sintomatologie di tipo acuto.

Le micotossine sono prodotti del metabolismo secondario di microorganismi fungini (muffe), ad oggi sono conosciute oltre cento specie fungine appartenenti a generi differenti in grado di sintetizzare queste tossine (AA.VV, 2006a). Specie fungine che esprimono caratteristiche morfologiche e richieste ecologiche molto diverse tra loro infatti la contaminazione delle derrate alimentari da micotossine è influenzata ampiamente dalle condizioni climatiche delle aree di produzione, dalle pratiche di coltivazione e di conservazione, e dal tipo di substrato interessato, in quanto alcune specie fungine sono in grado di svilupparsi più facilmente su alcuni prodotti rispetto ad altri. Inoltre la colonizzazione fungina e la conseguente contaminazione da micotossine delle derrate alimentari può avvenire sia durante la fase di produzione in campo sia dopo il raccolto durante i processi di conservazione (in magazzini, silos, ecc.), trasformazione e trasporto (AA.VV, 2006a; GLM, 2009b).

Numerose sono le matrici alimentari esposte alla contaminazione diretta da micotossine semi oleaginosi (arachidi, girasole, semi di cotone, ecc.), frutta secca ed essiccata, legumi, spezie, caffè e cacao ma particolare preoccupazione desta la suscettibilità a questa problematica dei cereali (frumento, riso, orzo, segale, ecc.) ed in particolare del mais. Essendo i cereali, in tutto il mondo, alla base sia dell'alimentazione umana sia animale (Miraglia e Brera, 2004) e rappresentando il mais la

coltura più rilevante per il settore agricolo a livello mondiale, si può capire come la gestione del problema cereali e contaminazione da micotossine abbia un'importanza fondamentale.

A livello europeo per poter gestire correttamente la problematica, non solo per tutelare la salute umana, obiettivo fondamentale della legislazione sulla sicurezza alimentare, ma anche per limitare gli effetti negativi che esse hanno sul comparto zootecnico, la commissione contaminanti della Comunità Europea (DG-SANCO) con l'appoggio dell'EFSA (European Food Safety Agency) ha promosso e promuove periodici incontri con esperti, operatori del settore, enti di ricerca, rappresentanti degli stati membri, con lo scopo di individuare e monitorare la presenza di micotossine nelle produzioni europee, valutarne l'effetto sulla salute umana ed animale e le possibilità di controllo stabilendo, per le micotossine che in base all'analisi del rischio si sono dimostrate problematiche, livelli massimi di presenza (GLM, 2009b).

Attualmente le micotossine per cui esistono dei limiti massimi cogenti al livello massimo di contaminazione, almeno negli alimenti destinati al consumo umano, sono le aflatossine, l'ocratossina A, il deossinivalenolo, lo zearalenone e le fumonisine. Per quanto riguarda le aflatossine i limiti massimi di contaminazione delle derrate alimentari destinate all'uso alimentare umano sono indicati nel regolamento CE n. 1881/2006 in cui per ogni matrice è indicato un limite per l'aflatossina B₁ e la somma tra le diverse aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂ mentre per quanto riguarda il comparto zootecnico i limiti massimi di contaminazione dei mangimi sono indicati nella direttiva CE 100/2003. Per tutte le altre micotossine sopra elencate, mentre esistono dei valori di riferimento per il loro tenore massimo negli alimenti destinati all'uso umano, per i mangimi sono indicati solamente dei valori di riferimento riportati nella raccomandazione CE 576/2006 nella quale tra l'altro sono indicati dei limiti di riferimento anche per le tossine T2 e HT2, tossine non normate nell'ambito della legislazione riguardante l'uso alimentare umano. In particolare per l'ocratossina A i valori di riferimento per l'alimentazione umana sono indicati nel regolamento CE 1881/2006 dove erano indicati anche i valori di riferimento per le aflatossine, mentre i limiti per quanto riguarda le

Fusarium-tossine deossinivalenolo, zearalenone e le fumonisine sono stati recentemente rivisti ed aggiornati nel regolamento CE 1126/2007.

Come è possibile osservare da quanto sopra riportato la legislazione riguardante il problema della contaminazione da micotossine delle derrate alimentari ad uso alimentare umano o zootecnico, come anche la legislazione riguardante la sicurezza alimentare, è in continua evoluzione ed evolve all'accrescersi delle conoscenze scientifiche, epidemiologiche e tecniche riguardanti la gestione del problema.

Nell'articolo di seguito riportato è presentato un breve report degli argomenti trattati nel sesto forum sulle *Fusarium* tossine svoltosi a Bruxelles nel Febbraio 2009 organizzato dalla commissione contaminanti della consiglio europeo DG-SANCO la cui agenda prevedeva 5 sessioni principali riguardanti: esperienze pratiche nella gestione della problematica contaminazione da *Fusarium* tossine delle derrate alimentari ad uso alimentare umano con i presenti limiti massimi di contaminazione, tossine T2 e HT2 presenza e possibilità di controllo, nuove conoscenze sulle *Fusarium* tossine, esposizione della popolazione alle *Fusarium* tossine, gestione della problematica nel comparto alimentazione umana e alimentazione zootecnica (GLM, 2009a).

Bibliografia:

- A.A.V.V., 2006a. Mais e sicurezza alimentare. Ed. Veneto Agricoltura, Sezione per l'innovazione e lo sviluppo rurale.
- AA.VV., 2006b. Che rischio c'è? Alimenti e sicurezza. Ed. Mipaf – Fricom
- Castellani, N., 2009. Il G8 agricolo getta il seme per un nuovo ruolo dell'agricoltura. L'informatore Agrario 54 (17), 8-10.
- Causin R., Scopel C. e Rasera R. , 2009. Conoscere le vie infettive per combattere le fumonisine. L'informatore agrario. 15: 64-68.
- Corriere della Sera, 2008. Cina: si allarga lo scandalo del latte contaminato, coinvolti in 53mila.
http://www.corriere.it/esteri/08_settembre_21/cina_latte_contaminato_1fe16622-87fb-11dd-b5e4-00144f02aabc.shtml

- Epicentro, 2009. La sicurezza alimentare e la sanità veterinaria.
<http://www.epicentro.iss.it/focus/piano-sani/piano/Cap.%205%20-%20Parte%20Seconda.pdf>
- Food and agriculture organization (FAO), 2009a. Food security and the financial crisis.
<http://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/018/k6360e.pdf>
- Food and agriculture organization (FAO), 2009b. Cambiamento climatico e sicurezza alimentare vanno affrontati insieme. <http://www.fao.org/news/story/it/item/37840/icode/>
- Gruppo di lavoro micotossine (GLM), 2009a. 6th Fusarium Forum UE.
<http://www.micotossine.it/pagina.asp?lang=it&rif=2&pag=109>
- Gruppo di lavoro micotossine (GLM), 2009b. Il gruppo di lavoro micotossine (GLM) in Italia ed in Europa. Terzo congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2009.
- Istituto superiore di sanità (ISS), 2009a. L'Italia e la strategia europea per la sicurezza alimentare.
<http://www.ministerosalute.it/sicurezzaAlimentare/paginaInternaMenuSicurezzaAlimentare.jsp?id=1136&lingua=italiano&menu=sicurezza>
- Istituto superiore di sanità (ISS), 2009b. Sicurezza chimica.
<http://www.ministerosalute.it/sicurezzaAlimentare/paginaMenuSicurezzaAlimentare.jsp?menu=chimica&lingua=italiano>
- La Repubblica, 2008. Mozzarella, la Ue accusa "Misure italiane insufficienti".
<http://www.repubblica.it/2008/03/sezioni/cronaca/mozzarelle-diossina/ue-mozzarelle/ue-mozzarelle.html>
- Lanzola E., Piva G., 2004. Sicurezza in alimentazione. Dal campo alla tavola. Supplemento a "Lettera dell'Istituto Danone - ITEMS NEWS".
- Matossian M.K., 1989. Poisons of the Past Molds, Epidemics, and History. Yale University Press.
- Ministero delle politiche agricole e forestali (Mipaf), 2009. Dichiarazione finale dei ministri dell'agricoltura dei paesi G8. <http://www.g8agricultureministersmeeting.mipaaf.com>
- Miraglia e C. Brera, 2004. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Primo congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004
- United nations general assembly (Unga), 1948. Dichiarazione universale dei diritti umani.
http://it.wikipedia.org/wiki/Dichiarazione_universale_dei_diritti_umani
- WHO/FAO, 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. WHO technical report series ; 916.
- World Health Organization (WHO), 2002. WHO global strategy for food safety: safer food for better health. <http://www.who.int/fsf>.

ARTICOLO

FUMONISINE GUARDIA ANCORA ALTA

Enrico Costa¹ e Riccardo Rasera²

¹ GLM – Gruppo di lavoro micotossine. Piazza costituzione 8, 40100 Bologna (BO).

² Dipartimento Territorio e Servizi Agroforestali – Sez. Patologia Vegetale – Università degli Studi di Padova. Viale dell'università 16, 35020 Legnaro (PD).

Publicato in: Supplemento a L'Informatore Agrario. 2009 16: 9.

L'INFORMATORE AGRARIO

www.informatoreagrario.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.p.A. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.

• NOVITÀ DAL VI FORUM SULLE FUSARIUM TOSSINE

Fumonisine, guardia ancora alta

I principali esperti europei di micotossine sono concordi: le *Fusarium* tossine hanno un comportamento difficilmente prevedibile e le tecniche analitiche vanno riviste

Gli attuali limiti vanno mantenuti anche per i prossimi anni con l'impegno di proseguire i monitoraggi. Questa è la frase che riassume il «VI *Fusarium* toxin Forum», incontro internazionale dedicato alle micotossine che si è tenuto a Bruxelles lo scorso febbraio.

Tantissimi i temi affrontati in questa due giorni, a rappresentare l'Italia oltre ai delegati istituzionali (Ministero della salute e Istituto superiore di sanità) era presente anche il Gruppo di lavoro micotossine (Glm) che dal 2006 partecipa ai forum comunitari proposti dal comitato contaminanti Dg-Sanco allo scopo di mantenere aggiornate le istituzioni europee sulla qualità sanitaria delle produzioni italiane. L'intervento del Glm ha sottolineato come per i frumenti, se non si verificano annate con andamenti climatici anomali favorevoli allo sviluppo dei funghi micotossigeni (come il 2008), le produzioni presentino contaminazioni limitate sia da deossinivalenolo (DON) sia da zearalenone (ZEA), tossine per cui già esistono livelli

massimi di presenza. Stesso discorso per le micotossine T2 e HT2 di cui, proprio in questo forum, si è discussa la possibilità di stabilirne i limiti massimi di presenza.

Per quanto riguarda il mais il problema rimane il livello di contaminazione da fumonisine che, sebbene sia variabile a seconda degli anni e delle zone di produzione, può facilmente superare i limiti per l'alimentazione animale.

Altri punti su cui la relazione italiana ha richiamato l'attenzione dell'assemblea sono stati: la difficoltà di applicare in modo corretto il metodo di campionamento ufficiale indicato nel regolamento 401/06, la mancanza di metodi rapidi di screening accreditati da utilizzare nella fase di ricezione delle partite presso i centri di stoccaggio per permettere la separazione dei lotti e la standardizzazione dei metodi ufficiali.

Un problema europeo

La prima sessione del Forum ha avuto come obiettivo quello di valutare quale sia stato l'effetto dell'entrata in vigore delle disposizioni legali in materia di tossine da *Fusarium* sul settore cerealicolo (regolamenti CE 1881/06 e CE 1126/07 e raccomandazione 576/06).

Le relazioni delle diverse associazioni di categoria (Copa-Cogeca, The European Flour Millers, Coceral, Caobisco, Esa) hanno ribadito come il problema della contaminazione da micotossine nei cereali sia fortemente connesso all'andamento climatico che caratterizza i diversi areali e le diverse annate. Quindi la scelta di un'oculata tecnica agronomica, sebbene risulti sempre fondamentale, non permette un controllo stabile delle contaminazioni in annate particolarmente favorevoli allo sviluppo dei funghi, come è stato il 2006.

Inoltre la revisione e la possibile abolizione di alcune sostanze attive (azoli) utilizzati sul frumento per la lotta diretta alle fusariosi della spiga potrebbe rendere più difficile il contenimento delle contaminazioni nelle pro-

duzioni provenienti da questa coltura.

Due sono state le richieste di innalzamento dei limiti: la prima riguardante i livelli di DON e ZEA nei mangimi da destinarsi all'alimentazione degli animali più suscettibili come i suini; la seconda riguardante il contenuto di DON nelle farine integrali utilizzate nell'industria biscottiera, i livelli ora in vigore non permettono al prodotto finito di rispettare i limiti fissati.

T2 e HT2: tossine di domani

I molti interventi che hanno animato la seconda sezione dedicata alle tossine T2 e HT2 non hanno comunque permesso di avere un quadro certo della problematica.

Non è stato possibile stabilire con chiarezza: quale sia la quantità massima ingeribile quotidianamente per chilogrammo di massa corporea (TDI) senza che sia atteso nessun danno per il consumatore; quali siano i livelli medi di contaminazione dei cereali e dei loro sottoprodotti nei diversi Paesi, né tantomeno sono state chiarite quali siano le esigenze ecologiche di *Fusarium langsethiae*, fungo che le sintetizza, e quale sia l'effetto dell'applicazione di corrette tecniche agronomiche (BPA e fungicidi) nel contenerne lo sviluppo.

L'intervento di Verstraete

Il presidente del Comitato contaminanti Frans Verstraete nel suo intervento ha sottolineato come sia indispensabile un ulteriore approfondimento sia da parte del Comitato esperti sia dell'Agenzia Europa per la sicurezza alimentare (Efsa) sul problema T2 e HT2. «Nel 2009 si predisporranno nuove proposte per il campionamento di grandi partite - ha assicurato Verstraete - e il laboratorio di riferimento della Comunità Europea lavorerà per approfondire il problema metodi ufficiali-metodi rapidi e incertezza analitica». Per quanto riguarda invece i limiti di legge a oggi vigenti Verstraete ha ricordato come, soprattutto nel comparto zootecnico (raccomandazione CE 576/2006), abbiano apportato un miglioramento della qualità delle merci nel comparto e quindi propone di continuare i monitoraggi mantenendo temporaneamente tali limiti come valori guida.

•
Enrico Costa, Riccardo Rasera
Glm - Gruppo lavoro micotossine

Tutti i documenti sono disponibili sul sito www.glmicotossine.it



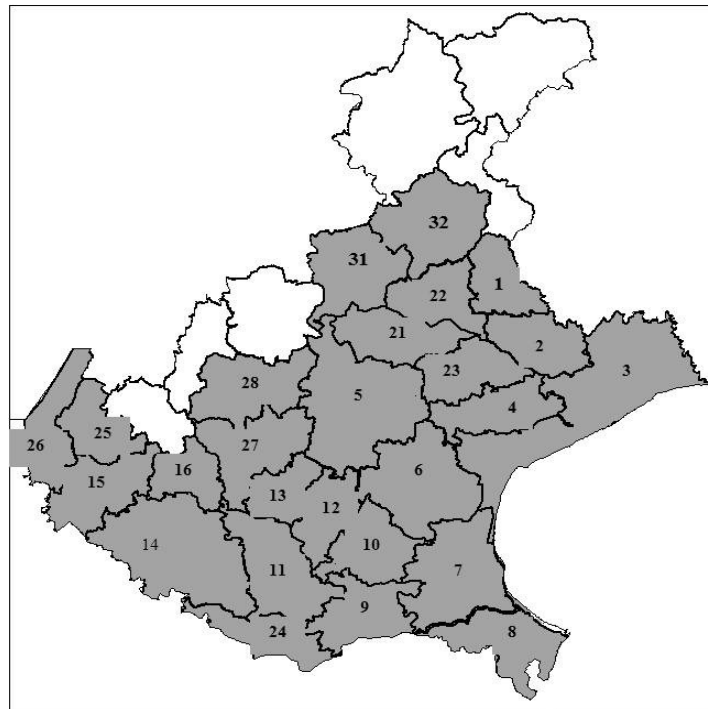
CAPITOLO 2

MAIS E MICOTOSSINE: LA SITUAZIONE IN VENETO

Il Veneto rappresenta la seconda regione italiana, dopo la Lombardia (26,8 milioni di quintali su una superficie di 241 mila ettari), per la produzione del mais (21 milioni di quintali) e per superficie investita in questa coltura pari a 240 mila ettari, seguita dal Piemonte (12,7 milioni di ettari su una superficie di 185.000 ettari) (Istat, 2009).

Vista l'importanza che questa coltura rappresenta per l'economia regionale ma anche nazionale, poiché il 70% del mais viene impiegata nell'alimentazione zootecniche al fine di ottenere, non solo la produzione di prodotti pregiati di trasformazione quali i prosciutti e i formaggi, ma anche di alimenti che sono alla base della dieta umana come carni, uova e latte, (Zaghi, 2008), la regione Veneto ha finanziato dal 2004 un Piano per la Sicurezza Alimentare con lo scopo di monitorare la presenza delle micotossine all'interno della granella di mais. Nell'arco dei primi cinque anni di vita del piano di monitoraggio grazie alla collaborazione di ARAV (Associazione Regionale Allevatori Veneti) e dei consorzi agrari provinciali presenti sul territorio veneto è stato possibile raccogliere da 120 aziende, distribuite nelle diverse aree agrometeorologiche (zone caratterizzate dalla presenza di almeno 2 stazioni agrometeorologiche, omogeneità colturale e omogeneità climatica e orografica) in cui è stata divisa la regione, 600 campioni di granella di mais del peso di circa 1kg l'uno (fig.2.1). I campioni sono stati completamente sfarinati e analizzati presso il laboratori dell'Istituto per la Qualità e le tecnologie Agroalimentari di Veneto Agricoltura con tecniche analitiche differenziate a seconda della micotossina oggetto di rilevazione: per l'aflatossina B₁ e le fumonisine totali (B₁+ B₂) si è utilizzato il metodo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) mentre per i tricoteceni di tipo A e B è stato utilizzato il metodo GC-MS (Gas Chromatography-mass spectrometry).

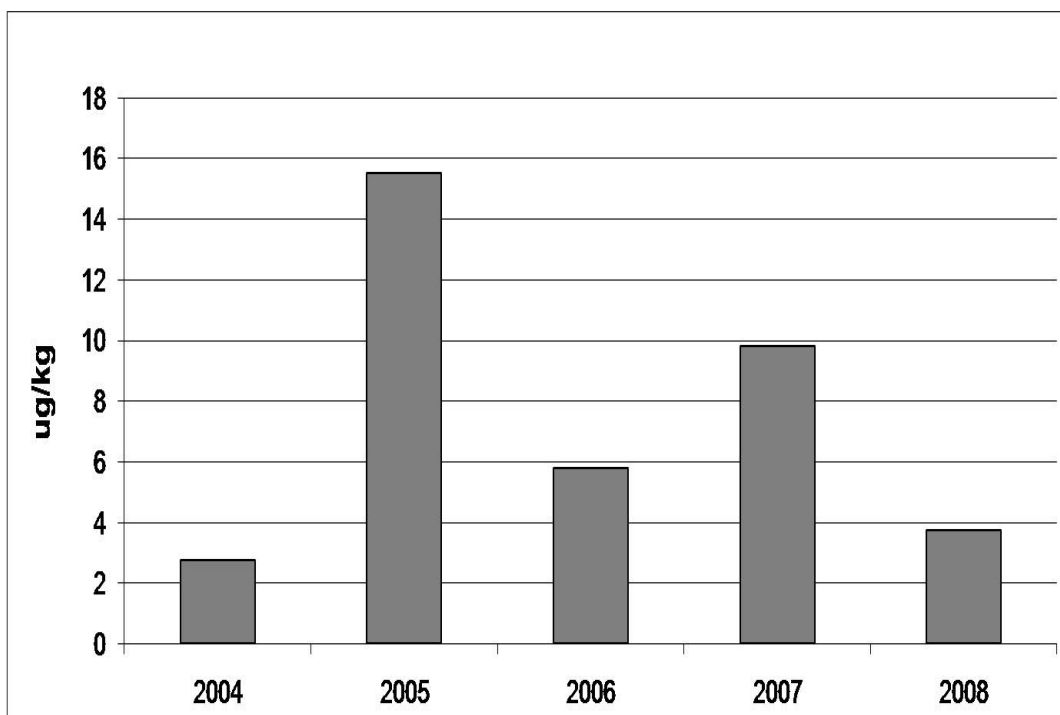
Fig. 2.1. Divisione in aree agrometeorologiche della regione Veneto.



I risultati ottenuti, come atteso, hanno messo in rilievo come la granella di mais sia ogni anno contaminata da più micotossine contemporaneamente e come i livelli siano variabili a seconda della zona di provenienza. Particolare preoccupazione desta la presenza dell'aflatossina B1 il quale livello di contaminazione risulta negli anni 2005, 2006 e 2007 mediamente superiore al limite indicato per il granturco da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari che è fissato a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Reg. CE 1881/2006). Tale superamento ne rende difficile anche l'impiego in zootecnia per l'alimentazione delle vacche da latte poiché per il ben noto fenomeno del carry-over l'aflatossina B1 è rinvenibile nel latte nella sua forma metabolizzata M1 (metabolita modificato) (Bennet e Klick, 2003). Tenendo presente l'esistenza di un' elevata variabilità individuale e di razza, il fattore di carry over raggiunge valori variabili dall'1 al 3%, a seconda della fase di lattazione (Pietri et al., 2004), pertanto è sconsigliato, in via precauzionale, l'impiego di mangimi che contengano, direttamente

mais o prodotti secondari derivanti dal mais, con tenori di aflatossina B1 superiori a 5 µg/kg, essendo il limite massimo consentito nel latte pari a 0,05 µg/kg (fig. 2.2).

Fig. 2.2 Livello di contaminazione da Aflatossina B1 della granella alla raccolta (µg/kg) rilevato nell'ambito del Piano per la Sicurezza Alimentare.



Per quanto riguarda invece la presenza di *Fusarium*-tossine nelle produzioni di mais venete, le contaminazioni da zearalenone, tricoteceni di tipo A (T2 e HT2) e tricoteceni di tipo B (deossinivalenolo) (fig. 2.2 e 2.3) risultano sporadiche o di bassa entità legate principalmente ad anomali andamenti climatici che possono favorire la colonizzazione della spiga da parte dei *Fusaria* che causano il marciume rosso della spiga (Logrieco et al.,2002). Infatti solamente nell'annata agraria 2005, caratterizzata da piovosità estiva superiore alla media, si è registrato un livello di contaminazione da deossinivalenolo mediamente superiore a quello registrato nelle altre annate (fig.2.2). Valor medio di 950 µg/kg che tuttavia è risultato ben al di sotto del limite massimo indicato per il granoturco non trasformato destinato all'alimentazione umana pari a 1750 µg/kg

(Reg. CE 1126/2007). Anche per quanto riguarda i tricoteceni di tipo A (T2 e HT2) che, come accennato, sono tornati all'attenzione della commissione DG SANCO, i risultati ottenuti sono confortanti indicando, nei due anni di monitoraggio, un livello medio di contaminazione molto basso pari, come somma delle due tossine, a 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nel 2007 con un numero di campioni sopra il limite di detenzione pari al 30% e nel 2008 di 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con un numero di campioni sopra il limite di detenzione pari al 24% (Tealdo et al.,2009) (fig. 2.4).

Fig. 2.3 Livello di contaminazione da deossivalenolo (DON) della granella alla raccolta ($\mu\text{g}/\text{kg}$) rilevato nell'ambito del Piano per la Sicurezza Alimentare.

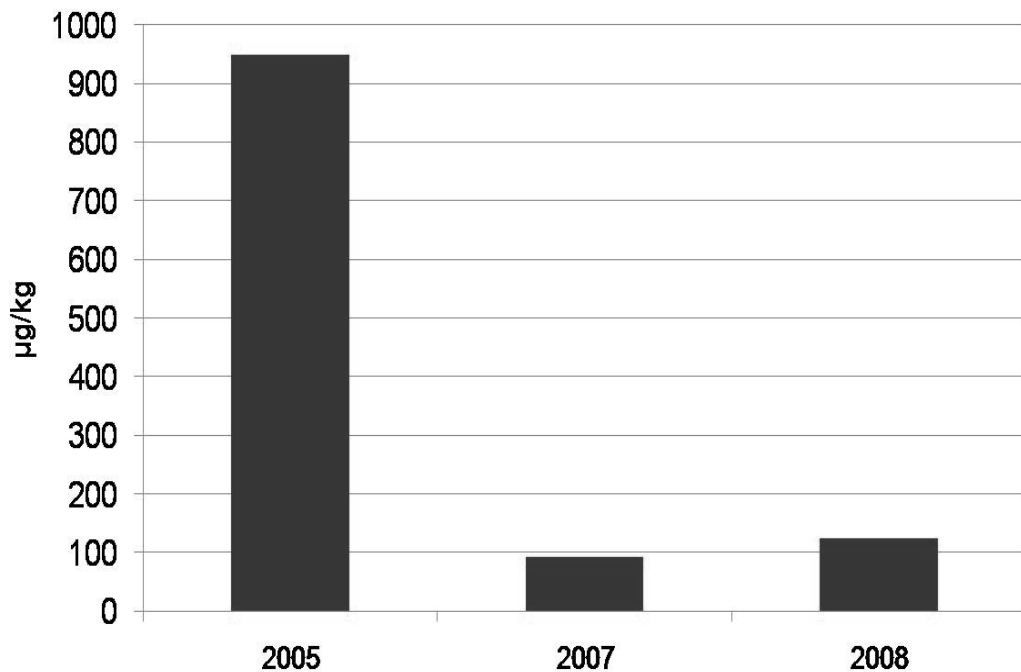
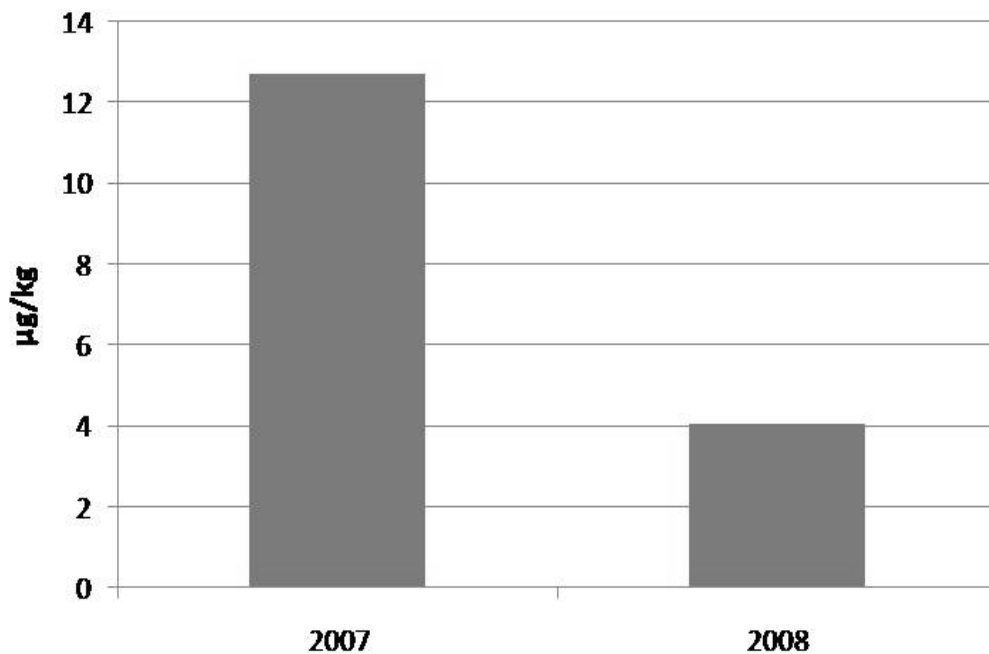


Fig. 2.4 Livello di contaminazione da tricoteceni T2 e HT2 della granella alla raccolta ($\mu\text{g}/\text{kg}$) rilevato nell'ambito del Piano per la Sicurezza Alimentare.



Problematici risultano invece i dati provenienti dalle analisi condotte sul livello di contaminazione da fumonisine della granella di mais, come è possibile osservare i livelli, sebbene variabili negli anni, risultano sempre molto alti e solo nell'annata agraria 2007 si registra un valore medio inferiore a $10000 \mu\text{g}/\text{kg}$. Per intuire però la portata della problematica è utile osservare i grafici 2.6 e 2.7 in cui le partite, sottoposte ad analisi, sono state suddivise rispetto alla loro destinazione d'uso in base ai limiti cogenti per l'alimentazione umana indicati nel Reg. CE 1126/2007 pari a $4000 \mu\text{g}/\text{kg}$ e a quelli raccomandati per l'alimentazione animale indicati nella Racc. CE 576/2006. In particolare nel grafico 2.6 si può notare come solo nel 2007 appena più del 40% delle partite era destinabile al consumo umano mentre negli altri anni una percentuale variabile, ma sempre inferiore al 30%. Per quanto riguarda invece l'uso zootecnico, non considerando il 2007 anno particolarmente sfavorevole all'accumulo di queste tossine, meno del 30% delle partite risulta destinabile all'alimentazione delle specie più sensibili: suini, equini (*Equidi*), conigli e animali da compagnia. Tuttavia grazie alla diversa sensibilità delle specie in allevamento per cui per i pesci il limite

consigliato è di 10 µg/kg, per pollame, vitelli (< 4 mesi) agnelli e capretti il limite consigliato è di 20 µg/kg ed infine per ruminanti adulti (> 4 mesi) e visoni il limite consigliato è di 50 µg/kg, almeno in tre anni (2004, 2007 e 2008) tutte le partite sarebbero potute essere impiegate in zootecnia mentre negli anni 2005 e 2006 per una quota variabile tra il 3% e il 10% si sarebbe dovuta trovare un'altra destinazione d'uso.

Fig. 2.5 Livello di contaminazione da fumonisine (B₁+B₂) della granella alla raccolta (µg/kg) rilevato nell'ambito del Piano per la Sicurezza Alimentare.

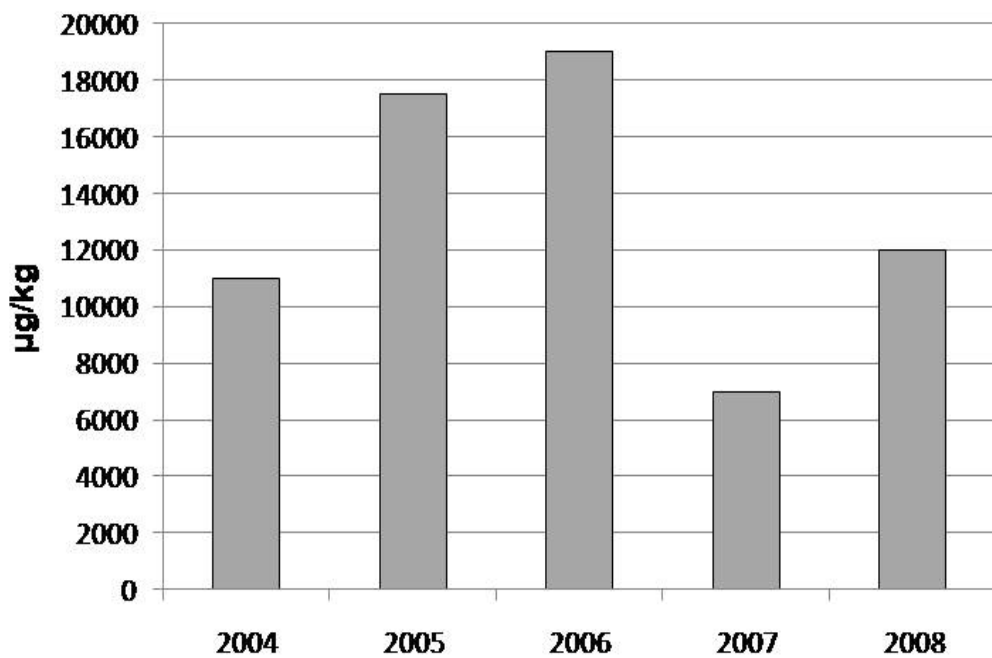


Fig. 2.6 Ripartizione delle partite di mais in base al loro contenuto in fumonisine (B₁+B₂) tra destinabili all'alimentazione umana (< 4000 µg/kg) e non (>4000 µg/kg). Reg. CE 1126/2007.

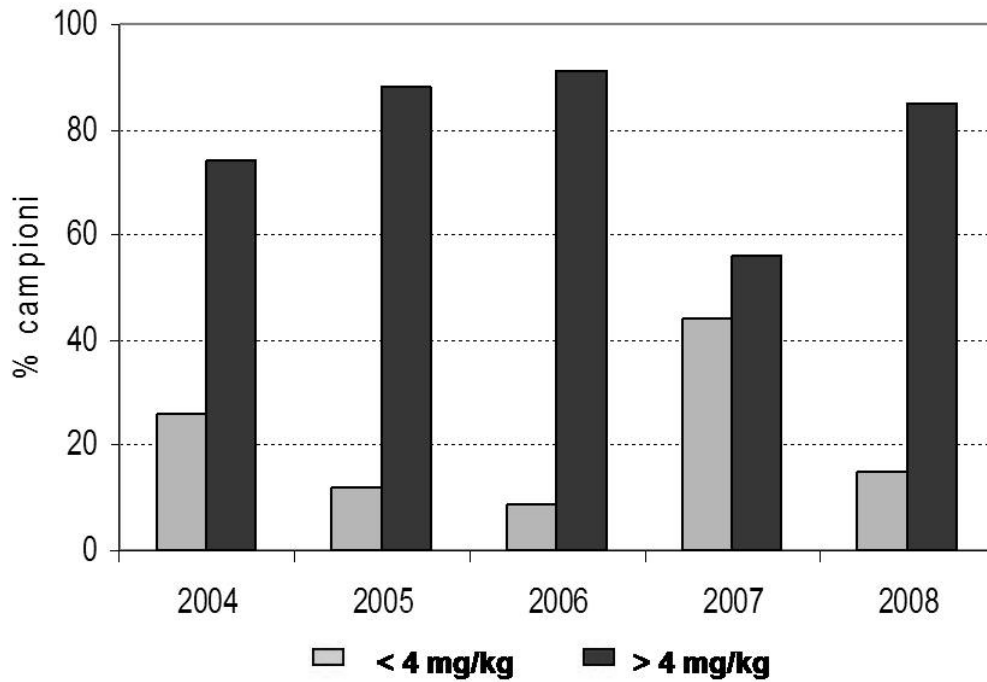
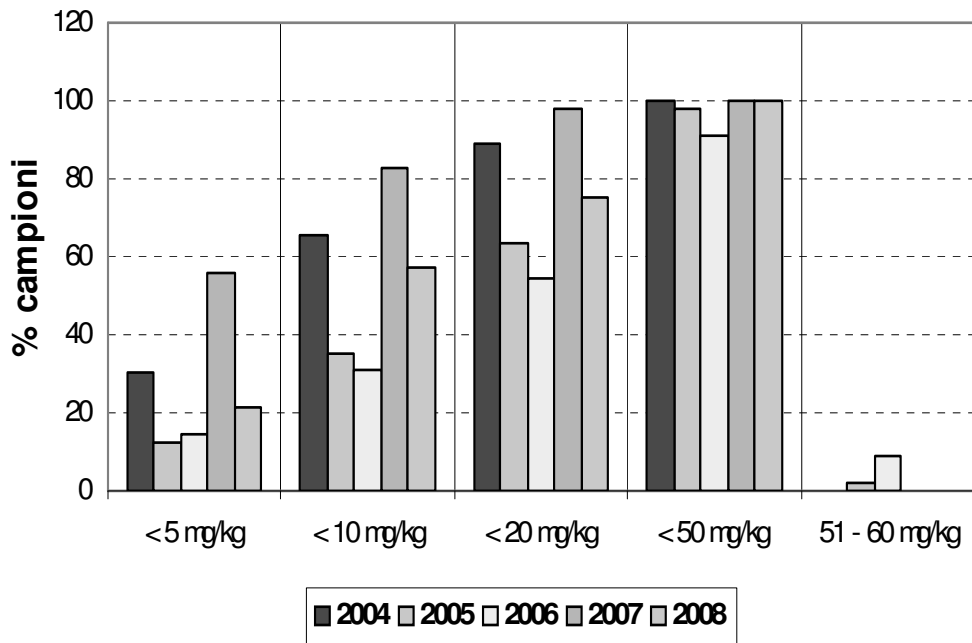


Fig. 2.7 Destinazione delle partite di mais, in base al loro contenuto in fumonisine (B₁+B₂), per l'alimentazione delle diverse specie zootecniche come indicato nella Racc. CE 576/2006.



Il problema della contaminazione da micotossine della granella di mais prodotta in Veneto risulta abbastanza complesso, i dati appena esposti evidenziano tre aspetti problematici: il primo legato alla costante rilevabilità della presenza di aflatossine, il secondo al livello della contaminazione da fumonisine, il terzo alla possibilità di rilevare nello stesso campione di granella la presenza di più micotossine contemporaneamente appartenenti a famiglie chimiche differenti.

Per quanto riguarda le aflatossine il problema non è legato al livello di contaminazione che, anche se su cinque anni di monitoraggio risulta in tre superiore al limite indicato per il granturco da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari, è possibile abbattere con opportune operazioni di pulitura meccanica che possono essere eseguite prima e dopo il processo di essiccazione, ma alla loro costante presenza. Infatti le aflatossine B1, B2, G1, G2 sono inserite dallo IARC (International Agency for Cancer Research) nel gruppo 1 tra le molecole sicuramente cancerogene per l'uomo. Per queste molecole il metodo di approccio utilizzato per proteggere la salute del consumatore è il così detto ALARA (As Low As Reasonably Achievable) dove i limiti di legge indicati servono solamente per ridurre la probabilità di esposizione del consumatore a queste molecole. La situazione risulterebbe non problematica se fosse impossibile rilevarne la presenza poiché l'esposizione anche ad una sola molecola di questa tossina può causare danni cellulari irreversibile.

Per quanto riguarda le fumonisine, che peraltro sono inserite dallo IARC nel gruppo 2B, tra le molecole possibilmente cancerogene per l'uomo insieme all'aflatossina M1 e l'ocratossina A, l'aspetto preoccupante è legato al livello medio di contaminazione rilevato in determinate annate che raggiunge valori tali da rendere sconsigliabile l'uso di questo cereale per l'alimentazione umana e delle specie animali più sensibili (suini, equini, conigli e animali da compagnia) (Tealdo et al., 2009). In questo caso non è preoccupante solo l'effetto che esse possono avere sulla salute umana, in quanto possono concorrere alla formazione del cancro all'esofago e causare anomalie nei neonati (Leslie and Summerel, 2006), ma anche quello che possono avere sugli animali. Negli

animali infatti si possono verificare manifestazioni acute quali la leucoencefalopatia nei cavalli, l'edema polmonare nei maiali e il cancro al fegato e al rene nelle cavie ed effetti cronici che portano ad un aumento della sensibilità alle malattie, alla riduzione della fertilità e della quantità e qualità delle produzioni zootecniche (Soriano and Dragacci, 2004) determinando danni economici che possono anche essere non trascurabili (Smith et al., 1996; Haschek et al., 2001; Voss et al., 1989; Voss et al., 1990; Voss et al., 2001, Marijanovic et al., 1991; Weibking et al., 1993; Bermudez et al., 1995; Bermudez et al., 1997a; Bermudez et al., 1997b).

Terzo ed ultimo aspetto, ma non di minore importanza, è il problema della coesistenza di più micotossine all'interno dello stesso campione di granella. Sebbene presenti a livelli diversificati, a seconda della micotossina e in alcuni casi anche inferiori alle concentrazioni ritenute tossiche per la salute umana o animale, a seconda che appartengano alla stessa famiglia chimica o a famiglie differenti, possono risultare in interazioni additive o sinergiche in grado di aumentarne l'impatto sulla salute umana o animale (Huff et al., 2009; D'Mello et al., 1999; Speijers e Speijers, 2004).

Per i motivi appena riferiti il problema della contaminazione da micotossine della granella di mais è un problema grave che non interessa solo il mais veneto ma anche quello prodotto in quasi tutto il mondo. Tuttavia ad oggi le uniche strategie che sono a disposizione, non solo degli agricoltori veneti ma anche per quelli di tutta Europa e di buona parte del mondo, per far fronte a questa problematica è l'applicazione delle buone pratiche agricole (BPA) affiancate da un efficace controllo degli insetti fitofagi che colpiscono il mais. Tuttavia gli andamenti stagionali, le diverse caratteristiche e pressioni di malattia che distinguono gli areali di coltivazione del mais, condizionano l'efficacia delle pratiche colturali e del controllo dei fitofagi, ma anche lo sviluppo dei funghi micotossigeni e la conseguente contaminazione da fumonisine, rendendo variabile il vantaggio ottenuto con l'applicazione delle BPA (Munkvold, 2003). Per questi motivi è importante ed urgente individuare e mettere in atto tutte le misure possibili per contenere la contaminazione da micotossine nella granella di mais. La via migliore per raggiungere questo obiettivo è

rappresentata dall'integrazione tra gli interventi di lotta indiretta, volti a favorire lo stato generale di vigore delle piante di mais diminuendone la suscettibilità alla colonizzazione da parte dei funghi micotossigeni, e le strategie di lotta diretta che, con l'applicazione di prodotti fitosanitari o agenti di controllo biologico, mirino a controllare le infezioni e lo sviluppo dei funghi micotossigeni.

Bibliografia

- Bennett J. W. and Klich M. 2003. Mycotoxins *Clinical Microbiology Reviews*. 16 (3): 497–516.
- Bermudez, A. J., Ledoux, D. R., and Rottinghaus, G. E. (1995). Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducklings. *Avian Dis.* 39:879–886.
- Bermudez, A. J., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., and Bennett, G. A. (1997a). The individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin and fumonisin B1 in turkeys. *Avian Dis.* 41:304–311.
- Bermudez, A. J., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Stogsdill, P. L., and Bennett, G. A. (1997b). Effects of feeding *Fusarium fujikuroi* culture material containing known levels of moniliformin in turkey poults. *Avian Pathol.* 26:565–577.
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C, 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80:183-205.
- GLM, 2008. Mycotoxin contamination in unprocessed cereals - some data from Italy. V Fusarium Forum, 10-11 gennaio 2008. http://www.micotossine.it/public/pag_554.pdf.
- Haschek, W. M., Gumprecht, L. A., Smith, G., Tumbleson, M. E., and Constable, P. D. (2001). Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ. Health Perspect.* 109:251–257.
- Huff W. E., Kubena L. F., Harvey R. B., Doerr J. A., 2009. Mycotoxin interaction in poultry and swine. *Journal of animal science*, 66:2351-2355
- Istat, 2009. Sistema informativo su agricoltura e zootecnia. <http://agri.istat.it/>
- Marijanovic, D. R., Holt, P., Norred, W. P., Bacon, C.W., Voss, K. A., Stancel, P. C., and Ragland, W. L. (1991). Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. *Poult. Sci.* 70:1895–1901.
- Munkvold G.P., 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 99-116.

- Pietri A., Bernabucci U., Reyneri A. e Visconti A., 2004. Come prevenire le aflatossine nel latte. L'informatore Agrario 14: 49-50.
- Smith, G. W., Constable, P. D., Smith, A. R., Bacon, C. W., Meredith, F. I., Wollenberg, G. K., and Haschek, W. M. (1996). Effects of fumonisincontaining culture material on pulmonary clearance in swine. *Am. J. Vet. Res.*57:1233–1238
- Speijers G.J.A., Speijers M.H.M., 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153: 91–98
- Tealdo E., Barcarolo R., Gambetta S., Causin R., Rasera R., Bonini Baraldi A., Checchetto F., Padoan M., 2009. Esiti di un monitoraggio quinquennale sulla presenza di micotossine nei cereali del Veneto. Terzo congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 settembre 2009.
- Voss, K. A., Plattner, R. D., Bacon, C. W., and Norred, W. P. (1990). Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B1 and B2 content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material. *Mycopathologia* 112:81–92.
- Voss, K. A., Riley, R. T., Norred, W. P., Bacon, C. W., Meredith, F. I., Howard, P. C., Plattner, R. D., Collins, T. F. X., Hansen, D. K., and Porter, J. K. (2001). An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. *Environ. Health Perspect.* 109:259–266.
- Weibking, T. S., Ledoux, D. R., Bermudez, A. J., Turk, J. R., Rottinghaus, G. E., Wang, E., and Merrill, A. H., Jr. (1993). Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. *Poultry Science* 72:456–466.
- Zaghi A., 2008. Produzioni mondiali di mais sempre più transgeniche. L'informatore Agrario, 64 (8): 27-30.

CAPITOLO 3

F. verticillioides E MAIS:

**VIE D'INFEZIONE E CONTAMINAZIONE DA
FUMONISINE**

Il problema della contaminazione da fumonisine della granella di mais non riguarda solamente il mais prodotti in Veneto o nel nord Italia ma anche le produzioni provenienti da tutto il mondo, infatti questa risulta essere, a livello mondiale, la famiglia di micotossine più frequentemente rilevata nella granella di mais (Placinta et al., 1999; Soriano e Dragacci, 2004; Wilke et al., 2007; Battilani et al., 2008).

I principali responsabili della contaminazione da fumonisine sono *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg e in seconda battuta *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg che risultano anche essere le due specie fungine più frequentemente isolate dalle cariossidi di mais (Nelson, 1992; Logrieco et al., 2002). Esse sono in grado di colonizzare la pianta di mais endofiticamente determinando la contaminazione da fumonisine anche di cariossidi che risultano essere asintomatiche tuttavia, associate ad altre specie secondarie di *Fusarium* e raggruppate nella sezione *Liseola*, sono i principali agenti causali del marciume rosa della spiga (Munkvold, 2003 b).

A causa degli effetti negativi che le fumonisine hanno sia sulla salute umana sia su quella animale, comportando ingenti danni alle produzioni zootecniche sia sotto l'aspetto qualitativo che quantitativo (Smith et al., 1996; Haschek et al., 2001; Voss et al., 1989; Voss et al., 1990; Voss et al., 2001, Marijanovic et al., 1991; Weibking et al., 1993; Bermudez et al., 1995; Bermudez et al., 1997a; Bermudez et al., 1997b), la messa a punto di strategie di controllo capaci di contenere la colonizzazione della granella da parte di *F.verticillioides* e la conseguente contaminazione da fumonisine sono diventati aspetti di prioritario interesse nell'ambito della sicurezza alimentare.

Ad oggi in Italia ed in Europa le uniche misure attualmente disponibili per contenere la contaminazione da fumonisine, ma anche di tutte le altre micotossine, nella granella di mais, sono rappresentate dall'applicazione delle buone pratiche agricole (BPA) (Racc. CEE 583/2006) affiancate da un efficace controllo dei fitofagi che possono colpire la pianta di mais. Le BPA sono strategie di controllo indiretto volte a modificare le condizioni generali di sviluppo della pianta con lo scopo di ridurre gli stress ambientali promuovendone il fitness al fine di renderla meno

suscettibile all'attacco dei patogeni (Munkvold, 2003 a) ma anche volte a evitare la sovrapposizione tra il periodo di massima suscettibilità della pianta (fioritura femminile) e il periodo più favorevole per l'emissione e la penetrazione dei conidi di *F.verticillioides* (avoidance).

Negli areali di produzione della Pianura Padana le BPA che sembrano avere un effetto maggiore nel ridurre il contenuto di fumonisine della granella alla raccolta sono: epoca di semina, scelta dell'ibrido, epoca di raccolta, concimazione, diserbo, irrigazione, rotazioni e interrimento dei residui colturali, affiancate da un'efficace controllo di *Ostrinia nubilalis* Hb (piralide) (Maiorano et al., 2007). Tuttavia gli andamenti stagionali, le diverse caratteristiche e pressioni di malattia che distinguono gli areali di coltivazione del mais condizionano l'efficacia delle pratiche colturali e del controllo della Piralide, ma anche lo sviluppo dei *Fusaria* e la conseguente contaminazione da fumonisine, rendendo variabile il vantaggio ottenuto con l'applicazione delle BPA (Munkvold, 2003 a). Inoltre, in areali a forte pressione di malattia come il Veneto, l'applicazione di strategie di controllo indiretto, quali le BPA, non risulta sufficiente a contenere efficacemente lo sviluppo del fungo e la contaminazione da tossine (Tealdo et al., 2009). Risulta quindi indispensabile per conseguire un efficace controllo delle contaminazioni al di sotto di livelli ritenuti sicuri (Reg. CE 1126/2007 e Racc. CE 576/2006) mettere a punto delle strategie di controllo diretto efficaci nel contenere le infezioni di *F.verticillioides*, il suo sviluppo sulla pianta e la conseguente contaminazione da fumonisine.

Le strategie d'intervento diretto, individuabili nell'applicazione di prodotti fitosanitari o agenti di controllo biologico, devono essere messe a punto in primis in relazione alle possibili vie che *F.verticillioides* utilizza per infettare il mais. Tuttavia il contributo dell'inoculo di *F.verticillioides* derivante dalle diverse vie d'infezione, sul contenuto finale di fumonisine della granella non è ben conosciuto e, secondo alcuni autori, può variare a causa delle differenti condizioni ambientali che caratterizzano gli areali di coltivazione del mais (Munkvold, 2003b).

Lo scopo dei due lavori, qui riportati di seguito, è stato proprio quello di definire l'importanza delle differenti vie d'infezione attraverso le quali *F.verticillioides* colonizza la pianta di mais e stabilire se il controllo dell'inoculo che proviene da esse possa portare a concrete e vantaggiose diminuzioni del contenuto di fumonisine nella granella alla raccolta.

Bibliografia

- Battilani, P., Barbano, C., Bertuzzi, T., Marocco, A., Pietri, A., Scandolara, A., Scudellari, D., 2008. Micotossine in Emilia-Romagna, risultati incoraggianti. *Informatore Agrario* 64 (15), 39-41.
- Bermudez, A. J., Ledoux, D. R., and Rottinghaus, G. E., 1995. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducklings. *Avian Dis.* 39:879–886.
- Bermudez, A. J., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., and Bennett, G. A., 1997a. The individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin and fumonisin B1 in turkeys. *Avian Dis.* 41:304–311.
- Bermudez, A. J., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Stogsdill, P. L., and Bennett, G. A., 1997b. Effects of feeding *Fusarium fujikuroi* culture material containing known levels of moniliformin in turkey poults. *Avian Pathol.* 26:565–577.
- Haschek, W. M., Gumprecht, L. A., Smith, G., Tumbleson, M. E., and Constable, P. D., 2001. Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ. Health Perspect.* 109:251–257.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Bottalico, A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108 (7), 597–609.
- Maiorano A., Reyneri A., Maffioli G., Ramponi C., 2007. Stima del «rischio fumonisine» nella granella di mais. *L'informatore Agrario*, 63 (7): 52-57.
- Marijanovic, D. R., Holt, P., Norred, W. P., Bacon, C.W., Voss, K. A., Stancel, P. C., and Ragland, W. L., 1991. Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. *Poult. Sci.* 70:1895–1901.
- Munkvold G.P., 2003 a. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 99-116
- Munkvold G.P., 2003 b. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705-713, 2003.
- Nelson, P.E., 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117 (1), 29–36.

- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78 (1-2), 21-37.
- Smith, G. W., Constable, P. D., Smith, A. R., Bacon, C. W., Meredith, F. I., Wollenberg, G. K., and Haschek, W. M., 1996. Effects of fumonisin-containing culture material on pulmonary clearance in swine. *Am. J. Vet. Res.* 57:1233-1238
- Soriano, J.M., Dragacci, S., 2004. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International* 37 (10), 985-1000.
- Tealdo E., Barcarolo R., Gambetta S., Causin R., Rasera R., Bonini Baraldi A., Checchetto F., Padoan M., 2009. Esiti di un monitoraggio quinquennale sulla presenza di micotossine nei cereali del Veneto. Terzo congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 settembre 2009.
- Voss, K. A., Norred, W. P., Plattner, R. D., and Bacon, C. W., 1989. Hepatotoxicity and renal toxicity in rats of corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Food Chem. Toxicol.* 27:89-96.
- Voss, K. A., Plattner, R. D., Bacon, C. W., and Norred, W. P., 1990. Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B1 and B2 content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material. *Mycopathologia* 112:81-92.
- Weibking, T. S., Ledoux, D. R., Bermudez, A. J., Turk, J. R., Rottinghaus, G. E., Wang, E., and Merrill, A. H., Jr., 1993. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. *Poultry Science* 72:456-466.
- Wilke A.L., Bronson C.R., Tomas A., Munkvold G.P., 2007. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Disease* 91 (9), 1109-1115.

CONOSCERE LE VIE INFETTIVE PER COMBATTERE LE FUMONISINE

Riccardo Raserà¹, Roberto Causin¹ e Cristina Scopel¹

¹ Dipartimento Territorio e Servizi Agroforestali – Sez. Patologia Vegetale – Università degli Studi di Padova.

Abstract

MAIZE FUMONISIN CONTAMINATION: OPPORTUNITY OF CONTROL

Mycotoxin contaminations in maize are a problem for human and animal health with economical effect on cereals chain. Every years Italian maize results contaminated by fumonisins. Responsible of this contamination are the fungi *Fusarium verticillioides* and *F.proliferatum*. Fumonisin production begins mainly in the field and is influenced by environmental conditions during ripening and by cultural techniques. Integrated pest management strategy can be a resource to control this problem. Indirect control strategy such as good agricultural practices (GAP) are actually the only usable strategies to reduce fumonisin contamination but the efficacy change due to different pedo-climatic condition of maize cultivation areas. For direct control strategies the study are going on. Two set of open field trials are planned in the North East of Italy. The first one to determine the influence of different *F.verticillioides* infection pathways on the maize kernel fumonisin contamination. The second one to determine the effects of chemical treatments, carried out at silk stage, on reduction of *F. verticillioides* colonization and fumonisins contamination. The results show that infections occurred trough silk and those promoted by European Corn Borer injuries give a similar colonization but fumonisin content is higher in ECB not controlled thesis. The highest fungal colonization and fumonisin content are found in the thesis where *F. verticillioides* infects maize trough all the possible infection pathways. Moreover chemical treatments, carried out at silk stage, show a strong and significant reduction of fungal colonization of silks, ranged from 100% to 98% and a reduction of fumonisins contamination ranging from 90% to 66%. A correct application of good agriculture practice (GAP) combine with spraying maize plants at flowering with a selected mixture of azoles could be an effective integrated approach to reduce fumonisins contamination of maize.

Publicato in: Informatore Agrario. 2009. 65: 15, 64-67.

Errata corrige: nel GRAFICO 2 il parametro indicato sull'asse verticale (y) non è la percentuale di contaminazione ma di infezione.

L'INFORMATORE AGRARIO

www.informatoreagrario.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.p.A. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.

• NUOVE POSSIBILITÀ CONTRO LA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE

Conoscere le vie infettive per combattere le fumonisine

Per controllare le fusariosi del mais è fondamentale la difesa contro la piralide per limitare le vie di ingresso del fungo. In pochi sanno però che si sono rivelati molto efficaci anche i trattamenti chimici alle infiorescenze femminili con miscele di triazoli

di Riccardo Rasera,
Roberto Causin, Cristina Scopel

La presenza di micotossine nella granella di mais costituisce un problema sia per la salute umana sia per quella animale e può avere gravi ripercussioni economiche su tutta la filiera cerealicola.

Le principali micotossine riscontrate nel mais prodotto nella Pianura Padana sono le fumonisine, il deossinivalenolo e le aflatossine. Le prime due sono prodotte da funghi appartenenti al genere *Fusarium* e la terza da *Aspergillus*.

È importante e urgente individuare e mettere in atto tutte le misure possibili per contenere la contaminazione da micotossine nella granella di mais, con particolare attenzione alle fumonisine.

La via migliore per raggiungere questo obiettivo è rappresentata dall'integrazione tra gli interventi di lotta indiretta, volti a favorire lo stato generale di vigore delle piante di mais e diminuire la suscettibilità ai *Fusaria* e le strategie di lotta diretta che, con l'applicazione di prodotti fitosanitari, mirano a controllare le infezioni del fungo.

Dettaglio sulla lotta indiretta...

Gli interventi di lotta indiretta si concretizzano nell'applicazione delle buone pratiche agricole (Bpa), promosse anche a livello comunitario dalla raccomandazione n. 583 del 2006.

Per quanto riguarda i cereali, in generale, le tecniche agronomiche con mag-

gior impatto sul livello di contaminazione da micotossine riguardano: le rotazioni, l'interramento dei residui colturali, la scelta varietale, l'epoca e densità di semina, la concimazione, il diserbo, la difesa da insetti, l'irrigazione e l'epoca di raccolta (Munkvold, 2003a; Maiorano *et al.*, 2007; Reyneri *et al.*, 2005).

Tuttavia non tutte queste tecniche hanno lo stesso effetto nel ridurre il contenuto di fumonisine nel mais quelle più importanti sono epoca di semina e trat-

tamento contro la piralide, seguite da tipo di ibrido ed epoca di raccolta.

Le scelte tecniche con minor effetto riguardano: concimazione, diserbo e irrigazione, seguite da rotazioni e interrimento dei residui colturali (Reyneri *et al.*, 2005; Glm, 2007; Maiorano *et al.*, 2007).

Queste ultime pratiche sono consigliabili da un punto di vista fitopatologico, poiché contribuiscono efficacemente ad abbassare il potenziale di inoculo dei *Fusaria* tossigeni; tuttavia il vantaggio pratico conseguibile è in parte vanificato dalla diffusione anemofila delle forme di riproduzione dei *Fusaria* (conidi) che possono diffondere il fungo per chilometri (Ooka e Kommedahl, 1977).

L'importanza delle diverse pratiche di coltivazione, però, può variare in relazione alle reali situazioni colturali che caratterizzano i diversi areali. Ad esempio l'ef-



I fungicidi hanno ridotto significativamente le infezioni da *Fusarium* delle sete, con un effetto che si è protratto fino alla maturazione lattea

fetto dell'irrigazione, ritenuto da alcuni autori non particolarmente importante (Reyneri *et al.*, 2005), va considerato alla luce dell'andamento termopluviometrico di giugno-luglio, dato che le fusariosi della spiga sono inversamente correlate al verificarsi di piogge in questi mesi (Munkvold, 2003b).

Quindi, la realizzazione di interventi irrigui, quando la scarsità di precipitazioni originasse stress idrici nelle fasi fenologiche dalla fioritura alla maturazione latte, potrebbe avere un effetto sensibile nel ridurre la contaminazione da fumonisine nella granella alla raccolta.

... e diretta

Le strategie d'intervento diretto devono essere messe a punto, non solo in relazione alle possibili vie che i *Fusaria* utilizzano per infettare il mais, ma devono anche essere individuate le sostanze attive più efficaci, senza trascurare le possibilità offerte dalla lotta biologica, nonché le tecniche, le modalità e le epoche di intervento.

È quindi indispensabile conoscere l'ecologia e l'epidemiologia di *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, che, oltre a essere i principali produttori di fumonisine, sono anche i miceti più frequentemente isolati dal mais nei nostri ambienti (Battilani e Rossi, 2003).

I due funghi sono morfologicamente ed ecologicamente molto simili e normalmente *F. verticillioides* è rinvenuto molto più frequentemente rispetto a *F. proliferatum*.

Se e quando sarà possibile effettuare interventi di lotta diretta *F. verticillioides* sarà il principale bersaglio. Questo fungo può infettare la pianta di mais e raggiungere la granella attraverso varie vie (Munkvold, 2003b; Battilani e Rossi, 2003).

Seme. Le cariossidi utilizzate per la semina, anche se apparentemente sane, possono ospitare un inoculo endofitico di *F. verticillioides*.

Dal seme infetto, seguendo lo sviluppo della pianta, questo fungo può colonizzare sistematicamente il mais, senza dare sintomi visibili, fino a raggiungere la spiga e la granella.

TABELLA 1 - Trattamenti effettuati nella prova sull'importanza delle diverse vie di infezione di *F. verticillioides*

Tesi	Trattamento		
	seme	danni da piralide	sete
Suolo	sterilizzato (1)	controllo totale (3)	protette (4)
Suolo e danni da piralide	sterilizzato (1)	no controllo	protette (4)
Suolo e sete	sterilizzato (1)	controllo totale (3)	no protezione
Suolo e seme	inoculato (2)	controllo totale (3)	protette (4)
Suolo, sete, seme e piralide	inoculato (2)	no controllo	no protezione

(1) Sterilizzazione del seme: immersione per 10 minuti in acqua ossigenata al 15% seguita da immersione per 10 minuti in acqua sterile a 60°C.

(2) Inoculo del seme: immersione per 4 ore in una sospensione conidica (1×10^6 cfu/mL) di ceppi micotossigeni di *F. verticillioides*.

(3) Controllo totale: trattamento settimanale con indoxacarb e clorpirifos.

(4) Protezione delle sete: i fiori femminili sono stati coperti con un sacchetto di carta sostituito settimanalmente.

Suolo. *F. verticillioides* si conserva nei residui colturali presenti nel suolo; quando le condizioni climatiche sono favorevoli può riprendere a svilupparsi e, incontrando le radichette dei germinelli, infettarle; da qui, anche in questo caso, il fungo può svilupparsi endofiticamente. **Infiorescenze femminili (sete).** Durante la fase di fioritura del mais i conidi, che si sono sviluppati sui residui colturali infettati nell'annata precedente, si liberano nell'aria, infettano le sete e attraverso di esse il fungo giunge alle cariossidi in via di formazione.

Attacchi di piralide. I danni causati dall'attività trofica delle larve di questo insetto favoriscono fortemente le infezioni di *F. verticillioides*. Probabilmente oltre alle soluzioni di continuità (rosure) che rappresentano agevoli vie d'ingresso per il fungo, l'aggressione dell'insetto provoca nella pianta uno stress che può

favorire le infezioni e la sintesi di tossine.

Il contributo dell'inoculo fungino derivante dalle diverse vie d'infezione sul contenuto di fumonisine della granella non è ben conosciuto e, secondo alcuni autori, può variare a causa delle differenti condizioni ambientali che caratterizzano gli areali di coltivazione del mais (Munkvold, 2003b).

Per individuare correttamente gli ambiti nei quali realizzare gli interventi di lotta diretta, bisogna definire l'importanza delle differenti vie d'infezione e stabilire se il controllo dell'inoculo, che proviene da esse porta a concrete e vantaggiose diminuzioni del contenuto di fumonisine nella granella alla raccolta.

Per indagare su tali aspetti sono state realizzate due prove di campo.

Prove di campo

Le prove sono state condotte nella campagna agraria 2008, la prova parcellare e lo strip test (controllo chimico) in località Borsea, sud Rovigo, la prova sulle vie di infezione a sud di Monselice.

La sperimentazione è stata realizzata secondo uno schema a blocchi randomizzati con tre ripetizioni, confrontando le tesi trattate come indicato nella *tabella 1*.

Al momento della raccolta da ogni tesi sono state prelevate 100 spighe da cui sono stati ottenuti circa 20 kg di granella.

Successivamente nelle cariossidi sono stati determinati il livello di colonizzazione da *F. verticillioides*, con il metodo delle diluizioni seriali, e la contaminazione da fumonisine, tramite HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

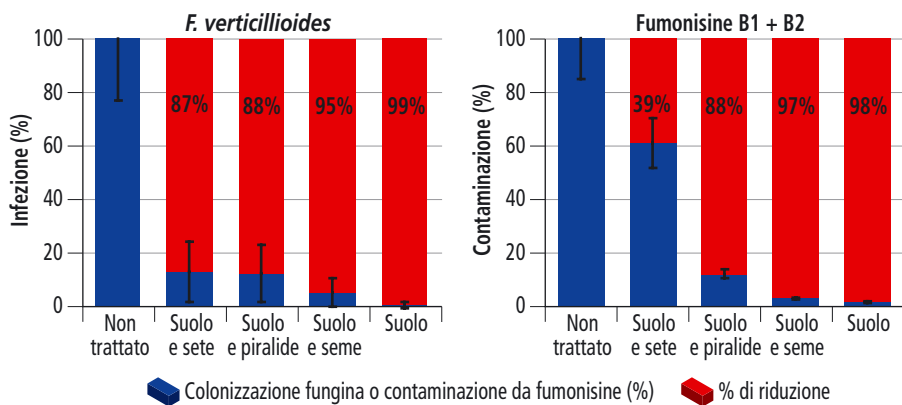
I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'inoculo trasmesso dal suolo attraverso le radici comporta



TABELLA 2 - Trattamenti chimici effettuati nella prova di controllo delle infezioni floreali

Tesi	Miscela di sostanze attive
NT	non trattato
P1	metconazolo + procloraz
P2	tebuconazolo + procloraz
P3	triticonazolo + procloraz
P4	protioconazolo + tebuconazolo

È probabile che oltre alle rosure, che rappresentano agevoli vie d'ingresso per il fungo, l'aggressione della piralide provochi nella pianta uno stress che può favorire le infezioni e la sintesi di tossine



Valori espressi come percentuali riferite alla tesi non trattato (vedi infezione: suolo, sete, seme e danni da piralide). Gli istogrammi rappresentano la media, le barre i limiti di confidenza al 95%.

GRAFICO 1 - Influenza delle diverse vie di infezione sulla presenza di *F. verticillioides* nella granella

Nella tesi in cui il fungo ha infettato la pianta attraverso tutte le possibili vie d'infezione, sia il livello di colonizzazione fungina sia quello di contaminazione sono risultati più alti dei valori rilevati nelle tesi dove il fungo penetrava nella pianta sfruttando una sola via di ingresso; questo suggerisce l'ipotesi che possano instaurarsi interazioni tra le diverse vie di infezione.

una bassissima colonizzazione fungina e uno scarso contenuto di fumonisine nella granella. Un po' più alte, ma sempre di limitata entità, sono risultate la presenza fungina e la relativa contaminazione derivanti dall'inoculo proveniente dal seme.

Le infezioni avvenute attraverso le sete e quelle favorite dagli attacchi di piralide hanno causato un livello di colonizzazione fungina simile, ma con un contenuto di fumonisine superiore nella tesi in cui la piralide non era stata controllata.

Il livello più elevato di carica fungina e fumonisine è stato rilevato nella tesi in cui il fungo ha infettato la pianta attraverso tutte le possibili vie d'infezione.

In quest'ultima tesi, sia il livello di colonizzazione fungina sia quello di contaminazione sono risultati più alti della somma dei valori rilevati nelle tesi dove il fungo penetrava nella pianta sfruttando una sola via di ingresso (grafico 1); questo fatto suggerisce l'ipotesi che possano instaurarsi interazioni tra le diverse vie di infezione.

Lotta alle infezioni tramite le sete

Come già riportato a Borsea (Rovigo) sono state realizzate le prove parcellari e gli strip test per valutare l'effetto dei trattamenti chimici sulle infezioni che avvengono tramite le sete e sul contenuto finale di fumonisine della granella.

Prova parcellare. Il campo sperimentale è stato realizzato secondo uno schema a blocchi randomizzati con tre ripetizioni.

I trattamenti, indicati in tabella 2, sono stati eseguiti 7 giorni dopo l'emissione delle infiorescenze femminili utilizzando una barra a manica d'aria montata su macchina semovente (trampolo).

Su tutte le tesi, la piralide è stata controllata con indoxacarb + clorpirifos.

L'efficacia dei trattamenti fungicidi sul contenimento delle infezioni è stata determinata una settimana dopo la distribuzione dei prodotti fitosanitari e alla

maturazione latte, quantificando, tramite il metodo delle diluizioni seriali, la presenza di *F. verticillioides*.

Al momento della raccolta, l'effetto dei trattamenti è stato determinato rilevando il contenuto di fumonisine nella granella.

I risultati (grafico 2) evidenziano come tutti i fungicidi applicati abbiano ridotto significativamente le infezioni delle sete, con un effetto che si è protratto fino alla maturazione latte.

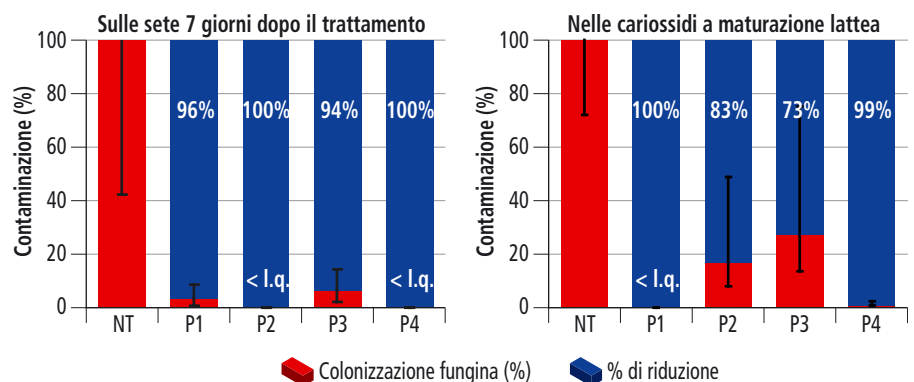
All'abbattimento della carica fungina è corrisposta, nella granella alla raccolta, una diminuzione variabile, tra il 90% e il 66%, del contenuto di fumonisine (grafico 3).

Strip test. Nella stessa località, ma con uno schema sperimentale di tipo strip test, sono state saggiate altre due miscele di prodotti procloraz + tetraconazolo (S1) e maneb + tiofanate-metil (S2) distribuite con trampolo 7 giorni dopo l'emissione delle sete.

Anche in questo caso si è rilevata una significativa riduzione del contenuto di fumonisine nella granella alla raccolta (grafico 3).

Potenziare le buone pratiche per risolvere il problema

Poiché a oggi non esistono fungicidi registrati per l'uso sulla coltura di mais, la lotta chimica non è ancora possibile e l'applicazione delle buone pratiche agricole rappresenta, attualmente, l'unica misura utilizzabile per contenere la contaminazione da fumonisine nella granella di mais.



Valori espressi come percentuali riferite alla tesi NT.

NT = non trattato; P1 = metconazolo + procloraz; P2 = tebuconazolo + procloraz; P3 = triticonazolo + procloraz; P4 = protioconazolo + tebuconazolo. Gli istogrammi rappresentano la media, le barre i limiti di confidenza al 95%. < l.q. = inferiore al limite di quantificazione.

GRAFICO 2 - Effetto dei trattamenti chimici sulla colonizzazione delle sete da parte di *F. verticillioides*

Tutti i fungicidi applicati hanno ridotto significativamente le infezioni delle sete da parte dei *Fusarium*.



L'infezione causata dalla piralide o avvenuta tramite l'ingresso dalle sete causa una colonizzazione fungina molto simile

Purtroppo gli andamenti stagionali e le diverse caratteristiche degli areali di coltivazione, condizionano la realizzazione delle pratiche colturali e influenzano sia lo sviluppo dei *Fusaria*, sia la conseguente contaminazione da fumonisine, rendendo variabile il vantaggio ottenuto con l'applicazione delle Bpa.

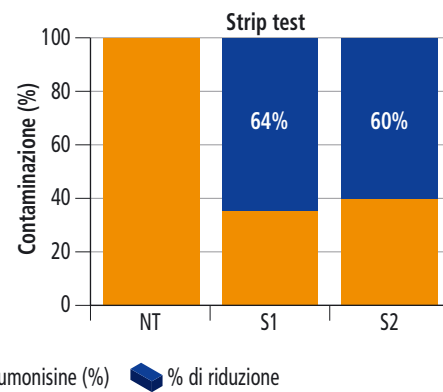
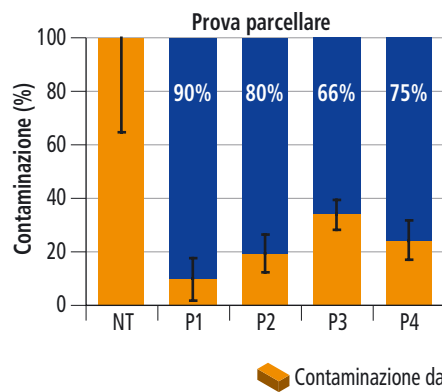
La necessità di stabilizzare il controllo delle fumonisine su livelli efficaci rende necessario lo sviluppo di altre strategie, da implementare con le Bpa.

Tra queste, potrebbe avere particolare interesse la possibilità di controllare direttamente l'inoculo dei *Fusaria* tossigeni.

Come precedentemente sottolineato, nel mettere a punto queste tecniche è fondamentale stabilire quale sia il contributo di ciascuna delle vie di infezio-

Nel nord-est della Pianura Padana i danni provocati dalla piralide sono responsabili del 60% del contenuto finale di fumonisine nel mais

di queste micotossine abbondantemente al di sotto dei limiti indicati nel regolamento Cee n.1126, risultato che non era stato possibile ottenere con il solo controllo della piralide.



Valori espressi come percentuali riferite alla tesi NT.

NT = non trattato; P1 = metconazolo + procloraz; P2 = tebuconazolo + procloraz; P3 = triticonazolo + procloraz; P4 = protioconazolo + tebuconazolo. Gli istogrammi rappresentano la media, le barre i limiti di confidenza al 95%.

GRAFICO 3 - Effetto dei trattamenti chimici sul contenuto di fumonisine B1+B2 nella granella alla raccolta

All'abbattimento della carica fungina è corrisposta, nella granella alla raccolta, una diminuzione variabile, tra il 90% e il 66%, del contenuto di fumonisine. Anche nello strip test si è rilevata una significativa riduzione del contenuto di fumonisine nella granella alla raccolta.

ne nel determinare la contaminazione finale della granella. Per quanto riguarda il nord-est della Pianura Padana, le prove svolte confermano che il peso più importante è da attribuire alle infezioni favorite dai danni provocati dalla piralide che, in questi ambienti, sono responsabili del 60% del contenuto finale di fumonisine.

Un contributo non secondario viene anche dalle infezioni che si sviluppano «via sete», mentre sembrano avere minore peso le fonti di inoculo provenienti dal seme e dal suolo.

Pertanto si conferma fondamentale un buon controllo della piralide sia per limitare le vie di ingresso del fungo, sia per contenere lo stato di stress della pianta causato dall'attività trofica dell'insetto.

Molto efficaci si sono rivelati anche i trattamenti chimici alle sete con miscele di triazoli, che hanno contenuto per un lungo periodo le infezioni, avvenute attraverso tale via, con un importante abbattimento della contaminazione da fumonisine nella granella.

Nelle prove svolte, il trattamento fungicida eseguito alla fioritura ha contenuto la concentrazione

Anche nei confronti delle infezioni provenienti da seme e dal terreno, la lotta chimica è possibile e vantaggiosa, seppur con minor abbattimento delle contaminazioni.

In prove svolte per saggiare l'efficacia di alcuni concianti chimici (Causin *et al.*, 2008) è stato dimostrato che triticonazolo, procloraz + triticonazolo e tiram riescono ad abbassare efficacemente il livello di colonizzazione da *F. verticillioides*, con effetti che si protraggono per almeno un mese dalla germinazione e con riflessi positivi sul contenuto finale di fumonisine della granella. Il vantaggio ottenuto, però, è stato limitato per il prevalere delle infezioni avvenute attraverso le altre vie che, ragionevolmente, poco risentono della concia effettuata al seme. I risultati delle prove svolte, sebbene necessitano delle indispensabili conferme, da ottenere tramite prove di campo realizzate in più località e per più anni, sono molto incoraggianti.

Riccardo Rasera
Roberto Causin
Cristina Scopel

Dipartimento territorio e servizi agroforestali
Sezione Patologia vegetale
Università di Padova
roberto.causin@unipd.it

Lavoro eseguito nell'ambito dei progetti SeCer e Pocofumo finanziati dalla Regione Veneto e con il contributo di Basf Italia e Kws Sud Europa.



Per consultare la bibliografia:
www.informatoreagrario.it/rdLia/09ia15_3872_web

Conoscere le vie infettive per combattere le fumonisine

BIBLIOGRAFIA

- A.A.V.V. (2006) - *Mais e sicurezza alimentare*. Ed. Veneto Agricoltura, Sezione per l'innovazione e lo sviluppo rurale: 11-29.
- Battilani P., Rossi V. (2003) - *Modelling F. verticillioides infection and fumonisin synthesis in maize ears*. Aspects of Applied Biology, 68.
- Causin R., Rasera R., Scopel C. (2008) - *Effect of maize seed-treatments on Fusarium verticillioides infection and fumonisins contamination*. In: Proceedings of the 5th world mycotoxin forum conference. November 17-18, 2008. Noordwijk, the Netherlands.
- Chu F.S., Li G.Y. (1994) - *Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy maize collected from People's Republic of China in regions with incidences of esophageal cancer*. Applied Environmental Microbiology, 60: 847-852.
- Gelderblom W.C.A., Jaskiewicz J., Ma-
rasas W.F.O., et al. (1988) - *Fumonisin, mycotoxins with cancer-promoting activity produced by F. moniliforme*. Applied Environmental Microbiology, 54: 1806-1811.
- Glm (2007) - *Fumonisin in maize and maize products*. IV Forum micotossine DG-SANCOO, 15-16 gennaio 2007. http://www.micotossine.it/public/pag_132.pdf
- Glm (2008) - *Mycotoxin contamination in unprocessed cereals - some data from Italy*. V Fusarium Forum, 10-11 gennaio 2008. http://www.micotossine.it/public/pag_554.pdf
- Lino C.M., Silva L.J.G., Pena A.S. (2004) - *Fumonisin: presence in food, health implication and legislative aspects*. Revista Portuguesa. Ciencias. Veterinarias, 99: 181-192.
- Logrieco A., Mulè G., Moretti A., Bottalico A. (2002) - *Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe*. European Journal of Plant Pathology, 108: 597-609.
- Maiorano A., Reyneri A., Maffioli G., Ramponi C. (2007) - *Stima del «rischio fumonisine» nella granella di mais*. L'Informatore Agrario, 63 (7): 52-57.
- Munkvold G.P. (2003a) - *Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize*. Annual Review of Phytopathology, 41: 99-116.
- Munkvold G.P. (2003b) - *Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears*. European Journal of Plant Pathology 109: 705-713, 2003.
- Ooka J.J., Kommedahl T. (1977) - *Wind and rain dispersal of F. moniliforme in corn field*. Phytopathology, 67: 1023-1026.
- Reyneri A., Blandino M., Vanara F., Maiorano A. (2005) - *Fattori agronomici che influenzano la produzione di micotossine [Zea mays L.; mais]*. Informatore Fitopatologico, 55(3): 3-10.
- Zaghi A. (2008) - *Produzioni mondiali di mais sempre più transgeniche*. L'Informatore Agrario, 64 (8): 27-30.

ARTICOLO

SETE DEL MAIS, FACILE INGRESSO ALLE MICOTOSSINE

Roberto Causin¹, Roberto Cecchinato², Lucia Bailoni³, Riccardo Raserà¹ e Cristina Scopel¹

¹ Dipartimento Territorio e Servizi Agroforestali – Sez. Patologia Vegetale – Università degli Studi di Padova. Viale dell'università 16, 35020 Legnaro (PD).

² Kws Italia. Via Secondo Casadei 8, 47100 Villa Selva (FC).

³ Dipartimento di Scienze Animali - Università degli Studi di Padova. Viale dell'università 16, 35020 Legnaro (PD).

Publicato in: Supplemento a L'Informatore Agrario. 2009 16: 14-17.

L'INFORMATORE AGRARIO

www.informatoreagrario.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.p.A. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.

Sete del mais facile ingresso alle micotossine

In epoca di fioritura femminile il *Fusarium* può infettare il mais attraverso le sete colonizzando la cariosside in formazione. Epoche di semina «tempestive» e trattamenti in fioritura possono dare un contributo importante alla soluzione del problema derivante dalla presenza delle fumonisine in questo cereale

di R. Causin, R. Cecchinato, L. Bailoni, R. Rasera, C. Scopel

Le fumonisine si trovano in varie matrici, ma particolarmente nel mais; in Italia sono presenti in questo cereale tutti gli anni a concentrazioni che possono variare in relazione all'andamento climatico, ma

che frequentemente superano sia i limiti di legge per il consumo umano sia i valori consigliati per i mangimi da destinare alle specie animali più sensibili (Glm, 2007).

Queste sostanze, sono prodotte prin-

cipalmente da *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg e *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg.

Tra le due specie, *F. verticillioides* è la più diffusa in Italia e può essere presente in modo endofitico in piante di mais asintomatiche o provocare un marciume rosa chiaro o viola pallido della spiga. *F. verticillioides* può essere trasmesso attraverso il seme, ma la maggior parte delle infezioni deriva dall'inoculo che sopravvive saprofitariamente nel terreno.

Da qui il fungo può colonizzare l'apparato radicale e diffondersi endofiticamente nella pianta, oppure, all'epoca della fioritura femminile, può infettare il mais attraverso le sete e colonizzare le cariossidi in formazione (Causin, 2006).

Un'ultima possibilità di infezione, forse la più importante, deriva dagli attacchi di piralide: i danni provocati dall'attività trofica delle larve di questo insetto agevolano fortemente la diffusione e lo sviluppo del patogeno (Bakan *et al.*, 2002).

Alcuni autori, però, sostengono che anche l'infezione che avviene attraverso le sete possa avere un ruolo non trascurabile sulla contaminazione finale della granella da fumonisine (Munkvold, 2003).

Non ci sono molte sperimentazioni che riguardano questo aspetto, soprattutto per quanto riguarda il mais coltivato nel Nord-est Italia, e quindi l'argomento merita di essere approfondito.

Infatti, se la colonizzazione delle sete fosse associabile, anche in parte, al contenuto di fumonisine della granella, sarebbe giustificata un'eventuale lotta chimica volta a proteggerle dalle infezioni di *F. verticillioides*.

Con il presente lavoro si è voluto dare un primo contributo alla conoscenza delle dinamiche della colonizzazione delle sete in condizioni di pieno campo in una area maidicola del Nord-est Italia.

Risultati della sperimentazione

Gli esiti degli isolamenti eseguiti sui frammenti di sete hanno evidenziato che in media, nei due anni, sul totale dei funghi ottenuti, il 67% apparteneva al genere *Fusarium*, lo 0,5% ad *Aspergillus*, il 32,5% a funghi di altri generi, soprattutto *Penicillia* non tossigeni.

Più del 98% dei *Fusaria* isolati era costituito in prevalenza da *F. verticillioides* (71%) e in misura molto minore da *F. proliferatum* (15%).

Sperimentazione nel dettaglio

La prova si è svolta in località Eraclea (Venezia) in due annate agrarie successive (2004 e 2005) utilizzando 3 diversi ibridi di mais: ibrido 1 FAO 700, ibrido 2 FAO 400, ibrido 3 FAO 600 e confrontando l'effetto di due diverse epoche di semina (tabella A) sulla colonizzazione delle sete, sul marciume della spiga e sul contenuto di fumonisine B1 e B2 della granella.

Il campo sperimentale è stato organizzato a split-plot con 4 replicazioni di superficie pari a 150 m².

TABELLA A - Epoche di semina nel biennio di sperimentazione

2004		2005	
1ª semina	2ª semina	1ª semina	2ª semina
22 aprile	13 maggio	24 marzo	29 aprile

DETERMINAZIONE DELL'INFEZIONE DA FUSARIUM DELLE SETE

Nei due diversi anni di indagine la determinazione dell'infezione delle sete è stata effettuata in due momenti, a inizio fioritura e a fine fioritura del mais, saggiando anche l'effetto derivante dalla diversa lunghezza delle sete e, per ciascuna di esse, dalla posizione da cui venivano tratte le porzioni da esaminare. A tale scopo, da ciascuna delle 4 replicazioni e per ognuno dei 3 ibridi sono state campionate 8 spighe e da ciascuna di esse sono state prelevate casualmente 2 sete lunghe, 2 medie e

2 corte. Per ciascuna seta di ciascuna categoria sono stati poi prodotti 2 frammenti, uno basale e uno apicale, della lunghezza di circa 1 cm. In questo modo per ogni anno di sperimentazione sono stati ottenuti in totale 4.608 frammenti che sono stati utilizzati per le operazioni di isolamento, purificazione e identificazione dei funghi presenti.

RILIEVI DELLO STATO FITOSANITARIO DELLE SPIGHE

L'entità dell'attacco fungino è stata valutata al momento della raccolta attribuendo alle spighe un punteggio, variabile da 0 a 10, secondo il seguente criterio basato sui sintomi visibili (vedi riquadro «Riconoscere i sintomi del marciume rosa (o rosato)»):

- 0 = spiga sana, nessuna muffa né altri sintomi visibili;
 - 1 = attacco lieve, superficie con sintomi di attacco fungino inferiore al 10% e solo in piccoli settori;
 - 3 = attacco medio-lieve, superficie con sintomi inferiore al 30% e solo in alcuni settori;
 - 7 = attacco grave, più della metà della spiga colpita;
 - 9 = attacco estremamente grave, quasi tutta la spiga colpita;
 - 10 = spiga completamente invasa da muffe.
- I punteggi di 2, 4, 6 e 8 sono stati attribuiti alle situazioni intermedie.

Colonizzazione fungina delle sete

Nel 2004 la percentuale di frammenti di sete colonizzati da *Fusarium* è risultata sensibilmente superiore a quella riscontrata nel 2005 (grafico 1).

L'epoca di semina ha influenzato significativamente ($P < 0,001$) l'incidenza di frammenti infetti, che è passata da 5,37 a 32% nel 2004 e da 10,25 a 17,37% nel 2005 rispettivamente con la semina anticipata e ritardata (grafico 2).

In entrambi gli anni l'infezione delle sete da parte dei funghi è stata superiore a fine fioritura rispetto all'inizio (35,62% vs 1,16% nel 2004 e 24,6% vs 1,96 nel 2005).

Relativamente alla parte di seta esaminata (vedi riquadro in questa pagina) si è

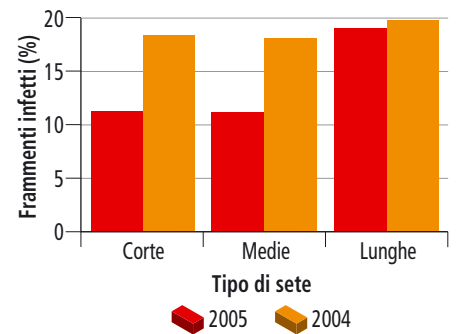
osservata un'interazione significativa con il momento del prelievo.

Infatti, l'incremento delle infezioni tra inizio e fine fioritura è risultato molto più alto nella parte basale rispetto a quella apicale. Le infezioni sono aumentate di 88,3

volte nella parte basale contro 23,9 in quella apicale nel 2004 e anche nell'anno successivo ciò si è ripetuto e, sebbene in modo meno marcato, le infezioni della parte basale sono aumentate più che nella porzione apicale: 17,7 volte rispetto a 12 volte.

Infine, per quanto concerne la lunghezza delle sete si è osservato un incremento di infezione per quanto riguarda le sete lunghe rispetto alle corte e alle medie, particolarmente evidente nel 2005 (grafico 1).

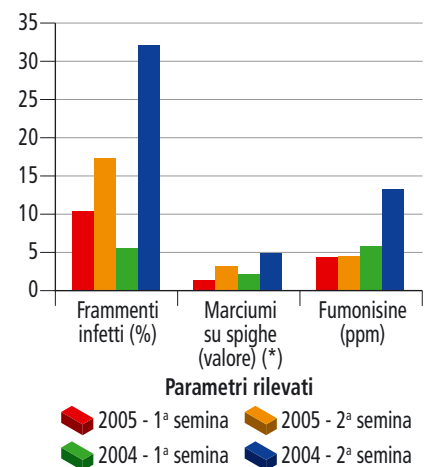
Riguardo all'effetto dell'ibrido, non so-



(*) Per la spiegazione vedere riquadro «Sperimentazione nel dettaglio».

GRAFICO 1 - Frammenti infetti (*) in relazione al tipo di sete

Le sete lunghe hanno risentito di maggiori infezioni.



(*) Per la spiegazione vedere riquadro «Sperimentazione nel dettaglio».

GRAFICO 2 - Influenza dell'epoca di semina su frammenti infetti, attacco fungino e fumonisine nella granella

L'epoca di semina ha influenzato significativamente l'incidenza dell'infezione.

no state osservate differenze significative nei due anni di prova.

Marciumi fungini della spiga

Nella quasi totalità dei casi osservati i marciumi fungini sono risultati appartenere alla categoria dei «marciumi rosa». La loro gravità è risultata maggiore nel 2004, anno in cui si è osservata anche una differenza significativa ($P < 0,001$) tra l'ibrido 1 e il 3 (grafico 3).

I danni più alti sono stati rilevati in corrispondenza dei valori più elevati di colonizzazione fungina delle sete (grafico 2).

ANCHE IN ASSENZA DI MUFFE VISIBILI

Riconoscere i sintomi del marciume rosa (o rosato)

Nella maggioranza dei casi il marciume si sviluppa nella parte apicale della spiga, anche se non sono rare infezioni nella parte intermedia e basale.

In queste aree si sviluppa una muffa, dapprima bianca, poi con sfumature rosate che col tempo si fanno più intense e possono diventare anche rosa salmone o assumere sfumature color lavanda. La muffa si sviluppa sulle cariossidi e tra esse e interessa sia vaste aree, sia piccoli gruppi di cariossidi che cariossidi isolate, sparse lungo la spiga.



Striature «starburst» sulla granella. Sintomo di *F. verticillioides* che può manifestarsi anche in assenza di muffa



Marciume rosa della spiga causato da *F. verticillioides*

Anche in questo caso al ritardo dell'epoca di semina è corrisposta una maggiore gravità dei marciumi, sia nel primo che nel secondo anno di sperimentazione, risultata significativa all'analisi statistica ($P < 0,001$) (grafico 2).

Fumonisine nella granella alla raccolta

Il contenuto di fumonisine B1 e B2 sulla granella al momento della raccolta è risultato superiore nel 2004 rispetto all'anno successivo. Nel 2004 il ritardo della semina ha ($P < 0,001$) influenzato la contaminazione da fumonisine che è risultata pari a 6,35 e 16,82 ppm nella prima e nella seconda semina rispettivamente (grafico 4).

Nell'anno successivo si è riconfermato l'effetto negativo del ritardo della semina con differenze meno marcate, 4,17 e 4,35 ppm nella prima e nella seconda semina.

Sulla granella, in assenza di muffa, può svilupparsi un altro sintomo detto «starburst» che consiste in una fitta serie di striature bianche che si dipartono a stella dal punto dove la seta era inserita sulla cariosside.

Le striature altro non sono che le vie lungo le quali *F. verticillioides*, provenendo dalle sete, si è accresciuto negli strati più esterni della cariosside, consumando i tessuti; in questo modo si formano dei sottilissimi canali nei quali entra aria che interrompe la trasparenza del pericarpo impedendo di vedere lo strato di aleurone giallo sottostante.

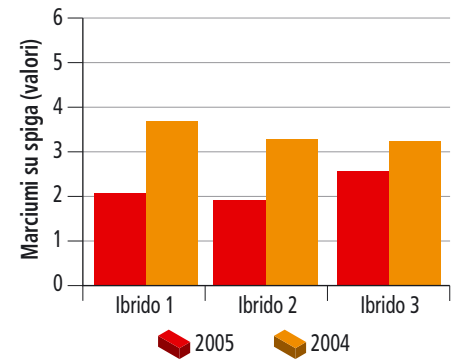
In entrambi gli anni di sperimentazione la concentrazione di queste micotossine è risultata maggiore nei casi in cui l'infezione delle sete da parte di *F. verticillioides* è stata più alta (grafico 2).

Non è apparsa invece altrettanto chiara l'eventuale influenza dell'ibrido.

Sete, epoche di semina e infezioni da *Fusarium*

Nelle condizioni in cui si è svolta la sperimentazione, nelle sete risultate infette vi era una forte colonizzazione da funghi del genere *Fusarium* e in modo particolare da *F. verticillioides* che, come è noto, nei nostri ambienti è il maggior responsabile delle contaminazioni da fumonisine.

Il livello di infezione è risultato crescere con l'aumentare dell'età della seta; ciò potrebbe derivare semplicemente dal prolungamento della esposizione dell'infiorescenza



(*) Per la spiegazione vedere riquadro «Sperimentazione nel dettaglio».

GRAFICO 3 - Gravità (*) del marciume fungino della spiga nei 3 ibridi

za femminile ai possibili eventi infettivi, oppure indicare che il suo invecchiamento ne favorisce l'aggressione fungina.

Questa seconda ipotesi, già avanzata da altri autori (Battilani *et al.*, 2004), è la più probabile ed è avvalorata anche dal fatto che, in genere, *F. verticillioides* è dotato di scarsa virulenza, mentre possiede una grande capacità saprofitaria; ciò lo rende poco efficiente nell'aggressione ai tessuti vitali, mentre ne favorisce lo sviluppo su strutture senescenti e/o indebolite da stress di varia natura.

Il citato aumento di colonizzazione è risultato più marcato nella parte basale delle sete rispetto a quella apicale e ciò permette di dedurre che *F. verticillioides* dopo essere arrivato sulle sete si diffonde verso la loro base; questo conferma che tali organi rappresentano un'importante via d'infezione, che viene effettivamente percorsa dal fungo per arrivare alle cariossidi in via di formazione.

A riprova di quanto appena esposto, si è notato che a un maggior grado di colonizzazione delle sete corrisponde un livello più alto sia dei marciumi della spi-



RESPONSABILE DELLE MICOTOSSINE

Come si comporta *Fusarium verticillioides*

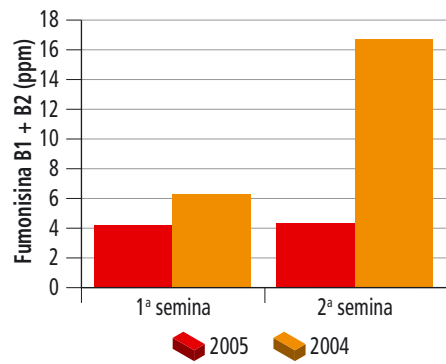
Questo fungo si conserva nel terreno sui residui colturali infetti. In questo modo supera le condizioni ambientali sfavorevoli dell'inverno e riesce a sopravvivere 21 mesi e forse anche più. Per questo motivo molti esperti ritengono che l'interramento dei residui colturali non dia alcun vantaggio pratico ma, ovviamente, ciò è da riferire ai casi di omosuccessione o di avvicendamenti colturali dove le piante suscettibili all'attacco di questo fungo ritornino a intervalli inferiori ai due anni.

Trascorso l'inverno, quando le temperature si fanno più miti, dal micelio presente nel terreno si produce un'elevatissima massa di conidi che, grazie ai movimenti dell'aria e agli schizzi di pioggia, viene dispersa nell'ambiente. Se questi propaguli giungono sulle setole del mais quando queste sono prossime alla senescenza, essi possono germinare e originare ife che, accrescendosi lungo le setole stesse, raggiungono le cariossidi in formazione e vi penetrano, situandosi al loro interno. Questa granella può svilupparsi in un modo apparentemente normale, sembrando del tutto sana, ma, come già visto, risulterà contaminata da fumonisine in modo tanto maggiore quanto più la pianta avrà attraversato periodi di stress.



Sintomi di *F. verticillioides* su spiga di mais

In alternativa, in situazioni ambientali – alta umidità, temperature moderate-calde, stress della pianta, lesioni della cariosside – particolarmente favorevoli per il fungo e sfavorevoli per la pianta, l'infezione può abbandonare la sua veste endofitica ed evolvere in marciume rosa della spiga. Alcuni studiosi pensano che la principale via d'infezione del mais sia proprio quella attraverso le setole.



2004: 1ª semina 22-4; 2ª semina 13-5.
2005: 1ª semina 24-3; 2ª semina 29-4.

GRAFICO 4 - Influenza dell'epoca di semina sul contenuto di fumonisine nella granella di mais

ga, sia di fumonisine nella granella, con valori che sono stati maggiori nel mais seminato tardivamente.

Questa associazione tra ritardo di semina, incremento di infezioni fungine e aumento dei marciumi e delle fumonisine è stata rilevata, seppure con diversa significatività statistica, in entrambi gli anni di sperimentazione.

Ciò permette di ipotizzare che i noti effetti positivi ottenibili anticipando le semine siano dovuti anche a una diminuzione delle infezioni che avvengono attraverso l'infiorescenza femminile. Come già ricordato, molti autori riportano questa come una delle più importanti vie d'ingresso del fungo (Munkvold, 2003; Desjardins *et al.*, 2002; Nelson, 1992); essi affermano anche che, associata con i danni da piralide, o in assenza di questi, essa appare addirittura la più importante via di aggressione di *F. verticillioides* alla pianta di mais. La sperimentazione svolta, quindi, oltre a ribadire l'importanza di effettuare le semine appena le condizioni ambientali lo permettano, mette in luce anche il forte

peso che le infezioni avvenute attraverso le setole hanno sulla quantità di micotossina presente nella granella.

Ciò giustifica l'ipotesi che interventi di lotta diretta contro *F. verticillioides*, eseguiti all'epoca della fioritura possano dare un contributo importante alla

soluzione del problema derivante dalla presenza delle fumonisine nel mais. Studi in via di completamento sull'efficacia di miscele tra imidazoli e triazoli sull'infezione via setole di *F. verticillioides* e *F. sporotrichioides* su mais hanno fornito, fino a ora, risultati molto promettenti.

Roberto Causin
Riccardo Rasera
Cristina Scopel

Dipartimento Tesaf, Sezione patologia vegetale
Università di Padova
roberto.causin@unipd.it

Roberto Cecchinato
KWS Italia

Lucia Bailoni
Dipartimento scienze animali
Università di Padova



Per consultare la bibliografia e gli approfondimenti:
www.informatoreagrario.it/rdLia/09ia16_4056_web

Sete del mais facile ingresso alle micotossine

BIBLIOGRAFIA

- Bakan B., Melcion D., Richard-Molard D., Cahagnier B. (2002) - *Fungal growth and Fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and in Spain*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 728-731.
- Battilani P., Rossi V., Scandolara A., Giorni P., Bertuzzi T., Formenti S., Pietri A. (2004) - *Ruolo delle fasi fenologiche sulla sintesi di micotossine nel mais*. 1° Congresso nazionale «Le micotossine nella filiera agro alimentare». Istituto superiore di sanità Roma, 29-30 novembre.
- Causin R. (2006) - *Funghi e micotossine*. In: Mais e sicurezza alimentare. Veneto Agricoltura: 11-29.
- Desjardins A.E., Munkvold G.P., Plattner R.P., Proctor R.H. (2002) - *Fum 1 - a gene requie for fumonisins biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by Gibberella moniliformis in field tests*. Molecular Plant-Microbe interactions, 15: 1157-1164.
- Glm (Gruppo di lavoro micotossine) (2007) - *Fumonisin in maize and maize products: contamination of fumonisins in Italian maize, distribution of fumonisins during the maize milling process*. 4th Fusarium-toxin Forum, Brussels, 15th-16th January. http://www.micotossine.it/public/pag_132.pdf
- Munkvold G.P., Carlton W.M. (1997) - *Influence of inoculation method on systemic Fusarium moniliforme infection of maize plants grown from infected seeds*. Plant Disease, 81: 211-216.
- Munkvold G.P. (2003) - *Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize*. In: Annual Review of Phytopathology, 41: 99-116.
- Munkvold G.P. (2003) - *Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears*. European Journal of Plant Pathology, 109: 705-713.
- Nelson P.E. (1992) - *The taxonomy and biology of Fusarium moniliforme*. Mycopathologia, 117: 29-36.
- Oren et al. (2003) - *Early events in the Fusarium verticillioides - Maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate applied and environmental microbiology*. Marzo: 1695-1701.
- Sas-Stat (1990) - *Sas User's guide*. Statistical Analysis Institute, inc. Cary, N.C.
- Vincelli P., Parker G. (2002) - *Fumonisin, vomotoxin and other mycotoxins in corn produced by fusarium fungi*. <http://www.ca.uky.edu/agc/pubs/id/id121/id121.pdf>

Materiali e metodi

La prova si è svolta a Eraclea (Venezia) in due annate agrarie successive (2004 e 2005) utilizzando 3 diversi ibridi di mais: ibrido 1 FAO 500, ibrido 2 FAO 400, ibrido 3 FAO 600 e confrontando l'effetto di due diverse epoche di semina (tabella A) sulla colonizzazione delle sete, sul marciume della spiga e contenuto di fumonisina B1 e B2 della granella.

Il campo sperimentale è stato organizzato a split-plot con 4 replicazioni di superficie pari a 150 m².

TABELLA A - Epoche di semina nel biennio di sperimentazione

2004		2005	
1ª semina	2ª semina	1ª semina	2ª semina
22 aprile	13 maggio	24 marzo	29 aprile

DETERMINAZIONE DELL'INFEZIONE DA FUSARIUM DELLE SETE

Nei due diversi anni di indagine la determinazione dell'infezione delle sete è stata effettuata in due momenti, a inizio fioritura e a fine fioritura del mais, saggiando anche l'effetto derivante dalla diversa lunghezza delle sete e, per ciascuna di esse, dalla posizione da cui venivano tratte le porzioni da esaminare. A tale scopo, da ciascuna delle 4 replicazioni e per ognuno dei 3 ibridi sono state campionate 8 spighe e da ciascuna di esse sono state prelevate casualmente 2 sete lunghe, 2 medie e 2 corte. Per ciascuna seta di ciascuna categoria sono stati poi prodotti 2 frammenti, 1 basale e 1 apicale, della lunghezza di circa 1 cm. In questo modo per ogni anno di sperimentazione sono stati ottenuti in totale 4608 frammenti che sono stati utilizzati per le operazioni di isolamento, purificazione e identificazione dei funghi presenti.

A tale scopo sono state approntate del-

le capsule Petri (Ø 15 cm) contenenti Malachite Green Agar (MGA) + 0,06 mg/mL di solfato di *Streptomycina*. Disponendo 24 frammenti per Petri e tenendoli distinti per spiga di provenienza e lunghezza della seta, in 2 capsule potevano essere contenuti tutti i frammenti provenienti dalla porzione apicale delle sete prelevate nelle 8 spighe di ciascuna parcella e in altre 2 quelli derivanti dalla porzione basale. Dopo 12 giorni di incubazione a 24 ± 1 °C le colture sono state esaminate ed è stato contato il numero di frammenti da cui erano originate colonie di *Fusaria sez. liseola*. Nel caso di dubbi nella classificazione si è proceduto alla purificazione dei miceli su Potato Dextrose Agar (PDA) e successiva diagnosi tramite osservazione microscopica.

L'entità dell'infezione fungina è stata espressa come percentuale di frammenti colonizzati da *Fusarium* sul totale di frammenti esaminati.

RILIEVI DELLO STATO

FITOSANITARIO DELLE SPIGHE

L'entità dell'attacco fungino è stata valutata al momento della raccolta attribuendo alle spighe un punteggio, variabile da 0 a 10, secondo il seguente criterio basato sui sintomi visibili (vedi riquadro «Riconoscere i sintomi del marciume rosa (o rosato)»):

- 0 = spiga sana, nessuna muffa né altri sintomi visibili;
- 1 = attacco lieve, superficie con sintomi di attacco fungino inferiore al 10% e solo in piccoli settori;
- 3 = attacco medio-lieve, superficie con sintomi inferiore al 30% e solo in alcuni settori;
- 7 = attacco grave, più della metà della spiga colpita;
- 9 = attacco estremamente grave, quasi tutta la spiga colpita;
- 10 = spiga completamente invasa da muffe.

I punteggi di 2, 4, 6 e 8 sono stati attribuiti alle situazioni intermedie.

In relazione alle loro caratteristiche morfologiche, i marciumi sono stati anche classificati nelle tipologie rosa o rossi. Nei casi incerti sono state prelevate alcune carioidi (almeno 4 per lesione) da usare per l'isolamento dei funghi presenti; sulla base dei risultati ottenuti si è poi proceduto a distinguere i marciumi dubbi nelle due categorie menzionate.

ANALISI DEL CONTENUTO DI MICOTOSSINE

Al momento della raccolta sono state prelevate 30 spighe da ognuna delle parcelle. Le spighe provenienti dalle ripetizioni relative a ciascun ibrido sono state riunite in un unico campione tenendo distinte le epoche di semina. Su questi campioni finali è stato determinato il contenuto di fumonisina B1 e B2.

L'analisi quantitativa è stata effettuata presso il Laboratorio per il controllo della qualità degli alimenti di Agripolis (Dipartimento di scienze animali) con metodo HPLC. Tutte le analisi sono state effettuate in doppio.

ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il pacchetto Sas-Stat (1990). Il disegno sperimentale adottato sia per valutare la presenza dei funghi sulle sete che il contenuto di fumonisine B1 e B2 sulla granella è stato uno split-plot nel quale l'effetto principale relativo all'epoca di semina è stato testato sul blocco «ripetizione entro semina», mentre gli effetti dell'ibrido, del momento di prelievo, della posizione del frammento esaminato, del tipo di seta e delle interazioni doppie e triple fra questi fattori, sono stati testati sulla varianza residua. ●

CAPITOLO 4

MAIS E MICOTOSSINE: POSSIBILITA' DI CONTROLLO

La contaminazione da micotossine dei cereali e in particolare del mais, è un problema che riguarda non solo le produzioni ottenute in Veneto o nella Pianura Padana, ma anche quelle prodotte in molte parti del mondo problema che, per la gravità degli effetti sulla salute umana e animale, deve trovare una soluzione nel più breve tempo possibile.

L'unica misura attualmente applicabile per contenere la contaminazione da micotossine nella granella di mais è l'applicazione delle buone pratiche agricole (BPA) (Racc. CE 583/2006). Purtroppo, come già ricordato, gli andamenti stagionali e le diverse caratteristiche degli areali di coltivazione, condizionano la realizzazione delle pratiche colturali e influenzano sia lo sviluppo dei *Fusaria*, sia la conseguente contaminazione da fumonisine, rendendo variabile il vantaggio ottenuto con l'applicazione delle BPA. La necessità di stabilizzare il controllo delle micotossine su livelli efficaci rende necessario lo sviluppo di altre strategie da implementare con le BPA. Tra queste potrebbe avere particolare interesse la possibilità di controllare direttamente l'inoculo dei funghi tossigeni tramite l'applicazione di principi attivi di origine chimica o strategie di controllo biologico atte a ridurre l'infezione e la crescita dei funghi micotossigeni. Le strategie d'intervento diretto, siano esse l'applicazione di prodotti fitosanitari o l'impiego di agenti di controllo biologico, devono però, essere messe a punto in primis in relazione alle possibili vie che *F.verticillioides* utilizza per infettare il mais.

I risultati ottenuti nella prima serie di prove hanno permesso di stabilire quale sia, nell'ambiente pedoclimatico Veneto, il contributo di ciascuna delle diverse vie di infezione di *F.verticillioides* nel determinare la contaminazione finale da fumonisine della granella. Prove che confermano, come atteso, l'importanza delle infezioni favorite dai danni provocati dalla piralide responsabili del 60% del contenuto finale di fumonisine. Un contributo non secondario viene anche dalle infezioni che si sviluppano attraverso le infiorescenze femminili del mais (sete), dato che risulta in accordo con quanto riportato in bibliografia in cui questa viene indicata come seconda via in ordine di importanza e risulta responsabile del 30% della contaminazione finale. Sempre in accordo con

quanto riportato in bibliografia sono anche i dati riguardanti l'importanza delle fonti di inoculo provenienti dal seme e dal suolo che risultano essere di ridottissima importanza (3%).

Tuttavia, pur confermandosi di fondamentale importanza l'esecuzione di un efficace trattamento di controllo della piralide, nelle tesi in cui questa via di infezione è stata controllata il livello di contaminazione è risultato comunque superiore al limite indicato nel regolamento CE n.1126/2007 per il mais destinato al consumo alimentare umano.

4.1 Strategie di controllo chimico

Il genere *Fusarium* è riconosciuto essere agente causale di molte malattie che colpiscono un numero elevato di specie vegetali in ampie zone del mondo con caratteristiche pedoclimatiche estremamente differenti con effetti che possono causare ingenti perdite, non solo nella fase di produzione in campo, ma anche nella fase di stoccaggio post raccolta. I principali sintomi legati all'azione dei *Fusaria* sono i marciumi a carico dell'apparato radicale, del colletto, dello stelo e dei frutti, oltre a disfunzioni dell'apparato vascolare delle piante.

Per quanto riguarda i cereali le fusariosi della spiga, non solo causano riduzioni nelle rese produttive che possono essere anche economicamente rilevanti, ma anche scadimenti nella qualità delle produzioni stesse poiché la colonizzazione della granella da parte di questi patogeni, che può avvenire anche in via asintomatica, ne determina la contaminazione da micotossine spesso precludendone l'utilizzo per le destinazioni d'uso più remunerative.

Per questi motivi, elevato numero di specie agricole colpite e importanti scadimenti quali - quantitativi delle produzioni, le specie appartenenti al genere *Fusarium* sono state ampiamente studiate ed è disponibile una ampia gamma di principi attivi e di fitofarmaci registrati per il loro controllo il cui utilizzo è permesso su molte specie vegetali differenti. Tra i diversi principi attivi, le molecole più efficaci risultano quelle appartenenti alla famiglia funzionale degli inibitori della sintesi dell'ergosterolo (IBS) e in particolare alle famiglie chimiche degli imidazoli e dei triazoli che hanno sia effetto fungicida che fungistatico. In particolare si ritiene che gli effetti fungistatici di tali derivati siano dovuti all'inibizione della sintesi degli steroli di membrana mentre la loro azione fungicida derivi invece dall'interazione con la membrana plasmatica, con conseguente sconvolgimento delle funzioni di barriera esplicate da quest'ultima.

Tuttavia se per il frumento ed altri cereali autunno vernini sono disponibili una ampia gamma di prodotti fitosanitari registrati per il controllo delle fusariosi della spiga e si è ampiamente dimostrata l'efficacia dei triazoli nel contenere sia la colonizzazione della spiga da parte delle diverse specie di *Fusarium* sia la contaminazione da micotossine, se applicati in strategie di controllo integrato, per il

controllo delle fusariosi della spiga di mais, ad oggi, non esiste in Europa alcun principio attivo né alcun prodotto fitosanitario registrato.

In base ai risultati delle prime prove sperimentali si è deciso di approfondire ulteriormente gli studi. Per quanto riguarda il mais come già riferito, il problema principale risulta essere la contaminazione da fumonisine, il cui principale produttore è *F.verticillioides* che è anche la specie fungina più frequentemente isolata dalla granella di mais. Le prove condotte in frumento per saggiare l'efficacia dei diversi principi attivi nel controllare le fusariosi della spiga hanno rivelato come specie diverse di *Fusarium* ma anche ceppi provenienti da diverse località siano diversamente suscettibili all'azione dei fungicidi. Inoltre la ricerca bibliografica ha permesso di ottenere solo dati parziali sull'efficacia di queste molecole nel controllare lo sviluppo di *F.verticillioides*.

Per questi motivi, prima di tutto, in prove di laboratorio e di serra si è voluta saggiare l'efficacia dei diversi prodotti fitosanitari nel controllare la vitalità dei conidi (forme di riproduzione agamica attraverso le quali *F.verticillioides* infetta la pianta di mais) e lo sviluppo endofitico di *F.verticillioides* all'interno della pianta di mais.

Si è quindi proceduto ad effettuare delle prove di campo allo scopo di valutare se, anche in questa situazione, si ottenesse un livello di efficacia simile a quello registrato nelle prove di laboratorio. Nel pianificare le prove di campo, assunta l'efficacia del controllo della piralide nel limitare sia la colonizzazione di *F.verticillioides* della granella sia della contaminazione da fumonisine, si è voluto valutare il vantaggio ottenibile dal controllo delle infezioni provenienti dalle altre due vie di inoculo conosciute cioè sistematicamente dal seme infetto o dal suolo oppure attraverso la colonizzazione delle setole. Inoltre al fine di rendere i risultati ottenuti dalla presente sperimentazione di immediato utilizzo si sono scelte strategie di applicazione dei prodotti fitosanitari facilmente integrabili nella normale tecnica agronomica di produzione del mais cioè tramite concia del seme o distribuzione sulle setole durante la fioritura con manica d'aria montata su macchina scavalcante semovente (trampolo), macchina operatrice normalmente impiegata per effettuare l'intervento insetticida contro la piralide.

Nell'ultima serie di prove si è inoltre voluta valutare la possibilità di realizzare il trattamento fungicida e insetticida in un unico intervento visto che la limitata redditività del mais non consente di ipotizzare l'esecuzione di un doppio trattamento in copertura.

ARTICOLO

Effect of maize seed-treatments on *Fusarium verticillioides* infection and fumonisin contamination.

R. Causin¹, R. Rasera¹, C. Scopel¹ and S. Tarlazzi²

¹University of Padua - Department of Land and Agroforest Environments TESAF – section Plant Pathology - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)

²Field Trial Manager - BASF Italia Spa – email: stefano.tarlazzi@basf.com

Type of article: short communication, proposed for publishing.

Abstract:

In Northern Italy, *Fusarium verticillioides* is the most commonly reported fungal specie infecting maize and the main responsible of maize fumonisin contamination. One of the infection pathways of *F. verticillioides* is endophytically, moving from soil through the roots and/or from infected seed to the plant up to the kernels. The control of *F. verticillioides* seed borne infections and fumonisin contaminations in maize through seed treatments with chemicals was assessed in greenhouse and open field trials. Maize seeds were inoculated with *F. verticillioides* and 24 hr later treated with different active ingredients or mixtures (UN: untreated, T1: Prochloraz 100ml/100kg seed, T2: Triconazole 16,7ml/100kg seed, T3: Prochloraz + Triconazole 200ml/100kg, T4: Prochloraz + Triconazole 250ml/100kg seed, T5: Thiram 60ml/100kg seed, T6: Fludioxonil 100ml/100kg seed). In greenhouse, on 30-day-old seedlings, Triconazole (T2), Prochloraz + Triconazole (T3, T4), Thiram (T5) and, at a less extent, Fludioxonil (T6) were able to reduce significantly ($p=0,05$) the endophytic colonization of *F. verticillioides* while Prochloraz (T1) was not. In open field, only the seed treatments with Fludioxonil (T6) and Triconazole (T2) appeared to reduce fumonisin B1 + B2 contamination and *F. verticillioides* colonization on harvested kernels. In the greenhouse test, maize was infected only by the seed-born *F. verticillioides* inoculum while in the open field the fungus attacked maize through all the possible infection pathways, including the silk way and the European corn borer (ECB) promoted ones. Reasonably the seed chemical treatments have no or mild effect on the fungal infections occurring through these two pathways, the final kernel infection and fumonisin contamination is influenced more by climatic conditions and by the spread of ECB larvae than by the endophytic spread of seed-borne *F. verticillioides* inoculum. Nevertheless, seed-treatments with Fludioxonil and Triconazole can be encouraged in integrated disease management protocols as they contribute to control the *F. verticillioides* infections in the first phases of maize cultivation.

Keywords: mycotoxins, fumonisins, *Fusarium verticillioides*, seed treatment, maize.

1.Introduction

In Northern Italy, as in many other parts of the world, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, is among the most common fungal species infecting maize (Logrieco et al., 2002; Munkvold, 2003; Maiorano et al., 2009). This fungus has been associated with several maize diseases including seedling blight, root rot and ear rot, but it can also develop asymptotically, inside the maize plant (Munkvold, 2003). It is not well known why the disease does not occur during endophytic infections or the reasons why the fungus leaves its endophytic state to become a pathogen and cause rotting and wilting in the plant tissues. Environmental conditions, water availability (Dodd, 1980; Drepper et al., 1990, Magan et al., 1984; Magan et al., 1997; Nagy et al., 1997), and the genetic background of both the plant and the pathogen (Bacon et al., 1996; Kedera et al., 1994; Leslie et al., 1990; Yates et al., 1997) may all be important factors in the disease development. Maize infections by *F. verticillioides* have negative effects not only on yield but also on grain quality (Munkvold, 1997 (a)). This fungus produces mycotoxins that can be found in symptomatic and asymptomatic plant tissue and have negative effects on human and animal health (Marasas et al., 2000; Rheeder et al., 1992; Nelson et al., 1993; Ross et al., 1990). Fumonisin are the most significant mycotoxins produced by *F. verticillioides*, and the ones most frequently found in maize kernels (Wilke et al., 2007). Maize infection by *F. verticillioides* can occur through several ways and the most commonly reported are through airborne conidia, that infect the silks, and through the larvae activity of European Corn Borer (ECB) (Headrick et al., 1991; Munkvold, 1997 (a); Munkvold, 1997 (b)). Another infection pathway is systemically from infected seed. Systemic infection can start from fungal conidia or mycelia that are either carried inside the seed, in the pedicel and abscission layers, or on the seed surface (Foley, 1962) but also may result from inoculum that survives in crop residues in the soil (Liat et al.,2003). Kedera et al.

(1992) in a field experiment where seeds artificially inoculated with *F. verticillioides* were sowed, they recovered the inoculated strains (identified by vegetative compatibility) from 65% of the crowns, 34 to 54% of the nodes, 10% of the cobs, and 8% of the kernels. Munkvold et al. (1997(a); 1997(b)) also used vegetative compatibility groups to track fungal movement in the plant, reported different findings. In their trials the transmission of *F. verticillioides* from seed to seedling occurred in 80% to 97.5% of the cases, but the movement of the fungus from tissue of seedlings to stalk tissue of growing plants occurred less frequently and only in some experiments, so that at the end only 0.1 to 2.5% of kernels resulted infected by pre-inoculated *F. verticillioides* isolates (Munkvold, 1997 (a)). Based on these data the authors concluded that the transmission of a fungus from maize seeds to kernels can be divided into four steps: transmission from seed to seedling, movement within the stalk, movement into the ear, and spread within the ear, each characterized by a different percentage of success. Movement of the fungus from seedling crown tissue to stalk tissue appeared to be limiting factor in the transmission of seed-born Fusaria to kernels. While movement from stalk to ear appear not to be so limiting (Munkvold, 1997 (a)). Results of recent studies by Desjardins et al. (2002) and Desjardins and Plattner (2000) supported the occurrence of systemic infection and further suggest that this pathway may contribute to mycotoxins contamination in grain. Maize seeds are almost universally treated with a fungicide, prior to sale, to protect the seeds from fungal infection after planting (Munkvold et al., 2002); among the controlled pathogens there are also those belonging to the genus *Fusarium*. The aim of this research is to test under greenhouse and field conditions the effect of chemical seed treatments in reducing systemic plant and kernel infection of *F. verticillioides* and consequent on fumonisin contamination.

2. Materials and methods

Seed treatment

100 Synthetischer nährstoffarmer agar (SNA) Petri dishes (Ø 90 mm) were inoculated with *F.verticillioides* strain KSU 00999 and store in dark at 25±1°C. After 14 days on each slant were spread 5 ml of sterile water, the surface was gently scraped, the fungal suspension was filtered whit a sterile cotton gauze and recovered in a Erlenmeyer flask. The concentrations of the fungal suspension was determined with a haemocytometer and diluted with sterilized water to obtain a target final concentration of 10⁶ propagules/ml. Non coated maize seeds were soaked with suspension of *F.verticillioides* (0,1 l of suspension for 1 kg of seed) and shacked every 20 minutes for four hour in a sterile plastic bag. Inoculated seeds were placed on sterile paper towels and allowed to dry overnight in a laminar flow hood. After the seeds had dried they were treated with chemicals as listed in table 1. Before sowing 50 seeds for treatment, surface sterilized (10 min in 15% H₂O₂) were half cut and placed on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) in 20 Petri dishes (Ø 90 mm), 5 seeds for plate, and incubated in the dark at 25°±1C for 10 days; than the number of seeds developing *F.verticillioides* was recorded. Identification of *Fusarium* was performed to the species level according to Leslie et al. (2006).

Table 1. Seed treatments.

Treatment	UN	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Active ingredient (a.i.)	Untreated	Prochloraz 16,5%	Triticonazole 27,8%	Prochloraz 5,65% + Triticonazole 1,94%,	Prochloraz 5,65% + Triticonazole 1,94%,	Thiram 42%	Fludioxonil 2,4%
Rate/100Kg seed	- - -	100 ml	16.7 ml	200 ml	250 ml	60 ml	100 ml

Greenhouse trial

100 seeds for thesis were sowed in 20 sterile natural soil pots (autoclaved for 1 hour at 121°C), five seeds for pot. Sowed pots were placed randomly on a greenhouse bench (25 ±2°C , 16h photoperiod and 75 ± 5% RH) and irrigated weekly with sterile water. 30 days after germination the whole plants were harvested, risen thoroughly with tap water and surface sterilized (10 min in 15% H₂O₂). From each sterilized stem a fragment (about 10 cm long) was sampled in the middle part. Stem were milled with a laboratory knife mills, homogenized and a sub-sample of 50g was used for serial decimal dilution starting from 10¹ to 10⁻⁶. For each dilution aliquots of 0,5 ml were spread on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) plates, five replicates for dilution were done. Plates were incubated 7 days at 25°C and total count and count per colony type was done. Colony was isolated and purified and *Fusarium* identification was performed as described before.

Field trial

Open field trial were arranged in a randomized complete block design with 3 replications of 300 m² each. At harvest time (kernel moisture 25±2%) 35 ear were randomly collected from each replication, immediately transported to the laboratory were stored at 6±1°C. The day after all ears were completely shelled and kernels were dried with a hot (50°C) and dry air flow to obtain a 10% final grain moisture. Kernel samples were divided in two sub-sample a part was surface sterilize (10 min in 15% H₂O₂) the other one no. Kernels from the two sub-samples were separately milled with a laboratory knife mills, homogenized and reduced through the technique of quartering to two 1kg sub-sample. One sub-sample, stored frozen (-20°C) was used for toxin analysis; the other one was used for mycological analyses. Mycological analyses were performed with the serial dilution methods. Serial decimal dilution were done starting from 10⁻¹, 50g of flour in 450g sterile water, to 10⁻⁶. For each

dilution aliquots of 0,5 ml were spread on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) plates, five replicates for dilution were done. Plates were incubated 7 days at 25°C and total count and count per colony type was done. Colony was isolated and purified. *Fusarium* colony identification was performed as described before. Fumonisin B₁ and B₂ contamination were determined using a kit Competitor IPS ELISA Fumonisin quantitative 96x – Generon.

Statistical analysis

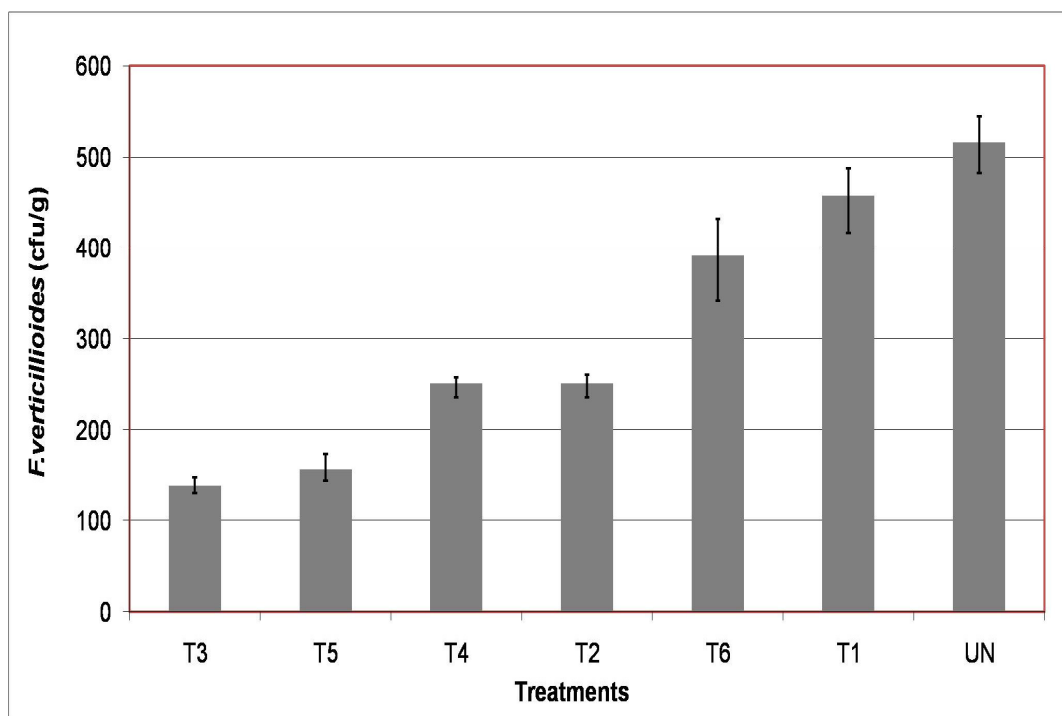
Data belonging to the dilution method were analysed as described in the Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2001) and express as colony forming unit per gram of vegetal material (Cfu/g). Cfu/g and fumonisin concentration (B₁+B₂) were analyzed by analysis of variance. The data were previously transformed, if needed, to $\log_{10}(x+1)$ to obtain the homogeneity of variance (Cavalieri et al., 2005). Means were compared using Tukey HSD test. The analysis were made using the software R version 2.10.0 (open source: <http://www.r-project.org>).

3.Results:

Test on the effectiveness of the inoculation protocol revealed that 100% of the treated seeds were endophytically colonized by *F. verticillioides*. The effectiveness of seed chemical treatments in controlling *F.verticillioides* 30 day-old greenhouse seedling endophytic colonization shows four different level fig.1): the first in which are grouped the untreated thesis (UN) together with T1 (Prochloraz); the second consisting of T6 (Fludioxonil) where the level of colonization is significantly lower than in the UN thesis but not than in the T1 with a redaction of 12%; the third including T2 (Triticonazole) and T4 (Prochloraz + Triticonazole 250 ml / 100 kg of seed) significantly different respect the second group where

the mean reduction is 53%; and the fourth consisting of T3 (Prochloraz + Triconazole 200 ml/ 100 kg of seed) and T5 (Thiram) thesis where the reduction is 72%.

Figure 1: Effects of seed treatments on endophytic colonization of *F. verticillioides* (cfu/g) in greenhouse trial. UN, T1, T2, T3, T4, T5, T6 see table 1. Histograms represent the means while bars are the 95% confidence limits.



Results of mycological and chemical analysis carried out on kernel samples collected at harvest time, are shown in figure 2 and 3 respectively. The total *F. verticillioides* colonization of kernels resulted always higher than the internal (endophytic) one; the total and endophytic levels of *F. verticillioides* kernel colonization vary among the different chemicals. Most of the treatments (T1, T3, T4, T5) are unable to reduce the *F. verticillioides* colonization and they are associated to a higher level of colonization than the untreated control. Only the kernels collected from T2 and T6 thesis present a statistically significant lower level of *F. verticillioides* kernel colonization with a mean reduction of 60%. Also in these thesis are

recorded a reduction in fumonisin B1 and B2 kernel contamination that result respectively in T2 of -24% and in T6 of – 80%.

Figure 2: Effects of seed treatments on whole and endophytic colonization of *F.verticillioides* (cfu/g) in the field trial. UN,T1, T2, T3, T4, T5, T6 see table 1. Histograms represent the means while bars are the 95% confidence limits.

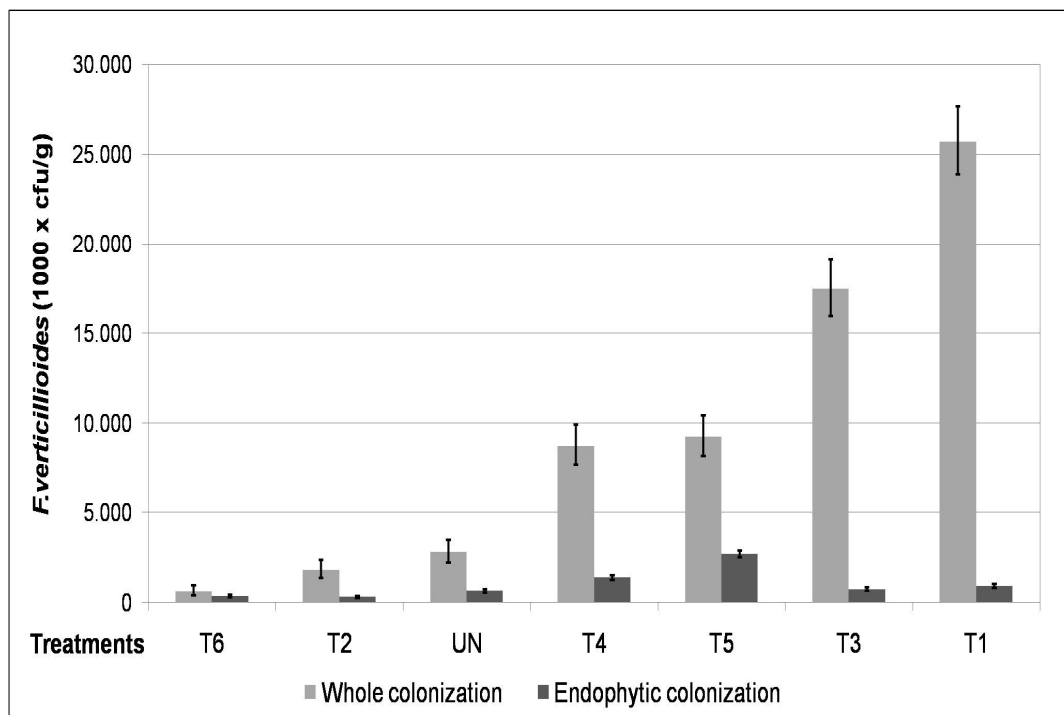
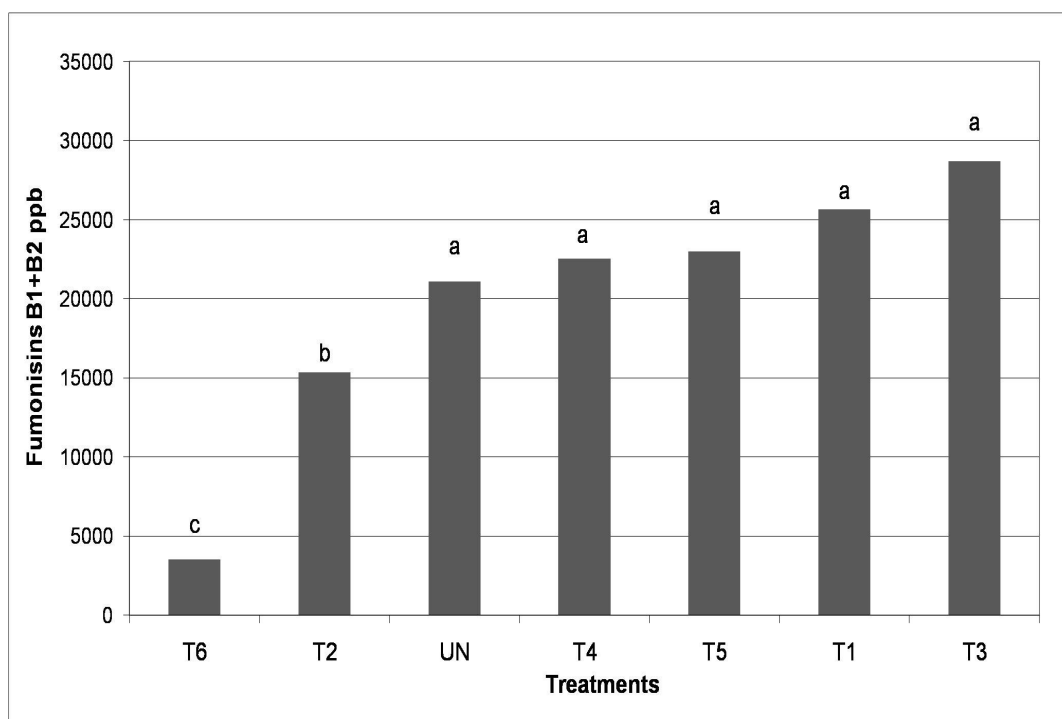


Figure 3: Fumonisin B1 and B2 contamination in maize kernels in the open field trial. UN, T1, T2, T3, T4, T5, T6 see table 1. Histograms represent the means. Means indicated with the same letter do not differ significantly ($p=0,05$).



4. Discussion and conclusions:

In greenhouse trial all active ingredients, a part of Prochloraz (T1), are able to reduce *F. verticillioides* endophytic colonization for at least a month after sowing (fig. 1). Among the products Thiram (T5) and Triconazole (T2) show the higher effectiveness in control of *F. verticillioides* colonization. While the mixture of Prochloraz and Triconazole (T3 and T4) seem to control better *F. verticillioides* endophytic colonization than products used alone (T1 and T2); the lower rate of the mixture (T3) is more effective than the higher one (T4). In T4 (mixture of Prochloraz and Triconazole, 250 ml/100 kg of seed) the level of *F. verticillioides* plant colonization is the same of T2. As in T1 in T4 Prochloraz probably has weak or no effect against the fungus and does not interfere with the control effectiveness expressed by

Triticonazole, in fact effectiveness is similar to the one expressed in thesis T2 where Triticonazole is used alone (fig.1). So the difference of effectiveness between T4 and T3 cannot be due to antagonistic effect between the two chemicals (a.i.) but can be hypothesize that the higher dose of mixture has a negative interactions with the plants that result in higher susceptibility to *F.verticillioides* colonization. The same situation is recordable when maize plants are subjected to biotic stress as insect injuries (Repka, 1999, Kachroo et al., 2003, Zhou et al, 2004) or abiotic stress as mainly drought (Zhao et al., 2001; Apel et al., 2004; Torres and Dangl, 2005) resulting in a higher susceptibility to *F.verticillioides* colonization and the kernel present a higher level of fumonisins contamination. However in field trials at harvest time, five month later, in T2 is recorded a redacted level of *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination while in T3 no. This is probably due to the progressive degradation of Triticonazole and the development of seedlings that limit the toxic effect but also to the more persistent residual activity of the higher rate of application (Fig.2 and 3).

Results of greenhouse trial are only partially in accord with the ones collect in open field trial. In field the untreated control shows a lower fungal colonization than the thesis T3, T4 and T5, thesis that in greenhouse present a reduced level of *F.verticillioides* colonization. This results confirm that Prochloraz (T1) used in seed treatments has no effectiveness in control *F.verticillioides* colonization while Triticonazole (T2) and Fludioxonil (T6) not only control *F. verticillioides* colonization in kernels but also fumonisin contaminations (Fig.2 and 3). Data collected don't permit to understand completely the differences in effectiveness of chemicals between field and greenhouse trial but some hypothesis can be formulate. First of all in the greenhouse test, maize is infected only by the seed-born *F. verticillioides* inoculum that develops systemically inside the plant. In field trial as widely known *F. verticillioides* maize infections occur through several ways. Also in this case infections occur systemically

through infected seeds but this pathway is widely known to be of lesser importance either for *F. verticillioides* kernel colonization and or for fumonisin contamination (Causin et al., 2009). In open field trial the principal ways of *F. verticillioides* infection are through silks and through damages caused by trophic activity of ECB larvae. Reasonably the chemical treatments apply to the seeds have no or limited effect against these fungal infections occurring both spatially and temporally distant from the point of application of the chemical products.

However while same results are aspect also in open field trial other no. The lack of effectiveness in the field trial of Thiram in controlling *F. verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination probably is due to the inability of this a. i. in being systemic while the reduction registered in T2 could be due to this capability (Fig.2 and 3). In fact the very low endophytic kernel colonization found in T2 (Fig.2). and the systemic properties of Triconazole suggest the possibility of a positive residual effect of the a.i. that may be accumulated in the kernel. Also Fludioxonil seed treatment seems able to reduce both *F. verticillioides* infection and fumonisins contamination. Other authors underline the effectiveness of Fludioxonil (T6) in controlling *Fusarium* development but this a.i. has not good systemic capabilities, therefore an appreciable residual effect is not expected (Munkvold et al., 2002).

Even if the field results are not clearly interpretable for the overlapping of *F. verticillioides* silk and ECB promoted infections on the seed-borne ones, and the result of this research have to be confirmed by a repetition of the field trial, some indication can be draw.

Seed treatments can be proposed as an helpful practice against *F. verticillioides* in integrated disease management plan to control all the inoculation pathways. In fact seed treatments can

protect maize plants in the first stage of development from the systemically infection of *F.verticillioides* that can not only became in a higher kernel colonization and fumonisin contamination but also cause the death of seedling.

References

- Bacon, C. W., and Hinton D. M., 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. Canadian Journal of Botany. 74:1195–1202.
- Causin, R., Nurti, L., Rasera, R. and Scopel, C., 2008. Importance of *Fusarium verticillioides* infection pathways in fumonisin contamination of maize kernels. Abstracts of lectures and poster of The World Mycotoxin Forum-the fifth conference, 17-18 November 2008, the Netherlands; pag. 125.
- Desjardins, A. E., and Plattner, R. D. 2000. Fumonisin B1–nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. Journal of Agricultural Food and Chemistry 48:5773-5780.
- Desjardins, A. E., Munkvold, G. P., Plattner, R. D., and Proctor, R. H. 2002. FUM1 – a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. Molecular Plant-Microbe Interaction 15:1157-1164.
- Dodd, J., 1980. The role of plant stresses in development of corn stalk rots. Plant Disease 64:533–537.
- Drepper, W., and B. Renfro. 1990. Comparison of methods for inoculation of ears and stalks of maize with *Fusarium moniliforme*. Plant Disease 74:952–956.

- Foley, D. C. 1962. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 52:870-873.
- Headrick, J., and Pataky J., 1991. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 81:268–274.
- Kedera, C. J., Leslie, J.F., and Claflin, L.E., 1994. Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology* 84:603–607
- Kedera, C. J., Leslie, J. F., and Claflin, L. E. 1992. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. (Abstr.) *Phytopathology* 82:1138.
- Leslie, J. F., Pearson, C., Nelson, P., Toussoun, T., 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80:343–350.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Bottalico, A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108 (7), 597–609.
- Magan, N., and Lacey, J., 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82:83–93.
- Magan, N., S. Marin, A. Ramos, and V. Sanchis. 1997. The impact of ecological factors on germination, growth, fumonisin production of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* and

- their interactions with other common maize fungi. *Cereal Research. Communication*. 25:643–645.
- Maiorano A., Reyneri A., Sacco D., Magni A., Ramponi C., 2009. A dynamic risk assessment model (FUMAgain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. *Crop Protection* 28 (3), 243-256.
- Marasas, W. F. O., Miller, J. D., Riley, R. T., and Visconti, A. 2000. Fumonisin B1. *Environmental Health Perspectives*. 219:1-149
- Munkvold G. P., McGee D. C., and Carlton W. M. 1997 (a). Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87:209-217.
- Munkvold G.P., 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109, 705-713.
- Munkvold, G. P., R. L. Helmich, and W. B. Showers. 1997 (b). Reduced *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology* 87:1071–1077.
- Munkvold, G.P., and O’Mara, J.K. 2002. Laboratory and growth chamber evaluation of fungicidal seed treatments for maize seedling blight caused by *Fusarium* species. *Plant Disease*, 86:143-150.
- Nagy, E., I. Cabulea, and I. Has. 1997. The role of genotype in maize *Fusarium* pathosystem. *Cereal Research. Communication*. 25:789–790.
- Nelson, P. E., Desjardins, A. E., and Plattner, R. D. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annual Review in Phytopathology* 31:233- 252.

- Oren L., Ezrati S., Cohen D. and Sharon A., 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*-Maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied Environmental Microbiology* 69 (3): 1695-1701.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., and van Schalkwyk, D. J. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 82:353-357.
- Ross, P. F., Nelson, P. E., Richard, J. L., Osweiler, G. D., Rice, L. G., Plattner, R. D., and Wilson, T. M. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Applied Environmental Microbiology*, 56:3225-3226.
- Wilke A.L., Bronson C.R., Tomas A., Munkvold G.P., 2007. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Disease* 91 (9), 1109–1115.
- Yates, I. E., C. W. Bacon, and D. M. Hinton. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Disease*. 81:723–728.

ARTICOLO

Effects of fungicides on *Fusarium verticillioides* kernel colonization and fumonisin B₁ and B₂ contamination.

R. Causin¹, R. Rasera¹, E.Costa²

¹ Department of Land and Agroforest Environments - TESAF, section Plant Pathology, University of Padua. Viale dell'università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy.

² GLM – Gruppo di lavoro micotossine. Piazza costituzione 8, 40100 Bologna (BO), Italy.

Type of article: research article, proposed for publishing.

1. Introduction

Genus *Fusarium* is known all around the world as pathogen of a wide range of plants. *Fusarium* species can cause an extraordinarily broad range of plant diseases. The most important are the crown and root rots, stalk rots, head and grain blights, and vascular wilt diseases that can determine, pre and post-harvest, complete destruction or significant losses of agriculture productions (Summerell et al., 2003 Leslie et al., 2006). In cereals *Fusarium* head blight (FHB) is related not only with yield losses, that can be economically relevant, but also with kernel colonization resulting in mycotoxin contamination (Munkvold, 2003; Logrieco et al., 2002; Soriano and Dragacci, 2004; Placinta et al., 1999). Mycotoxin contamination affects the quality and safety of human food and animal feed made with cereal thereby lowering the value of the grain and resulting in substantial economic losses to cereal growers, livestock and poultry producers, grain handlers, and food and feed processors (Council for Agricultural science and Technology, 2003). On maize *Fusarium* species are responsible for at least of two kinds of ear rot roughly different as red ear rot and pink ear rot. Pink ear rot or pink fusariosis is caused mainly by *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, and *Fusarium subglutinans* (Wollenweber & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas. (Logrieco et al., 2002). Above these *F. verticillioides* is the most commonly reported species associated with maize worldwide in temperature region (Placinta et al., 1999, Battilani et al., 2003) and can product different mycotoxins including fusarins, moniliformin and fumonisins (Leslie et al., 2006). Because of the world-wide distribution of fumonisins in maize and the harmful effects on animal health (equine leukoencephalomalacia (ELEM), porcine pulmonary edema (PPE), liver toxicity in many other animals) and human health (esophageal cancer and promotion of liver cancer) the control of *F. verticillioides* has become an important area in food safety (Soriano and Dragacci, 2004). *F. verticillioides* is known to infect maize trough several different infection pathways such as silk infection, insect injury and systemic transmission from seeds or roots to kernels (Munkvold et al., 1997c; Sobek and Munkvold, 1999).

The relative importance of different pathways may vary among geographic areas but is widely known that insect injury, primarily due to European corn borer (ECB: *Ostrinia nubilalis* (Hübner)) (Munkvold, 2003), appears to be the most important infection pathway in temperate area (Avantaggiato et al., 2002). Infection through silks is also a significant source of *F. verticillioides* ear rot and symptomless infection (Desjardins et al., 2002; Munkvold et al., 1997; Nelson, 1992). Infection through silk, in the absence or in addition to insect injury, appear to be the second most important infection pathway for *F. verticillioides* and probably for *F. proliferatum* and *F. subglutinans* (Munkvold, 2003). Silk is also the primary infection pathway for *Fusarium graminearum* Schwabe (Reid and Hamilton, 1996). But while *F. verticillioides* silks colonization occurs more frequently after the onset of silk senescence (Reid et al., 1999), *F. graminearum* requires succulent silk tissue, less than eight to ten days old for infection (Reid and Hamilton, 1996 Reid et al., 1992). *F. graminearum* spores reach the silks by splashing, wind dispersal or insect vectors; some infections are clearly initiated by direct injury to the kernels by lepidopteran insects, but this appears to be a less important pathway than silk infection (Munkvold, 2003). *F. graminearum* with *F. culmorum* (W.G. Smith) Saccardo and *F. avenaceum* (teleomorph *G. avenacea*) (Fries) Saccardo are the predominant species causing maize red ear rot. Red ear rot, as pink ear rot, is associated with the presence of different mycotoxin: zearalenone (ZEN), deoxinivalenol (DON), trichothecene type A (T2 and HT2) and nivalenol (NIV) (Logrieco et al., 2002). In wheat a reliable FHB and mycotoxin accumulation control is achieved with integration of indirect control strategy as good agricultural practices (GAP) with direct control strategy as application of fungicide during flowering. Also in maize the application of integrated control strategy can be the way to achieve an effective control of *Fusarium* colonization and mycotoxin contamination (Paul et al., 2008). But at the moment application of good agricultural practices (GAP) represent the only legal line of defence in controlling the contamination of maize by *Fusarium*-toxins, followed by the implementation of good manufacturing practices (GMP) (Rac CE

583/2006). GAP are indirect control strategies point out to altering the conditions under which the crop grown reducing environmental stress, promoting plant fitness (Bruns, 2003). Different climate conditions between maize cultivation area change agricultural practices effectiveness (Blandino et al., 2009) in *Fusarium* colonization and mycotoxin control but also the annual fluctuation in weather can jeopardise this advantage (Munkvold, 2003). At the moment in Italy and in Europe, to the author known, direct control strategies based on the application of chemical product on maize vegetative stages have never been point out and no fungicide is registered for the use on maize during vegetative phase. However as said before due to world-wide distribution of *Fusaria* and high negative effect on agricultural productions several different active ingredients are registered against these pathogens and among these ergosterol synthesis inhibitors (EBIs) are the most widely test against *Fusarium* disease and are also the most effective (Paul et al., 2008). Anyways efficacy of fungicide varies and is influenced by plant species, cultivar, time of application, combination with other fungicides and environment specific factor (Paul et al., 2008). The aim of this research is value the effectiveness of different commercial products, registered for the use in wheat, in reducing *in vitro* conidia vitality of *F.verticillioides*. A second set of open field trials are realised to value effectiveness of silk spray, seven days after female flowering, in controlling *F. verticillioides* head blight and mycotoxin accumulation in maize kernels.

2. Materials and methods

In vitro trials

Lethal dose curve responses

Three different *F.verticillioides* strains were used for the in vitro studies: KSU A-0999; CBS 218.76, G1 experimental strain isolated for maize kernel from maize kernel in 2006 and identify in our laboratory. 50 Petri dishes of Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) were inoculated for each strain, after 14 days on each slant were put 5 ml of sterile water and gently scraped. Fungal

suspension was filtered with a sterile cotton gauze and collected in a Erlenmeyer flask. The concentration of the fungal suspension was determined with a haemocytometer and adjusted to 10^{-6} adding sterile water. Preliminary trials were done to identify a dose range for each chemical product and strain so at least one dose resulted in 0 and 100% mortality each and multiple doses resulted in a range of mortalities greater than 0 and less than 100%. For each strain and product where used almost 5 different doses that were different between chemical products within strains. For each doses, strain and fungicide were realized a 15ml tube in which were put: 1ml of conidial suspension, 4 ml of sterilized 2% potato dextrose broth (0,24 g/l) and 5 ml of double dosed fungicide solution. The tubes were incubate at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, eight hours later the inoculation a three time lecture for each tube was done with a haemocytometer to count the number of germinated conidia.

F. verticillioides strains fumonisin production capability

From twenty *F. verticillioides* strains isolated from T2 harvested kernel, identify as described above, were obtained monoconidial cultures as reported by Tuite (1969). Monoconidial isolates were subcultured in potato dextrose broth (PDB) at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; after seven days the culture broths were filtered under vacuum through Whatman paper n. 4, (Ponts *et al.*, 2006). The recovered mycelium was used to perform molecular identification with primers VER1 and VER2 coding calmodulin (Mulè *et al.*, 2004) to confirm the morphological classification. After molecular identification ten positive monoconidial cultures were chosen. For each culture 10 Synthetischer nährstoffarmer agar (SNA) Petri dishes (\varnothing 90 mm) were inoculated and store in dark at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. After 14 days on each slant were spread 5 ml of sterile water, the surface was gently scraped, the fungal suspension was filtered whit a sterile cotton gauze and recovered in a Erlenmeyer flask. The concentrations of the ten fungal suspensions were determined with a haemocytometer and diluted with sterilized water to obtain a target final concentration of 10^{-6} propagules/ml. For each strain with 1ml of fungal suspension was inoculated a 250 ml Erlenmeyer flask containing 200 ml of

GYAM liquid media (8 mM *L*-asparagine, 1.7 mM NaCl, 4.4 mM K₂HPO₄, 2 mM MgSO₄, 8.8 mM CaCl₂, 0.05% yeast extract, 0.24 M glucose and 5.0 mM malic acid; pH 5.0) (Seo *et al.*, 2001). After 21 days the culture broths were filtered under vacuum through Whatman paper n. 4 and mycelium and cultural broth were separated. Cultural broths were immediately store at -20°C and subsequently analyzed to determine the level of fumonisin contamination as described below. Mycelia were dried in ventilated oven (50°C) over night (12h) and weighed.

Field trial

Field trials were realized as shown in table 1, in 2008 were tested three different mixture of commercial product (tab.2) while in 2009 only one. Chemicals were applied on maize plants 7 days after silk emission with a self-propelled sprayer, with hydraulically adjustable working height, using a volume of 600 L/ha. The thesis were arranged in a randomized complete block design with 3 replications (300 m² each) for treatment.

Table 1. Information about the experimental fields

Trial	Site	Year	Mixture of commercial products tested	Previous crop	Sowing date	Plant density (pt ha ⁻¹)	Irrigation	ECB control	Harvest date
T1	Cremona 45°08'N,10°07'E	2008	M1, M2, M3	Maize	20/04	60000	No	No	13/09
T2	Rovigo 45°01'N, 11°47'E	2008	M1, M2, M3	Maize	11/04	70000	No	No	03/09
T3	Pozzonovo (PD) 45°11'N,11°47'E	2009	M1	Maize	17/04	70000	No	No	03/09
T4	Rovigo 45°01'N, 11°47'E	2009	M1	Maize	12/04	70000	No	No	7/09

M1, M2 and M3 see table2.

Table 2. Chemical treatments

	Mixture of commercial products and rate	Application rate of mixture
UN	-	-
M1	Caramba 90 G/L SL (Metconazole, w/w: 8,6%), Basf and Sportak 45 EW (Prochloraz, w/w:39,8%), Basf. Rate 1:1	2l ha ⁻¹
M2	Diadem ST (Triticonazole w/w: 27,8%), Basf and Sportak 45 EW (Prochloraz, w/w:39,8%), Basf Rate 0,125:1	1,125l ha ⁻¹
M3	Folicur WG (Tebuconazolo w/w:25%), Bayer and Sportak 45 EW (Prochloraz, w/w:39,8%), Basf Rate 1:1	1kg+1l ha ⁻¹

Sampling procedures

In site 2, seven and 30 days after silk chemical treatment 35 ears randomly chosen for each treatment repetition were sampled. In the first sampling moment only silks were taken in the second coinciding approximately with waxy stage all the cobs were harvested. At harvest time (kernel moisture 25±2%.) from either the site 35 ears were randomly chosen from each treatment repetition. Silks and ears were put in sterile bag divided by repetition. Samples were transported as fast as possible to the laboratory and stored at 6°C±1. Ears transported to the laboratory were completely shelled. Silks and waxy kernel were processed within 24 hours after sampling. Maize kernels, at harvest time, were rapidly dried with a hot and dry air flow (50°C) to obtain a 10% final grain moisture and analyzed until 15 days from harvest.

Isolation and quantification of F.verticillioides on maize silk and kernel

Silk, waxy kernels and mature kernels samples were milled with a laboratory knife mills, homogenized and reduced through the technique of quartering. For silks and waxy kernels were conserved only a 100g sample while mature kernel samples were divided in two 1kg sub-sample. One sub-sample, stored frozen (-20°C) was used for toxin analysis and the other one was used for mycological analyses. Mycological analyses were performed with the serial dilution methods. A 50g sub-sample of milled silk, waxy kernel and mature kernel was diluted with sterile distilled water starting from 10^{-1} to 10^{-6} . Aliquot of 0,5 ml from all dilution were spread-plated on PDA plates added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) this step was repeated five times. Plates were incubated 7 days at 25°C and total count and count per colony type were done. Colony was isolated and purified. Identification of *Fusarium* was performed to the species level according to macroscopic and microscopic characteristic as described in Leslie et al. (2006).

Influence of treatments on fumonisin B₁ and B₂ accumulation

Milled maize used for toxin analysis was stored at -20°C until determination. From each milled sub-sample, 20 g were used for fumonisin quantification. Total fumonisin content was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the method UNI EN 14352:2004. Acetonitrile:methanol:water (25:25:50, v/v/v) was utilized as extraction solvent. Immunoaffinity columns (IAC) were used for the isolation of toxins after centrifugation, filtration and dilution steps. Derivatization of fumonisins was carried out with orthophthaldehyde (OPA) and toxins were detected with a fluorescence detector (λ_{ex} : 335 nm, λ_{em} : 440 nm). Isocratic mobile phase used was methanol:sodium dihydrogen phosphate buffer (NaH₂PO₄ 0.1M), pH 3.35 (77:23, v/v) with a flow rate of 1 ml/min at 25°C. Recovery for FB₁ and FB₂ is 90%; LOD: FB₁ = 94 µg/kg , FB₂ = 51 µg/kg; LOQ: FB₁ = 164 µg/kg, FB₂ = 74 µg/kg.

Statistical analysis

Probit analysis was performed to estimate a lethal dose curve response for each strain and commercial product. The lethal doses that yield a 50% mortality (ED_{50}) was estimate based on the probit regression equation. The confidence limits (CL) were used to compare the ED_{50} values between products within strains. ED_{50} values were declared significantly different if their corresponding 95% confidence limits did not overlap.

Data belonging to the dilution method were analysed as described in the Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2001) and express as forming unit per gram of vegetal material (Cfu/g). Cfu/g and $B_1 + B_2$ fumonisin concentration were analyzed by analysis of variance previously transformed, if needed, to $\log_{10}(x+1)$ to obtain the homogeneity of variance (Cavalieri et al., 2005). Means of population count and fumonisins contamination were compared using Tukey HSD test. The analysis were conducted using the software R version 2.10.0 (open source: <http://www.r-project.org>).

3. Results

Lethal dose curve response

A significant difference ($p=0,05$) in ED_{50} resulted among the commercial products within the strains (tab. 3). Either the product are effective in control *F.verticillioides* conidial germination, but Caramba has an higher effectiveness than Sportak, results obtained reveal that Caramba's average ED_{50} is the half of Sportak ED_{50} . However, the sensibility of the three different strains to each chemical product changes; while for Sportak only G1 ED_{50} is statistically different as regards Caramba three different ED_{50} , one for each strain, have been recorded. As mean G1 resulted the more sensible strain to the action of commercial products followed by KSU A-0999 and CBS 218.76.

Table 3. Lethal dose curve response. ED₅₀ in ppm.

Strain	Sportak ED ₅₀ ±95% CF	Caramba ED ₅₀ ±95% CF	Mean
CBS 218.76	60,94 ±18,34	69,39 ±3,95	65,17
G1	13,51 ±6,21	2,27 ±0,58	7,89
KSU A-0999	55,75 ±29,90	14,83 ±2,54	35,29
Mean	43,40	28,83	

F. verticillioides strains fumonisin production capability

The results obtained are reported in table 4 and revealed differences of even 200 times, between the more efficient strain in fumonisin B₁ synthesis (7B) and the less efficient (20B). Speaking about the production of B₂ and the weight of mycelium we recorded some other differences, but they are less important than the previous one. And last but not least these differences are not related each other. In fact, strain 20B, the one that is more efficient in producing mycelium, results being the producer of fumonisin B₁ at a lower level. While considering 7B, the main producer of fumonisins it presents a medium level of mycelium weight. Among these different strains the rate between fumonisin B₁ plus B₂ production and weight varies from 0,24 to 64 and rate between the two kind of fumonisins varies from 1,88 to 8,83.

Table 4. *F. verticillioides* strains fumonisin production capability.

Monoconidial culture	FB ₁ production µg/kg	FB ₂ production µg/kg	Mycelium dried weight mg
1C	2009,36	394,22	252
5C	5605,20	1387,93	242
6B	497,27	61,24	292
7B	13094,91	3164,31	251
8B	2311,06	261,45	191
9B	2606,73	575,23	259
10B	6254,32	1029,28	204
11B	3440,85	598,35	173
12B	5683,49	1239,33	220
20B	< LOD	< LOD	305

LOD: FB₁ = 94 µg/kg , FB₂ = 51 µg/kg

Field trials

Mycological studies made on trial 2, at different dates, reveal that seven days after spray while in thesis M1 and M2 is recorded a reduction in *F.verticillioides* higher than 90%, the level of silk colonization in thesis M3 results lower than the limit of detention (fig.1). Also 30 days after the treatment in all the three thesis the levels of *F.verticillioides* colonization result significantly lower in treated these with a mean reduction of -80% (fig.2). But at harvest time the levels of colonization in all the three thesis result similar. As shown, by the result of the ANOVA, there is not only an influence of each single factor (treatment and site) but also of the interaction between the factors (treatment x site) on *F. verticillioides* kernel colonization as on fumonisin contamination (tab.5). In fact, in site 1, at harvest time, a reduction in kernel colonization is recorded in all the three thesis and it is higher than 90% (fig.4). You can notice that also the effectiveness of the different chemical products in controlling fumonisin contamination vary among the trials, but in thesis M1 either in trials 1 or in 2 is recorded a higher effectiveness respectively of -81% and -86% (fig. 3 and 5). Less effectiveness had mixture M3 but the difference in fumonisin contamination results statistically significant in both trials. Only for thesis M2 the difference in fumonisin contamination is lack of significance in trial 2, but not in trial 1 where it results effective -41% (fig.3 and 5). The repetition of the treatment M1 in the second year in T3 e T4 confirms the effectiveness of this treatment in controlling *F.verticillioides* kernel colonization (-81%) and fumonisin contamination (-78%) (fig.6, 7 and 8). Also in this set of data statistical analyses confirm the influence of each single factor (treatment and site) and of the interaction between the factors (treatment x site) (tab.6). In fact while in T3 is recorded an equal reduction in *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination equivalent and higher than 90%, in T4 the reduction in both the measured parameters is lower than -60% (fig.6 and 7).

Fig.1 Effect of chemical treatments on silk *F.verticillioides* colonization 7 days after spray in site 2. Treatment with unlike letter are significantly different $p= 0,01$.

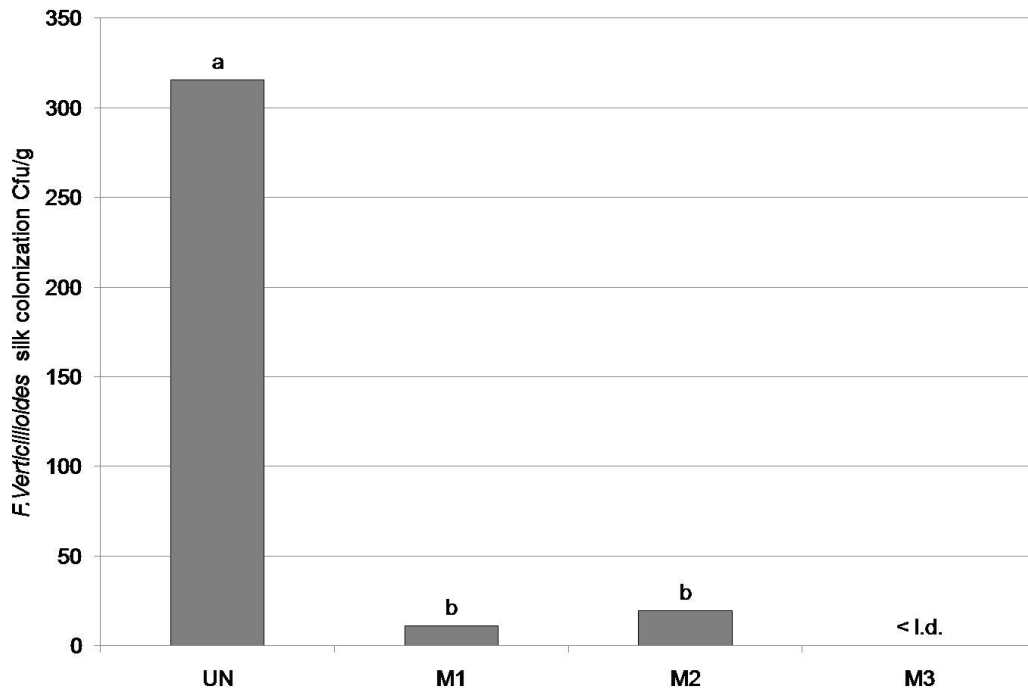


Fig.2 Effect of chemical treatments on kernel *F.verticillioides* colonization 30 days after spray (waxy stage) in site 2. Treatment with unlike letter are significantly different $p= 0,01$.

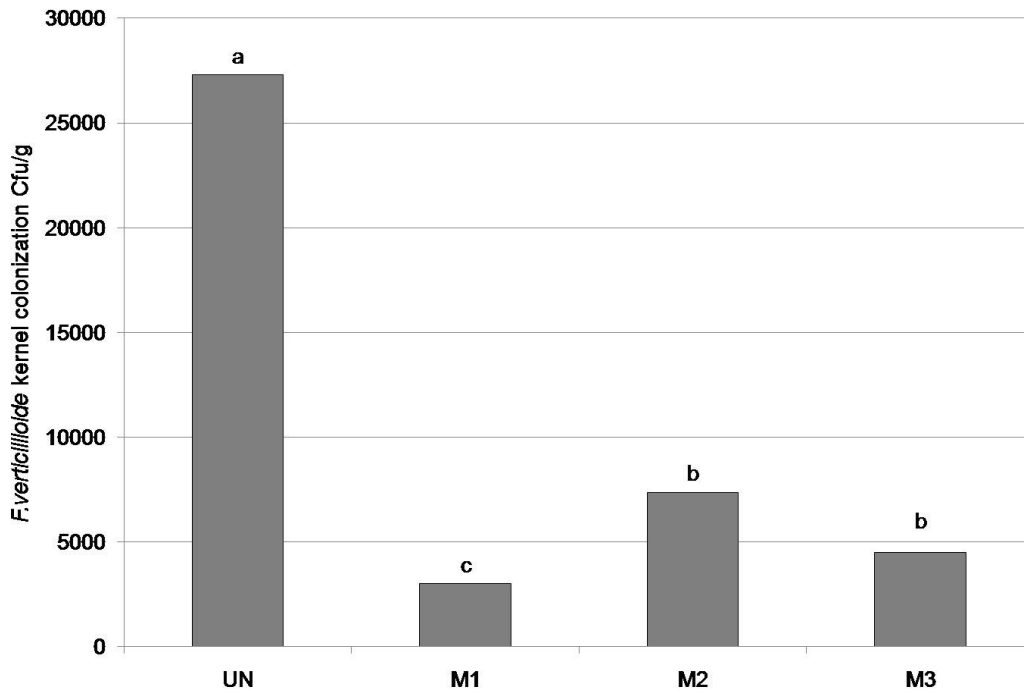


Table 5. Analysis of variance results for *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin B₁ and B₂ contamination confront of different mixtures of chemical effectiveness in field trials T1 and T2.

	Df	<i>F.verticillioides</i> colonization		kernel	Fumonisin B ₁ and B ₂ contamination		
		F value	Pr(>F)		F value	Pr(>F)	
Treatment	1	69.335	3.28e ⁻⁷	***	351.885	2.56e ⁻¹²	***
Site	3	63.033	4.417e ⁻⁹	***	49.365	2.60e ⁻⁸	***
Site x treatment	3	45.184	4.904e ⁻⁸	***	10.839	0.00039	***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Fig.3 Effect of chemical treatments on kernel fumonisin B₁ and B₂ contamination at harvest time in site 2. Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,01.

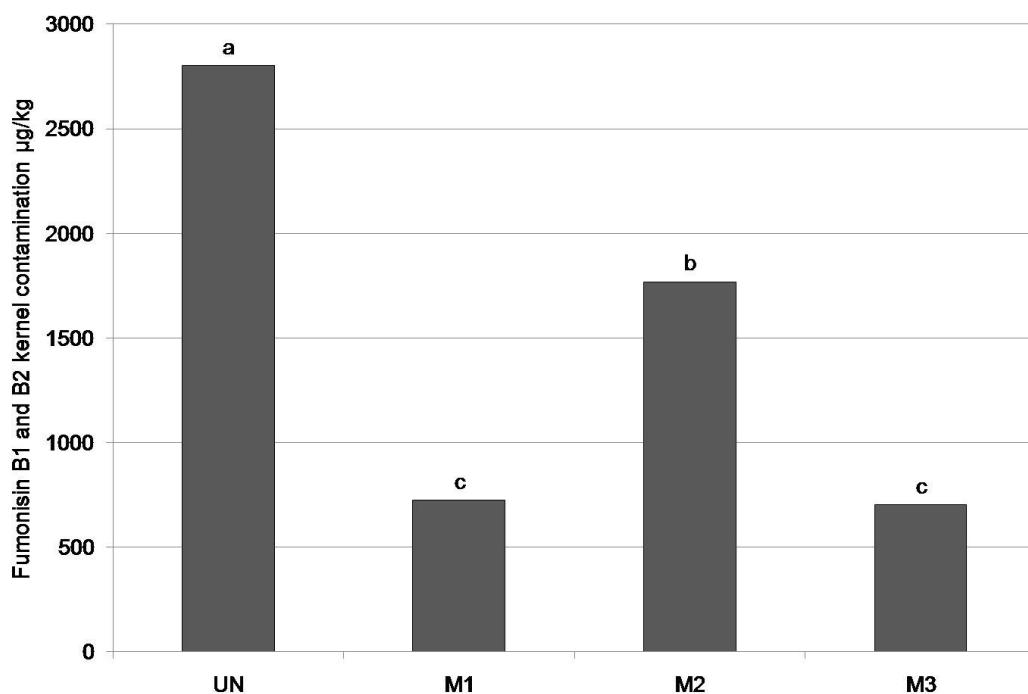


Fig.4 Effect of chemical treatments on kernel *F.verticillioides* colonization at harvest time in site 1. Treatment with unlike letter are significantly different $p= 0,01$.

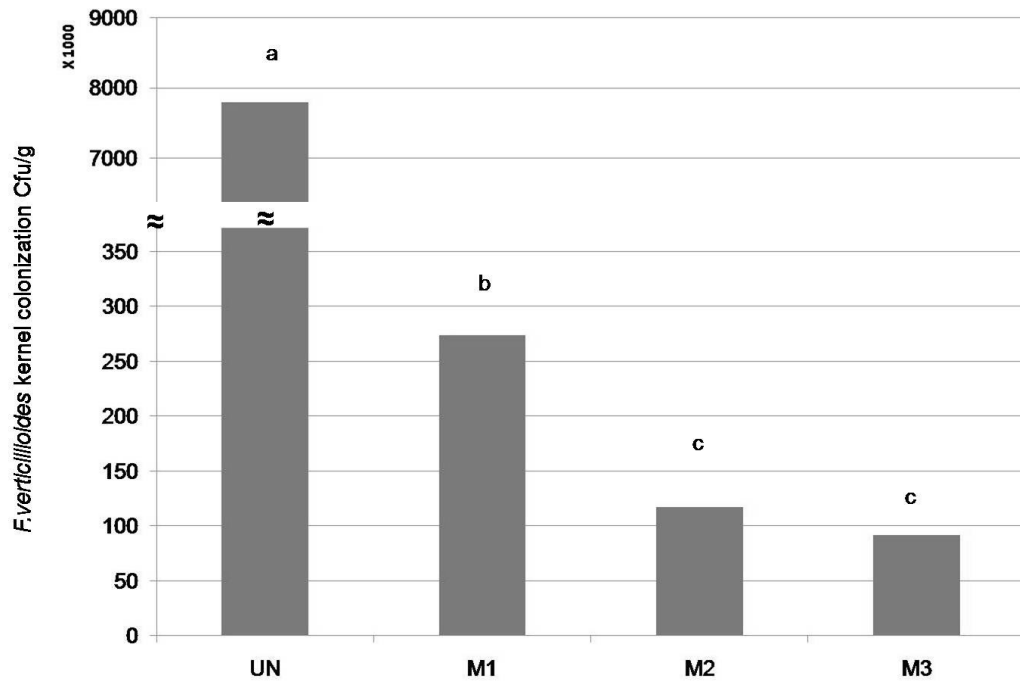


Fig.5 Effect of chemical treatments on kernel fumonisin B₁ and B₂ contamination at harvest time in site 1. Treatment with unlike letter are significantly different $p= 0,01$.

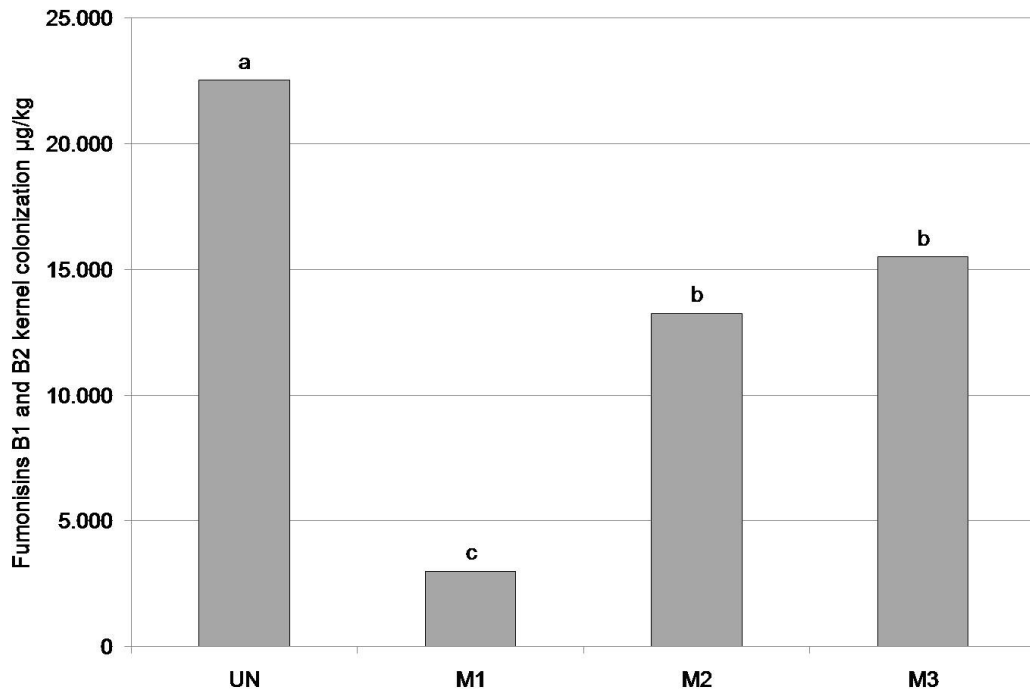


Fig.6 Effect of M1 chemical treatments on *F.verticillioides* colonization at harvest time in site T3 and T4. Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,01.

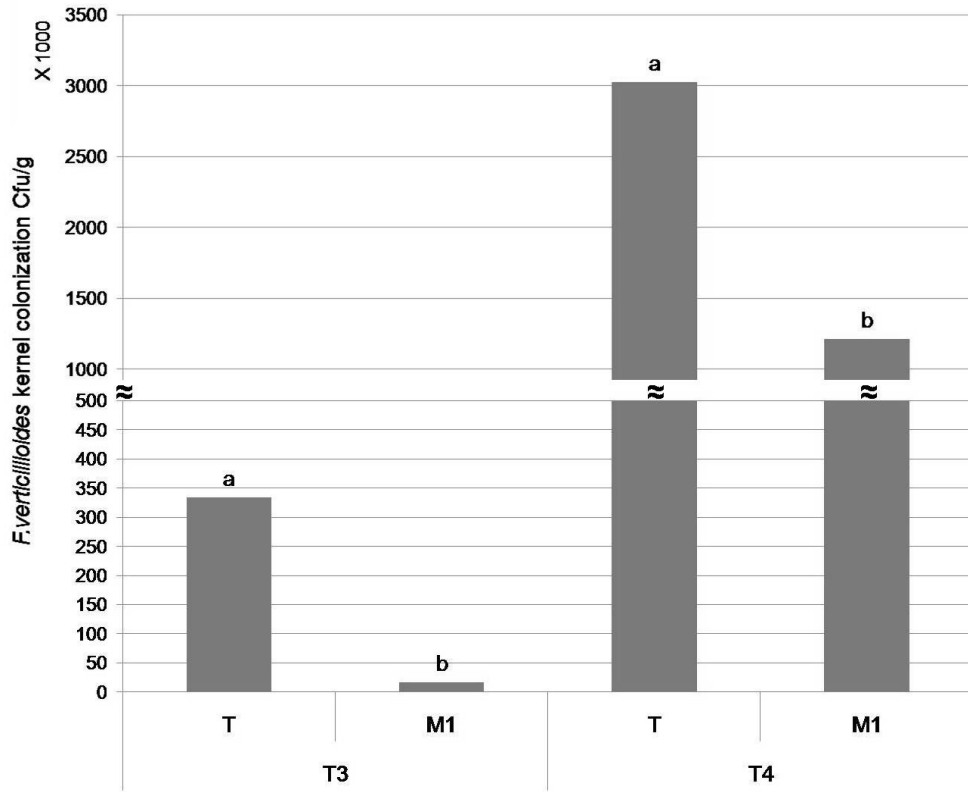


Fig.7 Effect of M1 chemical treatments on kernel fumonisin B₁ and B₂ contamination at harvest time in site T3 and T4. Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,01.

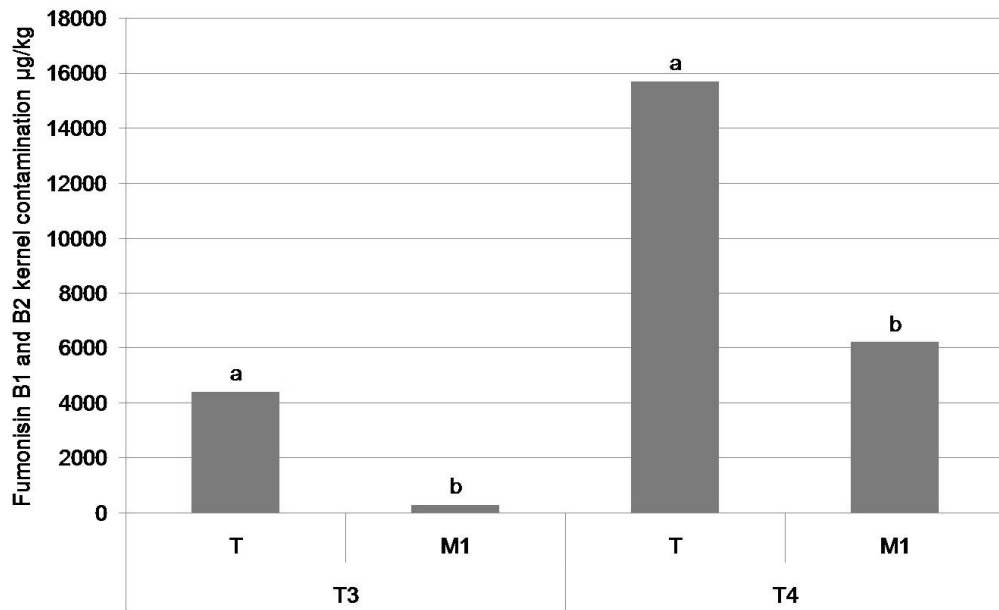


Fig.8 Mean effects of M1 chemical treatments on *F.verticillioides* kernel colonization (a) and fumonisin B₁ and B₂ contamination (b) at harvest time in site T1, T2,T3 and T4. Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,01.

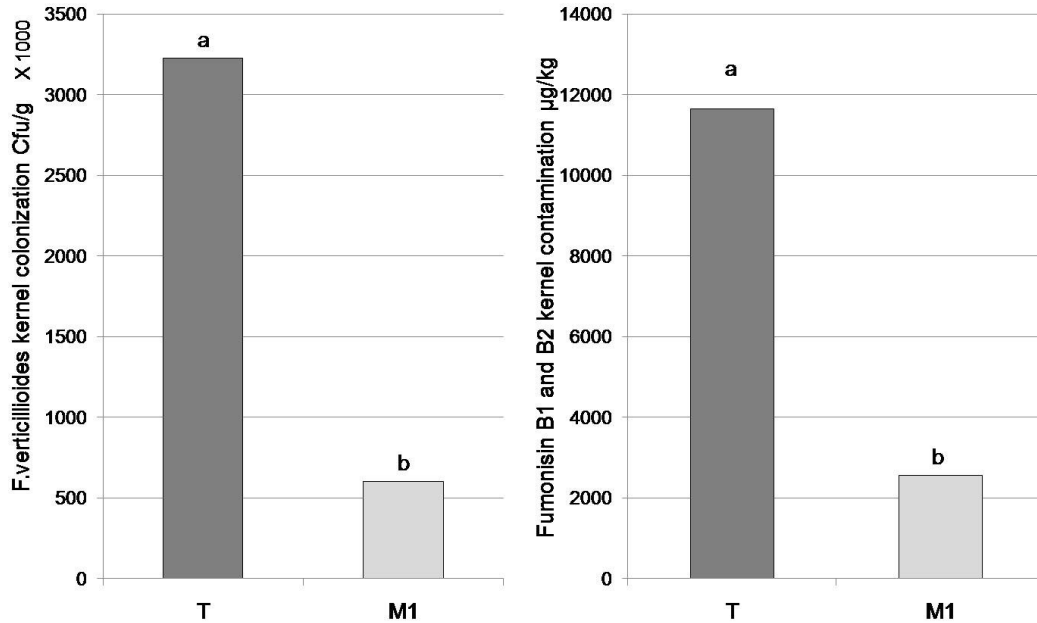


Table 6. Analysis of variance results for *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin B₁ and B₂ contamination effectiveness of mixture 1 (M1) in different trials T1, T2 , T3 and T4.

	Df	<i>F.verticillioides</i> kernel colonization			Fumonisin B ₁ and B ₂ contamination		
		F value	Pr(>F)	***	F value	Pr(>F)	***
Treatment	1	380.03	1.42e ⁻¹²	***	247.43	3.73e ⁻¹¹	***
Site	3	214.29	3.99e ⁻¹³	***	87.65	3.80e ⁻¹⁰	***
Site x treatment	3	43.93	5.98e ⁻⁸	***	9.97	0.00060	***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

4. Discussion and conclusion

Maize grain harvested in the European south region result every year condemned by fumonisin even at concentrations that make maize grain inadvisable for human consumption and for feed of more susceptible animal species (Placinta et al., 1999; Soriano and Dragacci, 2004). The main responsible of maize fumonisin contamination are *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg and in lesser amount *Fusarium proliferatum* (Matsushima). These fungi are also the most frequent isolated fungi in maize (Nelson, 1992; Logrieco et al., 2002) and while they can be isolated from symptomless kernel they are the principal causal agents of pink ear. Because of the harmful effects associate with the presence of fumonisins, the control of *F. verticillioides* has become an important area in food safety. At the moment application of GAP supported by European Corn Borer (ECB) (*Ostrinia nubilalis*) control and followed by GMP represents the only legal line of defence in controlling *F. verticillioides* kernel colonization and *Fusarium*-toxins contamination. But different environmental conditions among maize cultivation areas more or less favourable to *F. verticillioides* development and their annual fluctuations change agricultural practices effectiveness (Blandino et al., 2009) in control *Fusarium* colonization and mycotoxins contamination (Munkvold, 2003). A reliable control could be achieved, as in wheat, with integration of indirect control strategies as GAP with direct control strategies. Among the different direct control strategies the application of chemical product can be an exploitable opportunity. Nowadays no fungicides are registered for the use in maize during vegetative stage. However as said before, due to world-wide distribution of *Fusaria* and their high negative effects on agricultural production, several different active ingredients are registered against these pathogens and among these ergosterol synthesis inhibitors (EBIs) (Paul et al., 2008). On cereals EBIs are already used for the control of FHB and the effect is known not only in controlling *Fusarium* head colonization but also in controlling *Fusarium*-toxins accumulation. Recent studies have underlined, that different chemical products or active ingredients have different effectiveness among different species of *Fusarium*. To the authors knowledge there is

only few data on the sensibility of *F.verticillioides* to this product. The results obtain from the *in vitro* tests demonstrate EBIs effectiveness in containing *F.verticillioides* conidia germination (tab.3). However, the results reveal also a different sensibility among strain of the species *F.verticillioides* to different chemical products. *In vitro* tests reveal that Caramba (metconazole) has the higher effectiveness expressed especially against the strain G1, strain that has been isolated from the same site where the open field trials are realized. Results of *in vitro* experiments are only partially related with open field trials, but reasonably can be hypothesize that also in open field experiments the effectiveness of chemical products act differentially against strain of natural *F.verticillioides* populations. Strains that, in other *in vitro* assay, have demonstrated according with Segvic and Pepeljnjak (2003) different fumonisin B₁ production ability which can vary up to 200 times, but also in fumonisin B₂ production as in mycelium development (tab.4).

However, in field trials all the tested mixtures of chemical products result able to control *F.verticillioides* colonization at least until the waxy stage, 30 days after spraying, and fumonisin contamination at harvest time (fig. 1 and 2). In T2 at harvest time the reduction in *F.verticillioides* kernel colonization lacks of statistical significance, result that is expected because the effectiveness of the chemical products decrease with the passage of time. Only few data are available on the effectiveness of fungicide in controlling *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination in open field. Folcher et al. (2009) refer of experimental trials performed in different maize area of France in which the spray of fungicide associated with insecticides on maize at female flowering gives no more advantage than the application of the insecticide alone. However the present data show that chemicals sprayed seven days after female flowering are effective in controlling *F.verticillioides* infection becoming through silks and result in a mean reduction of - 60% in harvested kernel fumonisin contaminations (fig 3). Results that also confirm the importance of infection through silks, *F.verticillioides* that colonize kernels through this pathway has a long time, at least two months, to develop inside grain and synthesize fumonisins.

However, the effectiveness of treatments vary among different site and years as *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination. The statistical analyses of data underline a significant interaction between site and treatment (tab.5) . Data collect don't permit to understand completely this aspect, but some hypothesis can be formulated. Environmental condition could be more or less favorable to *F.verticillioides* development determining different disease pressure but also different sensibility to chemical products of strains with different fumonisin production ability and mycelium development efficiency can motivate the partial disagreement between levels of fumonisins and level of infection recorded in the same thesis as in T1 in 2008 (tab. 4, fig.4 and 5). In field trials during the first year in both the sites, M1 results the mixture with the higher effectiveness in controlling *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination (fig.3 and 5). This results have been confirmed in trials T3 and T4 realized the following year (fig 6 and 7). As whole of two years of field experiments in three sites M1 reduces *F.verticillioides* kernel colonization of -74% and fumonisin contamination of -80% (fig.8). Results that are obtained in experiment where neither ECB control nor irrigation were done in order to have a stress situation for maize plant. Situation favorable to *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination, however in three trials out of four T1, T2 and T3 the level of fumonisin contamination is contained under the level stated for the human consumption 2000 µg/kg (Reg. CE ...). This can reasonably assume that if GAP are applied in T4 the level of contamination could result lower than the legal level for human consumption like in other trials.

In conclusion, the present results show that chemical treatments on maize silks seven days after female flowering can be an effective direct control strategy to obtain a reliable control of *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination. However even if for the distribution of chemical mixtures is possible to employ the self-propelled sprayer used for the distribution of insecticide against ECB, no fungicides are registered for the use in maize during flowering. Moreover integrated control strategies protocols have to be point out in the different

maize cultivation areas characterized by different environmental conditions that can interfere with the effectiveness either of indirect control strategies as GAP and ECB control or of direct control strategy as application of chemical products.

References

- Avantaggiato, G., Quaranta, F., Desiderio, E., Visconti, A., 2002. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. *Journal Science and Food Agriculture*, 83:13–18.
- Bacon, C. W., and D. M. Hinton. 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Can. J. Bot.* **74**:1195-1202.
- Battilani P., Rossi V., Pietri A., 2003. Modelling *Fusarium verticillioides* infection and fumonisin synthesis in maize ears. *Aspects of Applied Biology*, 68: 91-100.
- Blandino M., Reyneri A., Colombari G., Pietri A., 2009. Comparison of integrated field programmes for the reduction of fumonisin contamination in maize kernels. *Field Crops Research* 111: 284–289.
- Bruns, H.A., 2003. Controlling aflatoxin and fumonisin in maize by crop management. *Toxin Rev.* 22 (2), 153–173
- Desjardins, A. E., R. D. Plattner, T. C. Nelsen, and J. F. Leslie. 1995. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:79-86.
- Dodd, J. 1980. The role of plant stresses in development of corn stalk rots. *Plant Dis.* 64:533-537.
- Drepper, W., and B. Renfro. 1990. Comparison of methods for inoculation of ears and stalks of maize with *Fusarium moniliforme*. *Plant Dis.* **74**:952-956.
- Food and Drug Administration. 2000. Guidance for industry: fumonisin levels in human foods and animal feeds—draft guidance. Food and Drug Administration, Washington, D.C.

- Headrick, J., and J. Pataky. 1991. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* **81**:268-274.
- Kedera, C. J., Leslie J. F., and Claflin L. E., 1994. Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology* **84**:603-607.
- Leslie, J. F. 1996. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*, p. 153-164. In L. S. Jackson, J. W. De Vries, and L. B. Bullerman (ed.), *Fumonisin in food*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Leslie, J. F., C. Pearson, P. Nelson, and T. Toussoun. 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* **80**:343-350.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Bottalico, A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **108** (7), 597–609.
- Magan, N., and J. Lacey. 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **82**:83-93.
- Magan, N., S. Marin, A. Ramos, and V. Sanchis. 1997. The impact of ecological factors on germination, growth, fumonisin production of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* and their interactions with other common maize fungi. *Cereal Res. Commun.* **25**:643-645.
- Munkvold, G. P., and W. M. Carlton. 1997a. Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. *Plant Dis.* **81**:211-216.
- Munkvold, G. P., D. C. McGee, and W. M. Carlton. 1997c. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Phytopathology* **97**:209-217.

- Munkvold, G. P., R. L. Helmich, and W. B. Showers. 1997b. Reduced *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology* **87**:1071-1077.
- Nagy, E., I. Cabulea, and I. Has. 1997. The role of genotype in maize x *Fusarium* pathosystem. *Cereal Res. Commun.* **25**:789-790.
- Nelson, P. E. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117:29-36.
- Nelson, P. E., A. E. Desjardins, and R. D. Plattner. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathology* 31:233-252.
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78 (1-2), 21-37.
- Reid, L. M., Bolton, A. T., Hamilton, R. I., Woldemariam, T., and Mather, D. E. 1992. Effect of silk age on resistance of maize to *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 14:293-298.
- Reid, L. M., Hamilton, R. I., and Mather, D. E. 1996. Screening Maize for Resistance to *Gibberella* Ear Rot. *Agric. Agri-Food Can. Tech. Bull. Publ.* 196-5E.
- Reid, L.M., Nicol R.W., Ouellet T., Savard M., Miller J.D., Young J.C., Stewart D.W., Schaafsma A.W., 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease Progress, Fungal Biomass, and Mycotoxin Accumulation. *Phytopathology*, 89 (11): 1028-1037.
- Segvic M.; Pepeljnjak S., 2003. Distribution and fumonisin B₁ production capacity of *Fusarium moniliforme* isolated from corn in Croatia. *Periodicum biologorum* 105 (3): 275-279.
- Soriano, J.M., Dragacci, S., 2004. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International* 37 (10), 985-1000.

- Summerell B. A., Salleh B., Leslie J.F., 2003 A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. *Plant Disease*, 87 (2): 117-128.
- Tuite, J., 1969. *Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, MN, USA.
- Yates, I. E., C. W. Bacon, and D. M. Hinton. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Disease*, **81**:723-728.

ARTICOLO

Effetto di trattamenti insetticidi e fungicidi, effettuati in epoche diverse, sullo stato fitosanitario del mais.

R. Causin¹, N. Mori², R. Rasera¹, R. Pavanello², M. Bozzolan¹, S. Gambetta³, E. Tealdo³

¹Dipartimento TESAF- Sezione Patologia Vegetale; Viale dell'università, 16 35020 Legnaro (PD)

²Dipartimento agronomia ambientale e produzioni vegetali; Viale dell'università 16, 35020 Legnaro (PD)

³Veneto Agricoltura - Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari; Via San Gaetano, 74 - 36016 Thiene (VI)

Tipo di articolo: articolo scientifico proposto per la pubblicazione negli atti delle Giornate Fitopatologiche 2010.

RIASSUNTO

Nell'ambiente di coltivazione della Pianura Padana il mais risulta regolarmente contaminato dalle fumonisine B₁ e B₂, prodotte principalmente dal fungo *Fusarium verticillioides*. Prove svolte recentemente hanno dimostrato che, oltre all'applicazione delle Buone Pratiche Agricole comprendenti la lotta alla piralide, anche l'esecuzione di trattamenti fungicidi può portare ad un controllo delle infezioni fungine e della conseguente contaminazione da fumonisine. Per ottenere il massimo vantaggio, però, gli interventi insetticidi e fungicidi dovrebbero essere eseguiti in epoche diverse. Tuttavia la limitata redditività del mais non consente di ipotizzare l'esecuzione di più trattamenti. Nel presente lavoro vengono presentati i risultati di una prova volta a saggiare la possibilità di associare in un'unica distribuzione gli insetticidi e i fungicidi. I saggi svolti confermano l'efficacia degli interventi, se eseguiti separatamente e all'epoca corretta, mentre la miscela insetticida+fungicidi si è dimostrata inefficace in tutte le date saggiate.

Parole chiave: *Fusarium verticillioides*, *Ostrinia nubilalis*, mais, trattamenti fitosanitari, micotossine.

SUMMARY

EFFECT OF INSECTICIDE AND FUNGICIDE TREATMENTS ON MAIZE GRAIN QUALITY

Maize grain harvested in Po Valley, due to the particularly clima characteristic of this region, is regularly contaminated by fumonisins B₁ and B₂, produced principally by the fungus *Fusarium verticillioides*. Recent studies shown that in addition to Good Agricultural Practices (GAP) including European Corn Borer (ECB) control, fungicide treatment at female flowering may lead to control *Fusarium verticillioides* infection and subsequent fumonisin contamination. But to have higher efficacy insecticides and fungicides treatments have to be performed at different times. However at the moment, the limited economic performance of maize makes impossible to plan control protocol base on multiple treatments. The present work shown results of trial set to test the possibility to put together insecticides and fungicides. The experiment conducted confirmed the effectiveness of treatments if performed separately and correctly scheduled, the mixture insecticide + fungicide was ineffective in all the dates tested.

Keywords: *Fusarium verticillioides*, *Ostrinia nubilalis*, maize, chemical control, mycotoxins.

1. Introduzione

Le micotossine sono prodotti secondari del metabolismo di funghi (muffe) che possono svilupparsi sulle derrate alimentari sia in campo sia durante la fase di stoccaggio, quando questa non sia stata condotta correttamente (A.A.V.V, 2006). I cereali sono tra i prodotti agricoli più frequentemente contaminati da micotossine, questo fatto risulta di particolare interesse e preoccupazione, soprattutto per l'importanza che essi hanno nell'alimentazione umana e zootecnica (Miraglia e Brera, 2004). I cereali italiani non sono immuni da questa problematica ed in particolare il mais prodotto nella Pianura Padana risulta regolarmente contaminato dalle fumonisine B₁ e B₂; le quali, in determinate annate, raggiungono livelli tali da rendere sconsigliabile l'uso di questo cereale per l'alimentazione umana e delle specie animali più sensibili (suini, equini, conigli e animali da compagnia) (Tealdo et al., 2009). Le fumonisine, infatti, sono poste dallo IARC (International agency for cancer research) nel gruppo 2b, tra le molecole potenzialmente cancerogene per l'uomo, poiché esse possono essere associate all'insorgenza del cancro all'esofago e causare anomalie nei neonati (Leslie and Summerel, 2006). Le conseguenze sulla salute degli animali non sono di minore importanza; si possono verificare manifestazioni acute quali la leucoencefalopatia nei cavalli, l'edema polmonare nei maiali e il cancro al fegato e al rene nelle cavie ed effetti cronici che portano ad un aumento della sensibilità alle malattie, alla riduzione della fertilità e della quantità e qualità delle produzioni zootecniche (Soriano and Dragacci, 2004). Il principale responsabile della contaminazione da fumonisine della granella di mais è *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg che negli areali della Pianura Padana, trova il suo ambiente ideale di sviluppo. Ad oggi in Italia ed in Europa le uniche misure attualmente disponibili per contenere la contaminazione da fumonisine nella granella di mais sono rappresentate dall'applicazione delle buone pratiche agricole (BPA)(Racc. CEE 583/2006). In particolare le BPA che sembrano avere un impatto maggiore sul contenuto di fumonisine sono: epoca di semina, la scelta dell' ibrido ed epoca di raccolta, concimazione, diserbo, irrigazione, rotazioni e interrimento dei residui colturali, ma gli effetti più importanti si ottengono da un'efficace controllo di *Ostrinia nubilalis* Hb (piralide) (Maiorano et al.,

2007). Il controllo della piralide quindi è un passaggio obbligato per la salvaguardia della qualità delle nostre produzioni (Pollini, 2002). I migliori risultati nel contenimento di *O. nubilalis* sono ottenuti intervenendo al picco della 2a generazione (Pieta et al., 2003). Consentendo la redditività della coltura l'esecuzione di una sola applicazione, di fondamentale importanza è l'individuazione del momento di intervento soprattutto in caso di volo prolungato e con catture limitate (Blandino *et al.* 2008). Inoltre l'efficacia del trattamento è legata al momento di applicazione ed alla persistenza della sostanza attiva impiegata in quanto le larve sono esposte all'insetticida solo per un periodo di tempo limitato, dalla schiusa delle uova alla prima penetrazione all'interno della pianta. Gli andamenti stagionali, le diverse caratteristiche e pressioni di malattia che distinguono gli areali di coltivazione del mais, condizionano l'efficacia delle pratiche colturali e del controllo della Piralide, ma anche lo sviluppo dei *Fusaria* e la conseguente contaminazione da fumonisine, rendendo variabile il vantaggio ottenuto con l'applicazione delle BPA (Munkvold, 2003). Inoltre, in areali a forte pressione di malattia come il Veneto, l'applicazione di strategie di controllo indiretto non sembrano sufficienti a contenere efficacemente lo sviluppo del fungo e la contaminazione da tossine. In questi casi, risultano interessanti le prospettive che emergono dagli esiti di prove di controllo diretto dove si è visto che l'esecuzione di trattamenti fungicidi sette giorni dopo la fioritura femminile ha portato ad una riduzione media della contaminazione da fumonisine del 78% (Causin et al., 2009). Anche in questo caso però il controllo delle infezioni del fungo non è risultato completo ed appare legato alla tempestività dell'esecuzione. Gli interventi fungicidi, pertanto, devono essere inseriti in una strategia di lotta integrata che comprenda tutte le possibilità di lotta, tra cui di fondamentale importanza appaiono l'esecuzione del trattamento per il controllo della piralide e l'applicazione delle BPA. In questa ottica sarebbero necessari due distinti interventi, uno fungicida da effettuarsi sette giorni dopo la fioritura femminile ed un secondo insetticida eseguito al picco di catture della piralide che mediamente cade nella prima metà di Luglio. Come già riferito, la limitata redditività del mais non consente di ipotizzare un doppio trattamento, pertanto, risulterebbe interessante stabilire se sia possibile e vantaggioso associare in un unico intervento sia la lotta

contro la Piralide, sia quella contro *F. verticillioides*. Nel presente lavoro vengono presentati i primi risultati di prove volte a saggiare l'efficacia di miscele di insetticida più fungicida, distribuite nel momento più adatto per il controllo del patogeno e in quello consigliato per combattere *O. nubilalis*, rispetto al singolo intervento eseguito all'epoca più opportuna, riferendo sull'effetto che hanno avuto i diversi trattamenti nel contenere nella granella di mais la colonizzazione da *F. verticillioides* e la conseguente contaminazione da fumonisine.

2. Materiali e metodi

La prova sperimentale è stata realizzata durante l'annata agraria 2009, in località Pozzonovo (PD), presso un'azienda ad indirizzo cerealicolo, su terreno di media tessitura tendente al sabbioso. Il campo sperimentale è stato organizzato secondo uno schema a blocchi randomizzati con tre ripetizioni, ciascuna di superficie pari a 300 m², applicando la tecnica agronomica riassunta in tabella 1. Le tesi saggiate con l'indicazione dei prodotti fitosanitari impiegati, le date di intervento e il loro posizionamento rispetto al ciclo di sviluppo del mais e della piralide, sono, invece, elencate in tabella 2. I trattamenti sono stati eseguiti con una macchina semovente dotata di barra a manica d'aria in grado di sollevarsi 1 m al di sopra delle infiorescenze maschili del mais (trampolo). Per la distribuzione dei prodotti si è utilizzato un volume d'acqua pari a 600 l/ha.

Tabella 1. Tecnica agronomica.

PreceSSIONE colturale	Mais
Preparazione del terreno	Aratura autunnale, estirpatura invernale, preparazione del letto di semina in due passaggi in primavera.
Ibrido	Famoso, classe FAO 500, 127 gg
Data di semina	17 aprile
Concimazione	500 q/ha di letame bovino - distribuzione autunnale; 2,5q/ha di concime NPK (0-20-20) – durante la preparazione del terreno; 2 q/ha di urea in presemina; 2,5 q/ha di urea in copertura alla sarchiatura.
Irrigazione	no
Data di raccolta	03 settembre

Tabella 2. Piano dei trattamenti.

Tesi	Formulati impiegati	Epoca di intervento: stadio fenologico coltura	Andamento volo <i>O. nubilalis</i>	Data di applicazione
1	Testimone trattato con acqua	7 giorni dopo l'emissione delle sete	Inizio catture seconda generazione	10 lug.
2	Karate Zeon*	inizio maturazione fisiologica	Picco catture	14 ago.
3	Karate Zeon* Sportak** Caramba***	7 giorni dopo l'emissione delle sete	Inizio catture seconda generazione	10 lug.
4	Sportak** Caramba***	7 giorni dopo l'emissione delle sete	Inizio catture seconda generazione	10 lug.
5	Karate Zeon* Sportak** Caramba***	Fine fioritura femminile, inizio maturazione latte	Incremento catture seconda generazione	23 lug.
6	Karate Zeon* Sportak** Caramba***	inizio maturazione fisiologica	Picco catture	14 ago.

*Karate Zeon 1.5 prodotto insetticida a base di Lambda-cialotrina 15g/L, dose di impiego 125mL/ha; **Sportak 45 EW prodotto fungicida a base di Procloraz (39,8g/L), dose di impiego 1L/ha; ***Caramba 90 SL prodotto fungicida a base di Metconazolo (90g/L) dose di impiego 1L/ha;

Presenza e contenimento di O. nubilalis

Il volo di *O. nubilalis* è stato monitorato attraverso l'impiego di una trappola luminosa, giornalmente osservata dal mese di giugno al mese di agosto. Il 20 agosto ed il 01 settembre, 20 spighe per parcella sono state campionate al fine di valutare l'attacco del fitofago; previa rimozione delle brattee si è proceduto al rilievo del numero di fori e larve presenti. I dati raccolti sono stati sottoposti all'ANOVA e test di Duncan previa normalizzazione.

Presenza e contenimento di F. verticillioides

Al momento della raccolta (umidità della granella 25±2%), per ogni ripetizione si è proceduto ad individuare un'area di saggio, lasciando almeno 1 metro di distanza dai bordi della parcella, all'interno della quale sono state prelevate 100 spighe scelte a caso ma in modo da campionare omogeneamente tutta l'area di saggio. Su metà delle spighe, previa rimozione delle brattee, è stato valutato lo stato fitosanitario, come di seguito riportato, l'altra metà è stata riservata alle analisi micologiche.

Valutazione dello stato fitosanitario delle spighe

I rilievi sono stati limitati ai soli marciumi rosa. Le spighe sono state suddivise in classi di severità come proposto da Reid (1996): **classe 1**=sano: nessuna lesione visibile; **classe 2**=lesione superiore all'1%; **classe 3**=dal 2 al 3%; **classe 4**=dal 4 al 5%; **classe 5**=dal 6 al 10%; **classe 6**=dal 11 al 25%; **classe 7**= dal 26 al 50%; **classe 8**=dal 51 al 75%; **classe 9**=lesione maggiore del 75% della superficie. Successivamente si è ricavato un indice di gravità del marciume utilizzando la seguente relazione: $I = (\sum nxc) / (N \times 9)$ dove N=numero totale di spighe considerato; n=numero di spighe catalogate in ciascuna classe; c=valore della classe. Inoltre si è annotato se l'area di evasione del fungo fosse o meno associata a fori causati dall'azione trofica della piralide. I dati ottenuti sono stati analizzati tramite confronto tra i limiti fiduciali delle medie ($P=0,05$).

*Determinazione della colonizzazione da *F. verticillioides* della granella*

Le spighe sono state sgranate e il quantitativo totale di granella è stato pesato e macinato con un mulino a lame. Con il metodo della divisione in quarti si sono ottenuti due campioni di farina del peso di 1kg ciascuno. Il primo di essi è stato conservato congelato ($-20 \pm 1^\circ\text{C}$) per le successive analisi sul contenuto in micotossine, il secondo è stato mantenuto a $+6 \pm 1^\circ\text{C}$ e su esso, entro quattro giorni, sono state eseguite le analisi micologiche. Dalla farina frigoconservata, dopo ripetuta mescolatura si è prelevato un campione di 50 g che è stato sospeso in 450 ml di acqua demineralizzata sterile. La sospensione così ottenuta è stata a sua volta diluita di un fattore 1:10 ripetendo l'operazione fino ad ottenere una concentrazione farina: acqua pari a $1:10^6$. Aliquote di 0,5 ml sono state prelevate da ogni diluizione e distribuite su piastre Petri (\varnothing 9 cm) contenenti PDA (Potato Dextrose Agar) addizionato con solfato di streptomina (50 mg/l). Per ogni sospensione si è proceduto ad inoculare 5 piastre che sono state incubate per 5 gg a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Alla fine del periodo di incubazione si è proceduto ad effettuare una conta totale delle colonie sviluppatesi e una conta in base al tipo diverso di colonia. L'identificazione delle colonie di *Fusarium* è stata condotta fino alla specie osservandone le caratteristiche microscopiche e macroscopiche come descritto in Leslie et al.

(2006). Dai dati raccolti in questo modo e operando come indicato in Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2001), sono state calcolate le unità formanti colonie (Cfu) per grammo di materiale vegetale (Cfu/g), che sono state poi confrontate tramite ANOVA e il test HSD di Tukey, previa normalizzazione, se necessaria.

Determinazione del livello di contaminazione da fumonisine B₁ e B₂

Il campione di farina congelato a -20°C è stato inviato a Veneto Agricoltura, Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari di Thiene, dove sono state eseguite le analisi per determinare il contenuto di fumonisine B₁ e B₂. Le analisi si sono svolte applicando il metodo UNI EN 14352:2004, con recupero per FB₁ e FB₂ pari al 90 %; LOD: FB₁ = 94 µg/kg, FB₂ = 51 µg/kg; LOQ: FB₁ = 164 µg/kg, FB₂ = 74 µg/kg.

3. Risultati

*Presenza e contenimento di *O. nubilalis**

Dai dati raccolti con l'impiego della trappola luminosa (grafico 1) è possibile evidenziare che le catture di *Ostrinia nubilalis* sono iniziate verso la metà del mese di luglio ed il picco di sfarfallamento è stato osservato nella seconda decade di agosto, con un ritardo di due settimane rispetto all'andamento medio stagionale registrato nella zona. Il trattamento insetticida ha mediamente ridotto del 38% la quantità di fori e del 54 % il numero di larve presenti nelle pannocchie delle piante trattate. Rispetto all'epoca d'impiego i migliori risultati, con un'efficacia del 79%, sono stati ottenuti applicando il piretroide al picco del volo (tesi 2 e 6). Applicando il formulato all'inizio delle catture è stata ottenuta un'efficacia del 55% (tesi 3). Un non soddisfacente controllo ha sortito il timing che prevedeva l'applicazione quando le catture iniziavano ad incrementare (tesi 5). In tabella 3 sono stati riportati i risultati ottenuti con la relativa analisi statistica.

Grafico 1. Catture di adulti di *O. nubilalis*.

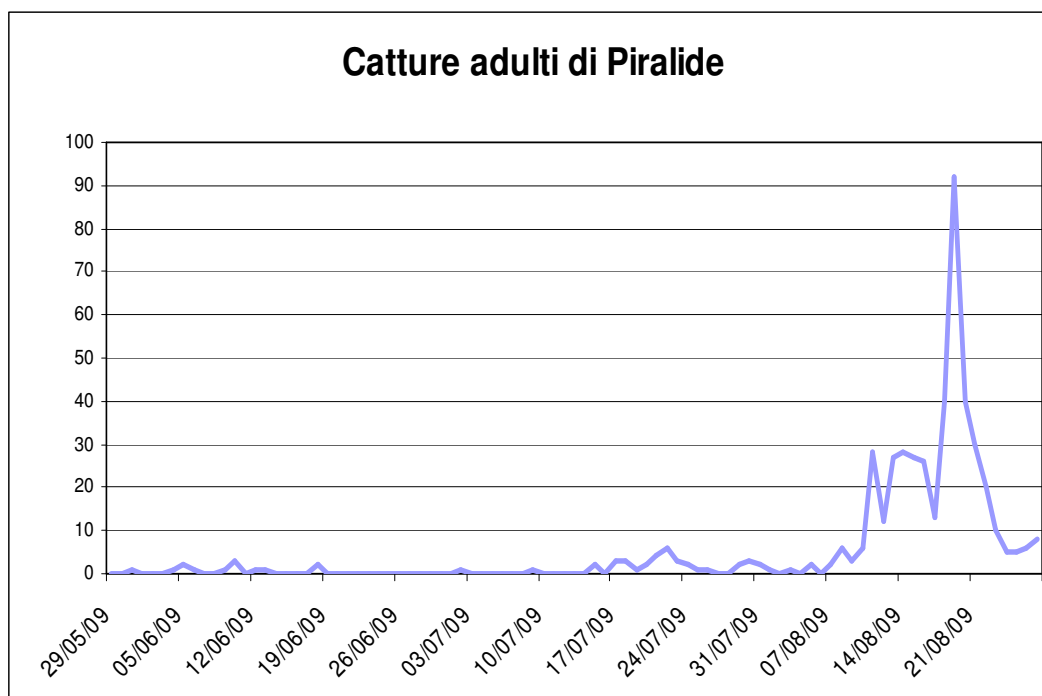


Tabella 3. Efficacia dei trattamenti eseguiti su *O. nubilalis*.

Tesi	20 agosto				01 settembre					
	Fori		Larve		Fori		Larve		Peso	
1	1,55	a	1,72	a ; A	3,75	a	2,43	a	0,24	a
2	1,36	a	0,44	bc; BC	1,48	a	0,57	a	0,19	a
3	1,05	a	0,56	bc; BC	1,47	a	0,93	a	0,23	a
4	1,14	a	0,91	ab; ABC	3,73	a	2,70	a	0,21	a
5	1,17	a	1,30	a; ab	2,98	a	1,97	a	0,24	a
6	0,75	a	0,38	c;C	2,22	a	1,28	a	0,26	a

Lettere minuscole differenti indicano differenze significative per $P < 0.05$

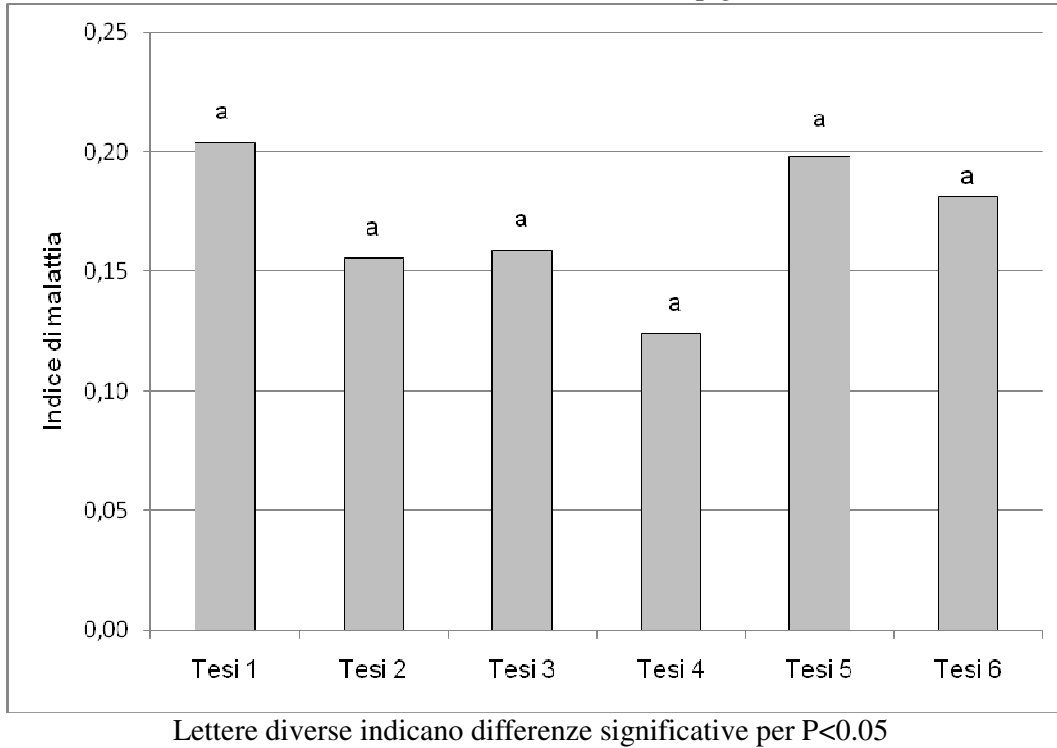
Lettere maiuscole differenti indicano differenze significative per $P < 0.01$

Valutazione dello stato fitosanitario delle spighe

I rilievi eseguiti con lo scopo di valutare lo stato fitosanitario della spiga (grafico 2) non hanno evidenziato delle differenze statisticamente significative nell'efficacia dei trattamenti. Si nota, comunque, nella tesi 4 (intervento fungicida 7 giorni dopo la fioritura femminile) una riduzione più marcata dell'entità del marciume. I rilievi condotti sull'associazione tra danni causati dall'azione trofica della piralide e stato fitosanitario della spiga hanno permesso di osservare che nelle tesi 1, 5 e 6 dove si è registrata la presenza di un numero superiore di larve (tra 1,28 e 2,70) e fori (da 2,22 a 3,75) il marciume che si sviluppa in aree non interessate dall'azione trofica della piralide è pari a

circa il 30% del totale; nelle tesi 2 e 3, dove c'è un minore numero di larve e fori, il 20% della superficie ammuffita è stato rilevato in assenza dei danni causati dall'azione dell'insetto. Fa eccezione la tesi 4 (trattamento con fungicida 7 giorni dopo la fioritura femminile) dove a fronte di un consistente danno da piralide (3,73 fori medi per spiga e 2,70 larve) lo sviluppo del marciume risulta molto contenuto.

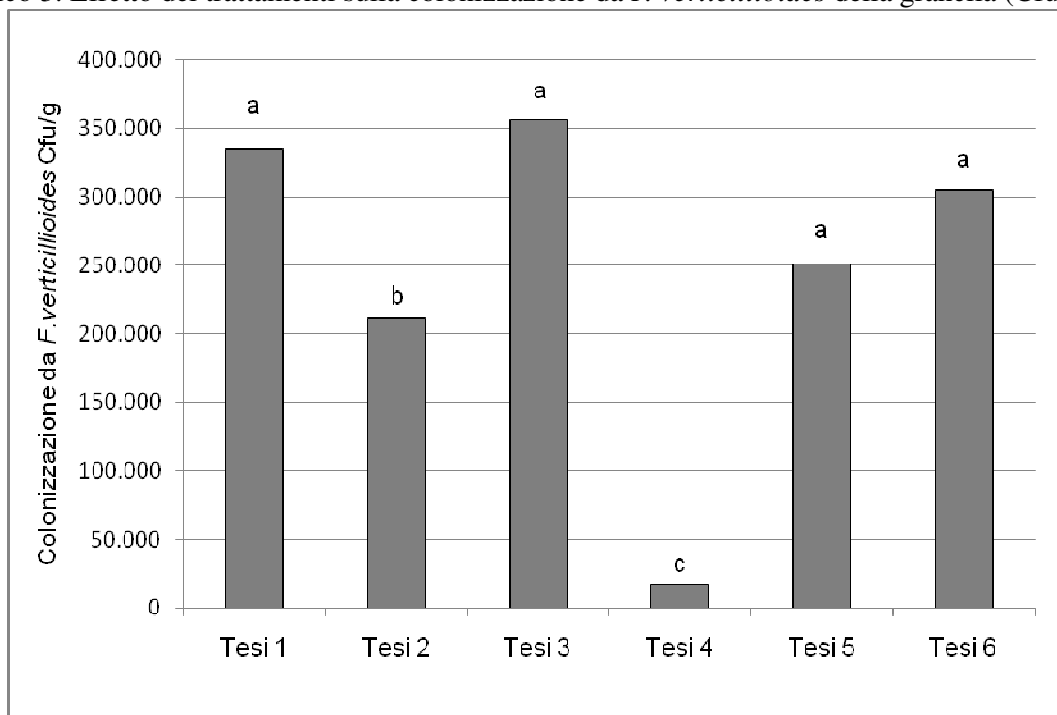
Grafico 2. Effetto dei trattamenti sullo stato fitosanitario delle spighe.



Determinazione della colonizzazione da F.verticillioides e della contaminazione da fumonisine B₁ e B₂ della granella

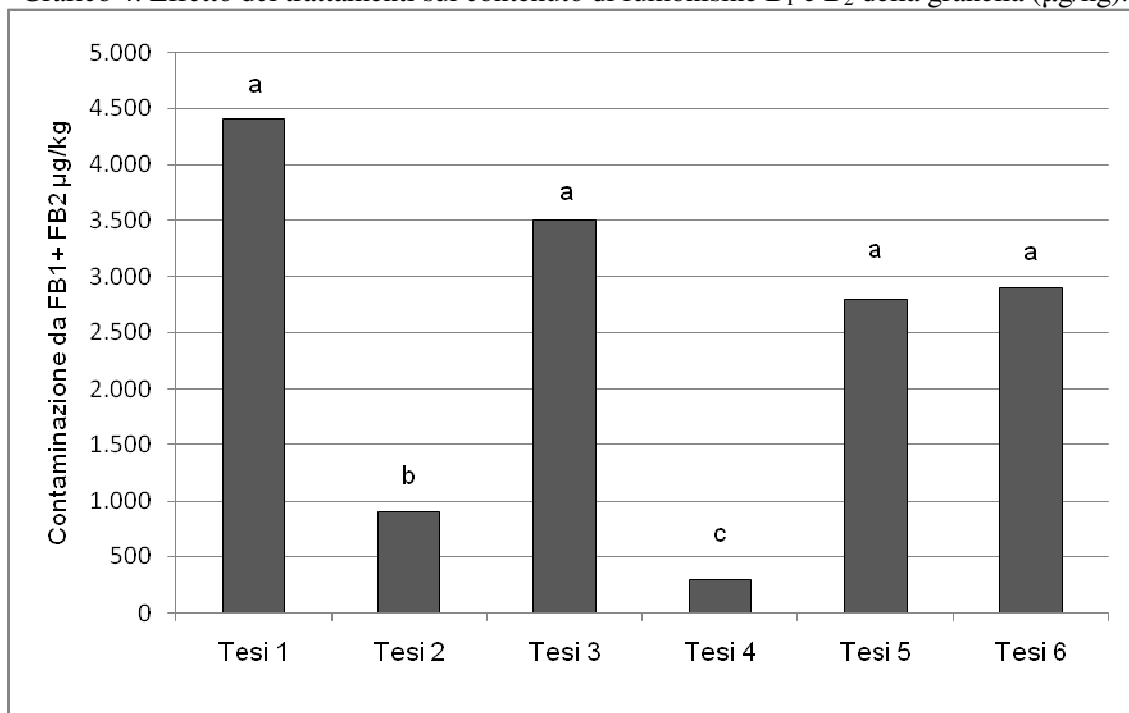
Dall'analisi micologica eseguita sulla granella, la presenza di *F. verticillioides* risulta significativamente minore, rispetto al testimone non trattato, solo nella tesi 2 e 4; nella tesi 2 si registra un abbattimento della carica del 36% mentre particolarmente marcato è l'effetto di contenimento registrato nella tesi 4 dove la riduzione supera il 90% (grafico 3). Analoghi risultati si hanno per quanto riguarda il contenuto di fumonisine (grafico 4); anche in questo caso i trattamenti più efficaci sono stati quello insetticida al picco di sfarfallamento (-80%) e quello fungicida effettuato sette giorni dopo la fioritura femminile (-93%). L'uso delle miscele, invece, ha evidenziato sempre una efficacia inferiore, con carica del patogeno mediamente inferiore del 30% rispetto al testimone non trattato e statisticamente non diversa da questo.

Grafico 3. Effetto dei trattamenti sulla colonizzazione da *F. verticillioides* della granella (Cfu/g).



Lettere diverse indicano differenze significative per $P < 0.05$

Grafico 4. Effetto dei trattamenti sul contenuto di fumonisine B₁ e B₂ della granella (µg/kg).



Lettere diverse indicano differenze significative per $P < 0.05$

4. Discussione e conclusioni

I risultati ottenuti, se pur da considerarsi preliminari poiché la prova è stata svolta in una unica località e per un solo anno, hanno permesso sia di ribadire l'importanza del trattamento contro la piralide, sia di confermare l'efficacia dell'esecuzione di trattamenti fungicidi effettuati alla fioritura femminile del mais. Entrambi questi interventi hanno consentito, in condizioni di pieno campo, su superfici ampie e con l'uso di macchine aziendali, di contenere la colonizzazione da parte *F. verticillioides* e la conseguente contaminazione da fumonisine B₁ e B₂ della granella di mais.

L'abbattimento del contenuto di fumonisine derivante dal controllo delle infestazioni di *O. nubilalis* è ben noto e documentato ed i dati raccolti nel corso della prova di cui qui si riferisce sono in pieno accordo con quanto ampiamente riportato in letteratura. In particolare emerge l'importanza di posizionare l'intervento in base al picco di sfarfallamento della seconda generazione (tesi 2), anche se questo, come è avvenuto nel nostro caso, si verifica nella seconda

decade di agosto, con grande ritardo rispetto all'andamento medio stagionale.

E' opinione comune che i benefici derivanti dal contenimento degli attacchi di Piralide siano dovuti ad una diminuzione delle lesioni da essa prodotte. In altre parole, le larve durante la loro attività trofica procurano l'apertura di soluzioni di continuità che *F. verticillioides* sfrutta per infettare la spiga; limitando il numero di tali lesioni diminuirebbe di conseguenza anche il danno provocato dal patogeno. Esaminando l'estensione dei marciumi della spiga in relazione all'entità dell'attacco di Piralide, si nota, però, che all'aumentare del numero di fori e larve, aumenta anche l'estensione dell'area interessata da marciume che si sviluppa in zone della spiga non lesionate. Ciò suggerisce una interessante ipotesi di lavoro a proposito del ruolo che il danno provocato dalla piralide può rivestire nel promuovere lo sviluppo del patogeno fungino. L'attacco di *O. nubilalis* potrebbe non essere limitato solamente a conseguenze di tipo meccanico che portano alla creazione di vie d'infezione per *F. verticillioides*, ma provocando modificazioni della fisiologia della pianta, stati di stress in particolare, potrebbe consentire lo sviluppo sintomatico del patogeno anche in cariossidi asintomatiche dove esso sia presente in forma endofitica. Oltre a ciò i medesimi stress, soprattutto se di tipo ossidativo, potrebbero stimolare la produzione di tossina da parte del micelio di *F. verticillioides*, fatto che è stato verificato in prove *in vitro* (Causin et. al, dati in via di pubblicazione). Ciò renderebbe conto del fatto che quantità non trascurabili di patogeno talvolta possono tradursi in contenuti limitati di fumonisina, come è parzialmente avvenuto nella tesi 2, dove a fronte di una sensibile diminuzione di micotossina non è stato rilevato un altrettanto marcato abbattimento della carica del patogeno.

Poco si sa, invece, sulle possibilità offerte in questo senso dalla lotta contro *F. verticillioides*. L'efficacia di quest'ultima strategia di intervento non è ancora ben indagata. Alcuni autori, riferendosi a prove realizzate in diverse aree maidicole della Francia, riportano che la distribuzione all'epoca della fioritura femminile di fungicidi in associazione agli insetticidi non da nessun vantaggio in più rispetto alla sola applicazione dell'insetticida, che comunque risulta efficace (Folcher *et al.*, 2009). Gli stessi autori, inoltre, affermano, sulla base di dati non riportati, che i

fungicidi usati da soli non danno alcun vantaggio nel contenimento dell'accumulo di fumonisine nella granella di mais. Risultati completamente diversi sono stati ottenuti in Italia, nel Nord-Est della Pianura Padana, dove è stato messo in evidenza come l'applicazione di fungicidi della famiglia degli azoli durante la fioritura del mais riduca sia il livello di colonizzazione di *F. verticillioides*, sia il contenuto di fumonisine della granella alla raccolta (Causin *et al.*, 2009).

Rispetto a quanto riferito da Folcher *et al.*, emergono anche altre discrepanze. Contrariamente da quanto affermano questi autori, in tutte le tesi dove si è impiegata una miscela di insetticida e fungicida non si sono registrate differenze statisticamente significative né nel livello di colonizzazione né di contaminazione rispetto a quelli registrati nel testimone non trattato. Ciò contrasta con quanto già esposto poiché nella tesi 3 (trattamento fungicida 7 giorni dopo la fioritura femminile associato al trattamento insetticida anticipato) ci si aspettava di registrare un livello di efficacia simile a quello della tesi 4 (trattamento fungicida eseguito 7 giorni dopo la fioritura) mentre nella tesi 6 (trattamento fungicida posticipato e controllo della piralide al picco di volo) ci si aspettava un livello di contenimento simile a quello registrato nella tesi 2 (trattamento insetticida al picco di volo), mentre diversità d'effetto erano attese con la distribuzione troppo anticipata dell'insetticida o troppo posticipata del fungicida (tesi 5).

Anche in questo caso, i dati raccolti consentono solo di formulare una ipotesi di lavoro ovvero si può solo supporre che nelle condizioni sperimentali in cui è stata svolta la prova ci sia stata un'azione di antagonismo tra insetticida e fungicida che ne abbia ridotto fortemente l'efficacia quando utilizzati in miscela. Ulteriori e più profonde indagini saranno necessarie per chiarire questo aspetto e per verificare la possibilità di associare in un unico intervento lotta insetticida e fungicida.

Pur con i limiti in precedenza ricordati, la sperimentazione svolta conferma comunque l'efficacia del trattamento fungicida, che nelle condizioni in cui si è eseguita la prova risulta addirittura avere un effetto migliore del trattamento contro la piralide. Ciò, però, oltre a necessitare di ulteriori verifiche, non deve proporre il trattamento fungicida come alternativa alla lotta contro la piralide,

ma deve, invece, favorire un corretto approccio integrato tra queste due pratiche e tutte le altre misure di prevenzione come le BPA che possono contrastare l'insorgere di stati di stress nella pianta che sempre più spesso vengono indicati tra i fattori scatenanti la contaminazione da micotossine della granella.

Bibliografia

- A.A.V.V. ,2006. Mais e sicurezza alimentare. Ed. Veneto Agricoltura, Sezione per l'innovazione e lo sviluppo rurale.
- Blandino M., Carnaroglio F., Reyneri A. 2008. Mais, il momento giusto per il controllo della piralide. Terra e Vita n. 24/2008.
- Causin R., Scopel C. e Rasera R. , 2009. Conoscere le vie infettive per combattere le fumonisine. L'informatore agrario. 15: 64-68.
- FDA, 2001. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 3:Aerobic Plate Count. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm063346.htm>
- Folcher L., Jarry M., Weissenberger A., Gerault F., Eychenne N., Delos M., Regnault-Roger C., 2009. Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with renard to corn borers and Fusarium mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. Crop Protection, 28: 302–308.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Oxford.
- Maiorano A., Reyneri A., Maffioli G., Ramponi C., 2007. Stima del «rischio fumonisine» nella granella di mais. L'informatore Agrario, 63 (7): 52-57.
- Miraglia e C. Brera, 2004. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Primo congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004.

- Munkvold G.P., 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 99-116.
- Pieta S., Pozzi T., Bonaiti E., Castagna R. 2003, Prove condotte nella pianura lombarda: esperienze di difesa chimica dalla piralide del mais. *Informatore Agrario*, 26 (6): 43-46.
- Pollini A., 2002. Tecniche di difesa dalla piralide del mais. *Informatore Agrario*, 25(3):38-42.
- Soriano, J.M., Dragacci, S., 2004. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International* 37 (10), 985–1000.
- Tealdo E., Barcarolo R., Gambetta S., Causin R., Rasera R., Bonini Baraldi A., Checchetto F., Padoan M., 2009. Esiti di un monitoraggio quinquennale sulla presenza di micotossine nei cereali del Veneto. Terzo congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 settembre 2009.

4.2 Strategie di controllo biologico

Sebbene i risultati ottenuti dall'applicazione di principi attivi di origine chimica sulle sete, 7gg dopo l'emissione delle infiorescenze femminili (sete), risultino molto promettenti poiché si sono rivelati in grado di contenere il livelli di contaminazione della granella al di sotto di quelli indicati nei limiti per l'uso alimentare umano (Reg. CE 1126/2007), l'impiego a breve termine di questo metodo di lotta diretto presenta alcune difficoltà.

Prima di tutto attualmente non esistono prodotti chimici registrati per questo tipo di impiego ed è noto quale sia l'ingente costo economico e impegno di risorse che richiede la registrazione dei principi attivi di origine chimica ed inoltre bisogna considerare l'impatto ecologico che avrebbe il loro impiego, che sebbene possa essere previsto all'interno di protocolli di lotta integrata volti a limitarne il più ragionevolmente possibile la distribuzione, riguarderebbe solo nel Veneto una superficie che si estende mediamente su 240.000 ettari.

In questo contesto l'utilizzo di strategie di controllo biologico per limitare la contaminazione da micotossine della granella di mais può essere un'altra interessante alternativa per affrontare la problematica. Strategie che si possono concretizzare nell'utilizzazione di uno o più organismi, inclusa la pianta ospite al fine di diminuire l'inoculo del un patogeno o la sua attività che determina uno scadimento quali-quantitativo delle produzioni.

Tra gli organismi potenzialmente impiegabili nella realizzazione di interventi di controllo biologico i funghi vanno considerati con particolare attenzione; essi, infatti, sono in grado di esercitare nei confronti dei patogeni molteplici azioni antagonistiche dirette, come l'iperparassitismo, l'antibiosi e la competizione, ma possono anche influenzare positivamente la resistenza dell'ospite ed il suo stato vegetativo, diminuendo l'entità dello stress e quindi l'incidenza delle malattie.

Tra gli agenti di controllo biologico (BCA) già caratterizzati per le loro capacità di esprimere dei meccanismi di controllo nei confronti di *F.verticillioides*, dopo una serie di prove preliminari di laboratorio, sono stati scelti:

***Trichoderma harzianum* ceppo KRL-AG2:** già conosciuto come T22 e base della preparazione fungicida per uso fitoterapico Rootschild (BioWorks Inc), di purezza minima 1×10^7 UFC per grammo di peso secco). Il genere *Trichoderma* è da anni conosciuto e impiegato come agente di controllo biologico contro molte malattie delle piante. All'interno del genere *Trichoderma* si possono identificare, tra le diverse specie e anche tra isolati, appartenenti alla medesima specie, individui capaci di esprimere strategie di controllo biologico molto differenti. Infatti oltre alle note capacità di iperparassitismo e antibiosi attraverso le quali isolati di *Trichoderma* sono in grado di inibire direttamente la crescita di molti agenti patogeni sono in grado di competere con gli altri organismi anche per gli essudati provenienti dal seme che stimolano la germinazione dei propaguli dei patogeni (Howell et al., 2002) e più in generale di competere per i nutrienti o per lo spazio (Elad, 1996). Recenti studi, inoltre, indicano che alcuni ceppi sono anche in grado di indurre resistenza sistemica e localizzata in piante appartenenti anche a famiglie molto diverse. In particolare alcuni ceppi di *Trichoderma harzianum*, ed in particolare il ceppo T22, creano dei rapporti di simbiosi con l'apparato radicale della pianta di mais colonizzandone attivamente la superficie delle radici per un lungo periodo pari a 8-10 settimane. L'azione di colonizzazione avviene tramite penetrare dei primi strati dell'epidermide della radice, azione che combinata con l'emissione di peptidi, proteine e composti di basso peso molecolare è in grado di indurre nella pianta dei meccanismi di resistenza sistemica che si è dimostrato essere in grado di controllare lo sviluppo di diversi patogeni tra essi anche di *F.verticillioides*.

***Acremonium zeae* ceppo NRRL 13540:**

A.zeae, come *F.verticillioides* in alcune fasi del suo ciclo biologico, è un fungo endofita del mais esso infatti ha la capacità di svilupparsi all'interno dei tessuti della pianta di mais senza interferire con i normali processi vegetativi di quest'ultima e senza quindi produrre sintomi di malattia. Studi recenti hanno messo in luce come alcuni isolati di questa specie, in particolare il ceppo NRRL 13540, siano capaci di sintetizzare sostanze ad azione antibiotica le pirrocidine A e B, che in prove

di laboratorio hanno dimostrato essere in grado di controllare lo sviluppo non solo di *F.verticillioides* e *Aspergillus flavus* ma anche di altri funghi patogeni del mais. Inoltre recentemente alcuni studi volti ad approfondire le conoscenze riguardanti l'azione delle pirrocidine hanno messo in luce che *A.zae* è in grado anche di sintetizzare cerebrosite, sostanza che ha dimostrato essere in grado di scatenare risposte di resistenza in numerose piante di interesse orticolo rendendole meno suscettibili all'attacco dei patogeni ed in particolare di quelli appartenenti al genere *Fusarium*.

Le prove sperimentali, di seguito riportate, hanno avuto lo scopo di verificare l'efficacia dell'utilizzo di *T. harzianum* ceppo T22 e *A. zae* ceppo nel contenere l'infezione e lo sviluppo di *F.verticillioides* nei tessuti della pianta di mais e di limitare il livello di contaminazione da fumonisine della granella alla raccolta, in prove di laboratorio, di serra e di campo.

***Trichoderma harzianum* strain T22 seed treatment effect on *Fusarium verticillioides* maize kernel colonization and fumonisin contamination.**

R. Causin¹, R. Rasera¹, D. Ferrigo¹, S. Bologna², G. Rossi³

¹Department of Land and Agroforest Environments - TESAF, section Plant Pathology, University of Padua. Viale dell'università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy.

²Consorzio Agrario Lombardo Veneto - Via Francia 2, 37135 Verona (VR), Italy.

³Cerealicola Rossi SRL – Via Martiri della Libertà 26, 26030 Gadesco Pieve Del Mona (CR), Italy.

Type of article: research article, proposed for publishing

Abstract:

In northern Italy the most frequently occurring class of mycotoxins in maize is fumonisin produced principally by *Fusarium verticillioides*. At the moment good agricultural practices (GAP) represent the only line of defence in controlling the contamination of maize by *Fusarium*-toxins. Because of the timing importance, annual fluctuation in weather can jeopardise GAP advantage so integration of indirect control strategy like GAP with direct control strategy as biological control can be the way to achieve a reliable control of *Fusaria* colonization and *Fusarium*-toxins contamination. *Trichoderma harzianum* strain T22 has been used as a biocontrol agent, because it expresses a wide range of control mechanism and induces systemic resistance in maize. Results of field trials (3 years in 2 sites) reveal that maize seed treatment with *T. harzianum* strain T22 is a good way to favour rhizosphere colonization associable with an effective and stable reduction of *F. verticillioides* kernel colonization (-70%) and fumonisin B₁ and B₂ contamination (-60%) .

Keywords: seed treatment, biological control, *Fusarium verticillioides*, fumonisin B₁ and B₂,

Trichoderma harzianum strain T22.

1. Introduction:

Cereal mycotoxin contamination is a worldwide serious problem for human and animal health. Maize products could be contaminated by different kind of mycotoxins. The most important are deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN), aflatoxins (AF), ocratoxin (OCRA) and fumonisins (FUM) produced by fungi belonging from different genera *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* (Placinta et al., 1999). In northern Italy, but also in other world regions, the most frequently occurring class of mycotoxins in maize are fumonisins (Wilke et al., 2007; Battilani et al., 2008). These toxins have been related to several animal disease such as equine leukoencephalomalacia (ELEM), porcine pulmonary edema (PPE), liver toxicity in many other animals. They are also reported as promoters of esophageal cancer and liver cancer in humans (Soriano and Dragacci, 2004). The main responsible of maize fumonisin contamination are *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg and in lesser amount *Fusarium proliferatum* (Matsushima). These fungi are also the most frequent isolated fungi in maize (Nelson, 1992; Logrieco et al., 2002) and while they can be isolated from symptomless kernel they are the main causal agents of pink ear rot and with other *Fusarium* species are grouped in the section *Liseola*. Because of the harmful effects associated with the presence of fumonisins the spreading of *F. verticillioides* infection has become an important area in food safety. Until now the application of good agricultural practices (GAP) represents the only line of defence usable in field to control *Fusarium*-toxins contamination in maize grain (Rac CE 583/2006). GAP are indirect control strategy point out to altering the conditions under which the crop grown to reduce environmental stresses promoting plant fitness. Because of the timing importance in GAP application the annual fluctuation in weather can jeopardise this advantage (Munkvold, 2003). Integration of indirect control strategy as GAP with direct control strategy based on the application of chemical product or biological control agent (BCA) can be the way to achieve a reliable control of *Fusaria* colonization and fumonisin

contamination in maize kernels. Between hundreds of known BCA, fungi in genus *Trichoderma* has been widely used as a biocontrol agent against many plant pathogens. Antagonistic properties of *Trichoderma* spp. have been known since the 1930s and there have been extensive efforts to use them for plant disease control since then (Weindling, 1932; Weindling, 1934). *Trichoderma* spp. express a wide range of biocontrol mechanisms: produce a wide range of antibiotic substances (Sivasithamparam and Ghisalberti, 1998) and parasitize other fungi (Chet et al., 1998). They can also compete with other microorganisms, mainly with soil microorganisms, for nutrients and/or space (Elad, 1996). In addition to the ability to affect the development of plant pathogens, recent studies state that *Trichoderma* spp. can also induce systemic and localized resistance in a variety of plants, controlling different pathogens (Howell et al., 2000; Koike et al., 2001, De Meyer et al., 1998; Lo et al., 2000; Yedidia et al., 2003). Particular interest has *Trichoderma harzianum* strain T22 (T22) (a.k.a. 1295-22, KRL-AG2 or ATCC 20847). It derives from protoplast fusion between *T. harzianum* T-95, a rhizosphere competent mutant, and *T. harzianum* T-12 capable of competing with spermosphere bacteria under iron-limiting condition (Harman, 2000, Sivan et Harman, 1991). The strain T22 establishes robust and long-lasting colonization of maize root surfaces. It penetrates into the epidermis and a few cells below this level and induces refusal of the colonization stimulating plant systemic resistance response (Morris et al., 1998; Harman, 2004a). There are different studies about *T. harzianum* maize interaction, but the effect of BCA seed treatment in controlling *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination in open field trials has not been clarified (Nayaka et al., 2008). Applying BCA to seed is an attractive proposition, because this technique has the potential to deliver agents in the right amount, at the right place and at the right time (McQuilken et al., 1998) and last but not least can be easily implement in the normal agricultural technique. The objectives of this research were as follows: 1 - determine if seed treatment is an effective way to favour

T22 maize rizosphere colonization; 2- if T22 root colonization has effect on *F.verticillioides* silk and kernel colonization and kernel fumonisin contamination.

2. Materials and methods:

Seed treatment

Non coated maize seeds of commercial maize hybrid Kermess (KWS, FAO 600) and commercial product Roothshield (10^7 CFU g⁻¹ propagules and conidia, Intrachem Italia - BioWorks, Inc., Geneva, NY) were put in sterile bags in ratio of 1g of commercial product for 10g of seeds and shaken for ten minutes. To promote adhesion of the commercial product to the seed, seeds were previously moistened by immersion for 5 min in sterile water. Inoculated seeds were placed on sterile paper towels and allowed to dry in a laminar flow hood. To check the effectiveness of the inoculation method, before sowing, a sample of 100 seeds was randomly chosen. Seeds were placed in 20 Petri dishes (Ø 90 mm), 5 seeds per plate, on Potato Dextrose Agar (PDA) added with streptomycin-sulphate (50 mg/l). The plates were incubated in the dark at 25°C. After 5 days kernels showing *Trichoderma* mycelia growth were counted. Identification of *Trichoderma* strains was performed to the species level according to macroscopic and microscopic characteristics as described in Bisset (1984a, 1984b, 1991a, 1991b).

Field trials

A three years open field trials were realized, as described in table 1, in two locations with two thesis (UN untreated and T1 seed treated with *T.harzianum* strain T22) arranged in a randomized complete block design with 3 replications of 300 m² each. Maize ears were harvested at a moisture of $25\pm 2\%$.

Sampling procedures

Sampling plans are reported in table 2. Sampling plants were randomly chosen and samples (roots, silks and ears) were put in sterile bag divided by repetition. Samples were transported as fast as possible to the laboratory and stored at $6^{\circ}\text{C}\pm 1$. Ears transported to the laboratory were completely shelled. Roots, silks and waxy kernels were processed within 24 hours after sampling. Maize kernels, at harvest time, were rapidly dried with a hot and dry air flow (50°C) to obtain a 10% final grain moisture and analyzed until 15 days from harvest.

Table1. Geographic and agronomic information about the experimental fields

Site	Year	Hybrid	Previous crop	Sowing date	N fertilization (kg ha^{-1})	Plant density (pt ha^{-1})	Irrigation	ECB control	Harvest date
1	2006	Kermess	Maize	10/04	280	60000	NO	NO	15/09
	2007	Kermess	Maize	15/04	260	60000	NO	NO	20/09
	2008	Kermess	Maize	20/04	300	60000	NO	NO	13/09
2	2006	Kermess	Wheat	28/03	250	70000	NO	NO	01/09
	2007	Kermess	Maize	31/03	276	70000	NO	NO	05/09
	2008	Kermess	Wheat	04/04	220	70000	NO	NO	29/08

Site1: Cremona, Central Po Plain($45^{\circ}08'36.27''\text{N}$; $10^{\circ}07'06.28''\text{E}$);

Site2: Rovigo, East Po Plain ($45^{\circ}01'14.96''\text{N}$; $11^{\circ}47'24.93''\text{E}$).

Table2. Sampling plans

Site	Year	10 days after maize emergence		Female flowering		Waxy stage		Harvest time	
		Sample	plants sample for repetition	Sample	plants sample for repetition	Sample	plants sample for repetition	Sample	plants sample for repetition
1	2006	-	-	-	-	-	-	ear	33
	2007	-	-	-	-	-	-	ear	33
	2008	-	-	-	-	-	-	ear	33
2	2006	root	10	root	10	-	-	ear	33
	2007	root	10	root, silk	10	ear	10	ear	33
	2008	root	10	root, silk	10	ear	10	ear	33

Isolation of fungi from roots

The roots were rinsed thoroughly with tap water and 100 fragments approximately 1 cm long was randomly chosen. Each fragment was longitudinally cut and placed in 20 Petri dishes (Ø 90 mm), 5 root fragments for plate, on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) and incubated in the dark at 25°C. After 5 days the number of fragment developing *Fusarium* and *Trichoderma* colonies was checked. Identification of isolated *Fusarium* was performed to the species level according to macroscopic and microscopic characteristics as described in Leslie et al. (2006). Identification of isolated *Trichoderma* was performed to the species as described above.

*Isolation and quantification of *F.verticillioides* on maize silk and kernel*

Silks, waxy kernels and mature kernels samples were milled with a laboratory knife mills, homogenized and reduced through the technique of quartering. As regards silks and waxy kernels only a 100g samples were conserved while mature kernel samples were divided in two 1kg sub-sample each. One sub-sample, stored frozen (-20°C) was used for toxin analyses and the other one was used for mycological analyses. Mycological analyses were performed with the serial dilution methods. Serial decimal dilution were done starting from 10⁻¹ to 10⁻⁶. For each dilution aliquot of 0,5 ml was spread on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) plate, five replicates for dilution were done. Plates were incubated 7 days at 25°C and total count and count per colony type was done. Colonies were isolated and purified. Fungal identification was performed as described above.

Influence of treatment on fumonisin B₁ and B₂ accumulation

Milled maize samples used for toxin analysis was stored at -20°C until determination. From each milled sub-sample, 20 g were used for fumonisin quantification. Total fumonisin content was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the method UNI EN 14352:2004. Acetonitrile:methanol:water (25:25:50, v/v/v) was utilized as extraction

solvent. Immuno-affinity columns (IAC) were used for the isolation of toxins after centrifugation, filtration and dilution steps. Derivatization of fumonisins was carried out with orthophthaldehyde (OPA) and toxins were detected with a fluorescence detector (λ_{ex} : 335 nm, λ_{em} : 440 nm). Isocratic mobile phase used was methanol:sodium dihydrogen phosphate buffer (NaH_2PO_4 0.1M), pH 3.35 (77:23, v/v) with a flow rate of 1 ml/min at 25°C. Recovery for FB_1 and FB_2 is 90%; LOD: $\text{FB}_1 = 94 \mu\text{g/kg}$, $\text{FB}_2 = 51 \mu\text{g/kg}$; LOQ: $\text{FB}_1 = 164 \mu\text{g/kg}$, $\text{FB}_2 = 74 \mu\text{g/kg}$.

Statistical analyses

Different statistical analyses were done according to the different characteristics of data collected. *T. harzianum* and *F. verticillioides* root fragment colonization frequencies were compared using confidence limits of the percentage for $p = 0,05$. Data belonging to the dilution method were analysed as described in the Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2001) and expressed as colony forming unit per gram of vegetal material (Cfu/g). Cfu/g and fumonisin concentration were analyzed by analysis of variance previously transformed, if needed, to $\log_{10}(x+1)$ to obtain the homogeneity of variance (Cavalieri et al., 2005). Means of population count and fumonisins contamination were compared using Tukey HSD test. The analysis were conducted using the software R version 2.10.0 (open source: <http://www.r-project.org>).

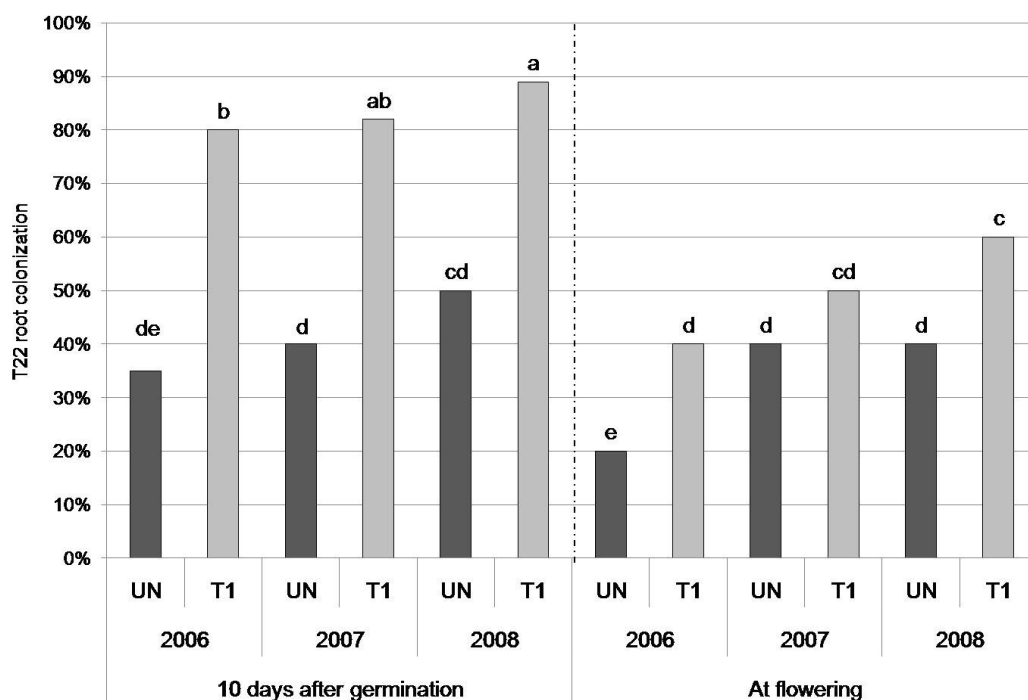
3. Results:

T. harzianum maize rhizosphere colonization effect on *F. verticillioides* silk and kernel colonization and on kernel fumonisin contamination

Seed treatment protocol results effective, 100% of tested seeds are colonize by *T. harzianum* and in plants becoming from treated seeds already ten days after germination is present an higher level of *T. harzianum* root colonization (fig.1). Colonization that decreases in treated thesis during the season (84% ten days after germination and 50% at flowering) remaining

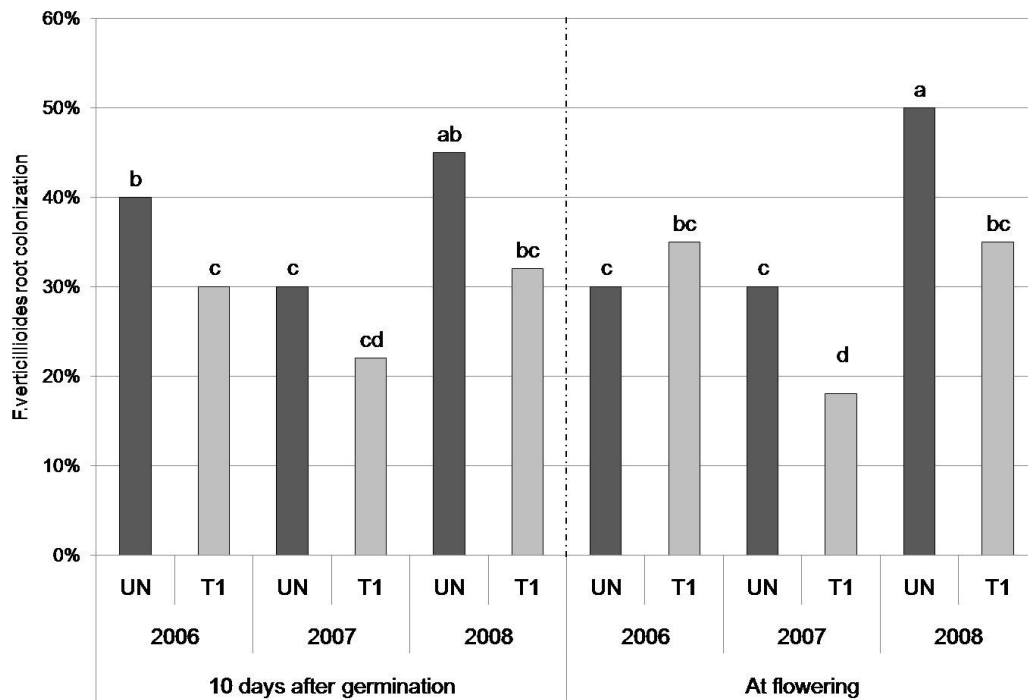
significantly higher respect the levels record in untreated thesis that result stable between the two sampling date (41% ten days after germination and 33% at flowering) (fig.1).

Fig.1 Effect of T22 seed treatment on *T.harzianum* root colonization in three different years. (T1: seed treated with T22, UN: untreated seed).Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,05.



In root samples from treated thesis is also possible to observe a reduction in *F.verticillioides* colonization levels (-28%) but the difference between the levels of colonization are statistically significant only in 2006 ten days after germination and at flowering in 2007 and 2008 (fig.2).

Fig.2 Effect of T22 seed treatment on *F.verticillioides* root colonization in three different years. (T1: seed treated with T22, UN: untreated). Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,05.



As shown in fig 3a and 4a silks and kernels becoming from treated thesis of the same trials present a lower level of *F. verticillioides* colonization contamination at different maize developing stage.

But while in silks 15 days after female flowering and in kernels at waxy stage the differences in *F. verticillioides* colonization between the thesis are statistically significant every years at harvest time differences in *F. verticillioides* colonization are statistically significant only in 2008 (-41%) (fig.3a and 3b) and in fumonisin contamination only in 2007 (-35%) (fig.4a and 4b).

Fig.3 *F. verticillioides* silk and kernel colonization (a) and B₁ and B₂ fumonisin contamination (b), year 2007 site 2. (T1: seed treated with T22, UN: untreated seed). Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,01.

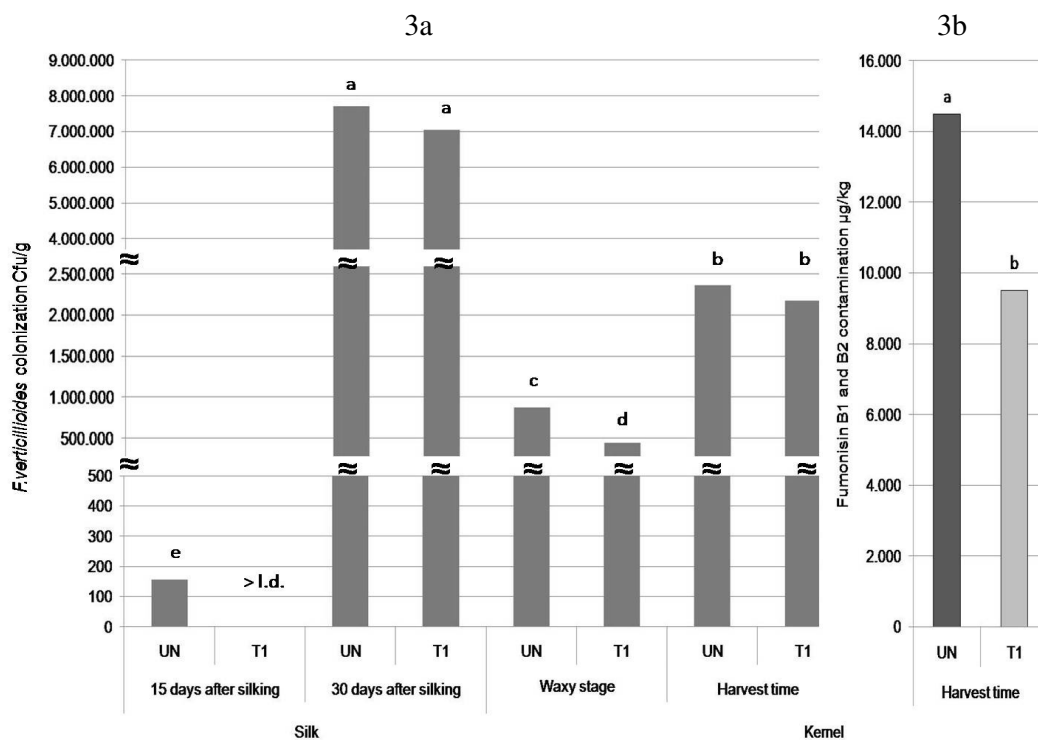
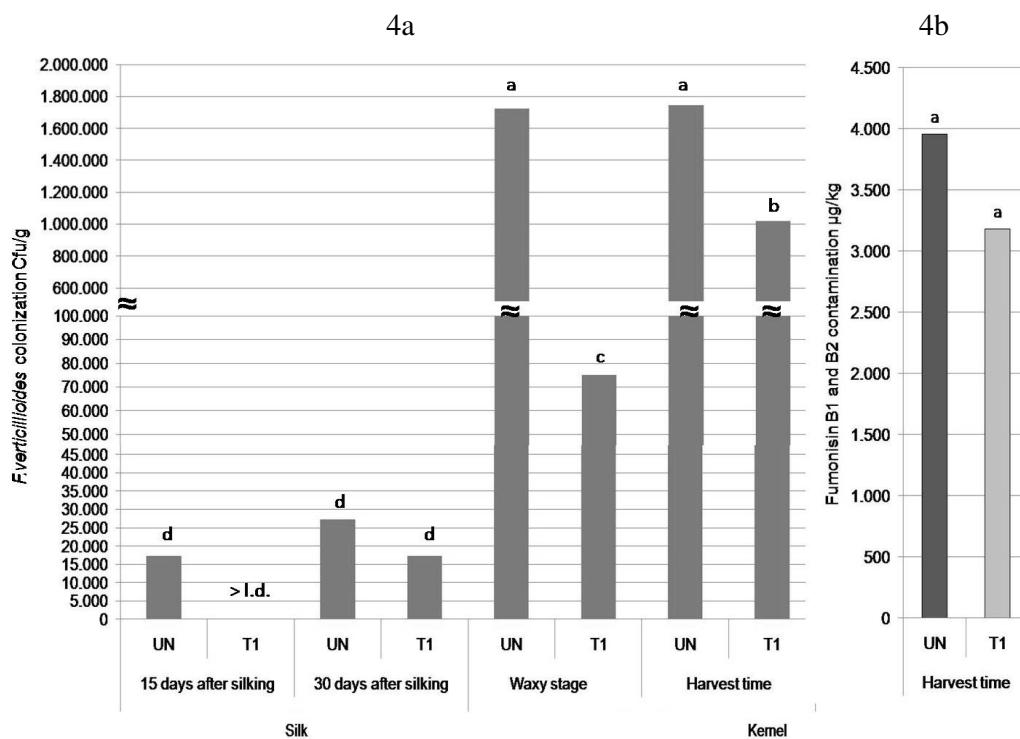


Fig.4 *F.verticillioides* silk and kernel colonization (a) and B₁ and B₂ fumonisin contamination (b), year 2008 site 2. (T1: seed treated with T22, UN: untreated seed). Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,01.



Efficacy and stability of T. harzianum root colonization in controlling F.verticillioides maize kernel colonization and fumonisin contamination.

T22 seed treatment reduces significantly both *F.verticillioides* kernel colonization (-70%) and fumonisin contamination (-60%) (fig 5). As shown in table 4 and 5 even if in treated thesis the levels of *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination result lower than in untreated ones, in different trials the recorded levels of colonization and contamination result different and not directly related each other. In 2008 in site 1 untreated thesis present the higher level of colonization and contamination but in 2007 in site 2 treated thesis characterized by the lowest level of colonization present a mean level of contamination 12.427 ppb (tab. 4 and 5). Statistical analyses of data reveal that *F.verticillioides* kernel colonization is significantly affected by the single factor (site, treatment, year) but also by the

interaction above the factors; the same is for the fumonisin contamination except for the interaction site*treatment that lack of statistically significance (tab.3). As the levels of *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination change between years and trials and are not directly related also the control effectiveness of the treatment. In 2008 in site 1 where, in untreated thesis, are observed the highest level of *F. verticillioides* colonization and fumonisin contamination, is recorded also the highest level of colonization reduction - 98% but not the highest level of contamination control that is recorded in site 2 in 2006 -88%.

Table 3. Analysis of variance results for *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin B₁ and B₂ contamination

	Df	<i>F.verticillioides</i> kernel colonization			Fumonisin B1 and B2 contamination		
		F value	Pr(>F)		F value	Pr(>F)	
Treatment	1	272.076	1.349e-14	***	146.8636	1.019e-11	***
Year	2	56.612	8.192e-10	***	31.2458	2.084e-07	***
Site	1	496.424	< 2.2e-16	***	16.8328	0.0004063	***
Site x treatment	1	377.791	3.421e-16	***	0.0289	0.8663279	
Site x year	2	239.939	< 2.2e-16	***	45.99420	6.160e-09	***
Treatment x year	2	302.672	< 2.2e-16	***	33.5832	1.108e-07	***
Site x treatment x year	2	53.142	1.527e-09	***	5.4485	0.0111963	*

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Table 4. Effect of seed treatment on *F.verticillioides* kernel colonization cfu/g (T1: seed treated with T22, UN: untreated seed).

	Site1			Site2		
	UN	T1	Reduction %	UN	T1	Reduction %
2006	29.6*10 ⁵ a	6.9*10 ⁵ b	77	7.6*10 ⁵ a	3.7*10 ⁵ b	50
2007	4.3*10 ⁵ a	0.8*10 ⁵ b	81	23.6*10 ⁵ a	21.8*10 ⁵ a	7
2008	77.9*10 ⁵ a	1.7*10 ⁵ b	98	17.5*10 ⁵ a	10.2*10 ⁵ a	41

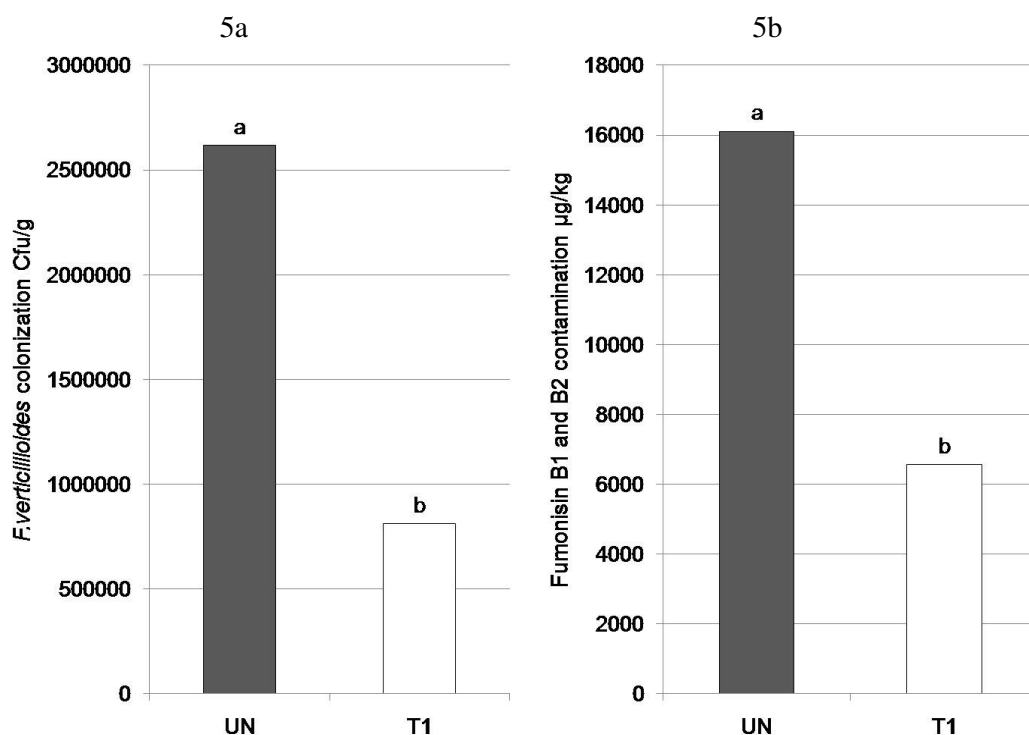
Means followed by a common letter are not significantly different per p=0,01

Table 5. Effect of seed treatment on fumonisin B₁ and B₂ kernel contamination µg/kg (T1: seed treated with T22, UN: untreated seed).

	Site1			Site2		
	UN	T1	Reduction %	UN	T1	Reduction %
2006	14488 a	2860 b	80	21600 a	2490 b	88
2007	19564 a	12427 b	36	14500 a	9500 b	34
2008	22526 a	8917 b	60	3957 a	3183 a	19

Means followed by a common letter are not significantly different per p=0,01

Fig.5 Effect of seed treatment on *F.verticillioides* kernel colonization (a) and fumonisin B₁ and B₂ kernel contamination (b), means of three years in two site. (T1: seed treated with T22, UN: untreated seed). Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,01.



4. Discussion and conclusion

T22 seed treatment augments significantly *T. harzianum* root colonization at least until flowering 3 month after sowing (fig.1). This long lasting root colonization is due to the expression of T22 rizhosphere-competence as already demonstrated by Harman and collaborators (2004) and Lo and collaborators (1996). Propagules of strain T22 carried on the seeds germinate and grown in contact with root developing along the root system of the maize plant. However, *T. harzianum* root colonization decreases during the period between maize germination and flowering. The reduction of root colonization at flowering (fig.1) can be due to the rapid root development (Girardin, 1999) and changing in water availability in the first 20cm of soil (Harman and Kubicek, 1998 b). During summer in Po Plain rainfalls become less frequent and higher evapo-transpiration causing a reduction of water availability in soil (ARPAV, 2009). Reduction of *T. harzianum* presence in maize root can be also due to the microbiological homeostasis typical of the soil that tends to report the BCA population density to the natural level recorded in untreated thesis (Nikitin and Kunc, 1988). Even if *T. harzianum* root colonization tends to decrease during the vegetative development of maize the effectiveness in controlling *F. verticillioides* maize root colonization doesn't change (fig.2).

As widely known *F. verticillioides* maize infection occurs through several ways, one of them is systemically. From soil through the roots or from infected seeds *F. verticillioides* colonizes the stalk and finally reaches the cob and kernels (Munkvold, 2003). Like the other pathways, frequency of systemic transmission varies widely among reports and among different environment conditions (Desjardins et al. 1998; Munkvold and Carlton, 1997), but it is common opinion that the relative importance of soil-borne and seed-borne inoculum as the cause of the *F. verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination seems to be of lesser importance (Munkvold, 2003, Causin et al, 2009). Recent studies conducted in the same areas where the present trials are realized confirmed the secondary importance of soil-

borne and seed-borne inoculum that causes only the 5% of the final colonization and 3% of final contamination (Causin et al., 2009). Therefore the reductions in kernel colonization and fumonisin contamination record at harvest in treated thesis cannot be related only to the control of this pathways, but to the control of silk and insect-assisted infection too (fig. 5a and 5b).

As shown in figures 3a and 4a, 15 days after flowering, in treated thesis in vital silks and in kernels at waxy stage a reduced level of *F.verticillioides* colonization is also present. In these situation rather than a direct interaction between *T. harzianum* strain T22 and *F. verticillioides*, the control effect could be due to the ability of T22 to induce systemic resistance (ISR) responses in plant. This ability was demonstrated in different species of plants against different pathogens (Howell et al., 2000; Howell et al., 2002; Koike et al.,2001, De Meyer, 1998; Lo, 2000; Yedidia, 2003; Nayaka et al., 2008; Sobowale et al., 2005) and in maize against *Colletotrichum graminicola* (Harman et al., 2004b). Recent studies report also the effectiveness of ISR-like response, induced by T22 in maize, in controlling *F. verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination (Ferrigo et al., 2010). Confirms that the recorded control activity is due to an induction of resistance are that the effectiveness is both spatially and temporally distant from the BCA point of application (Harman et al., 2004a; Harman, 2000) and that the control of *F.verticillioides* colonization lack in senescent silk sampled 30 days after flowering (fig. 3a and 4a). In fact, senescence processes result in the death of plant cell with a stop of cell defense activity and permit to *F. verticillioides* to colonized silks more rapidly as saprophyte (Bacon et al., 2009). Induction of ISR is an interesting control strategy to carry on, first of all protect the plants from *F. verticillioides* infections coming from different pathways and is effective for a long time more than chemical products. In this experiment the effectiveness of ISR control last from germination to harvest time reducing respectively root and kernel colonization (fig.2 and 5a).

Last but not least ISR can protect maize plant from the attack of pathogens other than *F. verticillioides*.

As whole, at harvest time, T22 seed treatment reduces significantly both *F. verticillioides* kernel colonization (-70%) and fumonisin contamination (-60%) (fig 5). But the effectiveness of treatment varies among different sites and years like *F. verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination (tab. 4 and 5). Data collect don't permit to understand completely this aspect, but some hypothesis can be formulate. Environmental condition outside and inside the maize plants as temperature, starch and water availability can change either during the season or between different years affecting differently *F. verticillioides* infection and colonization process and fumonisin synthesis (Bluhm and Woloshuk, 2005; Bush et al., 2004). This fact can motivate the partial disagreement between levels of fumonisins and incidences of infection record in the same thesis repeated in different sites and years. This disagreement can also due to the presence in *F. verticillioides* population of phenotypes very different in fumonisin production ability (Segvic and Pepeljnjak, 2003). According with Segvic and Pepeljnjak (2003) studies conduct to determine the frequency of *F. verticillioides* strains with high or low fumonisin synthesis ability in Veneto (north east of Italy) (data no shown) have demonstrated that the composition of population vary among different areas and different years. Environmental condition also affects plant fitness. Plants subjected to biotic stress as insect injuries (Repka, 1999, Kachroo et al., 2003, Zhou et al, 2004) or abiotic stress as mainly drought (Zhao et al., 2001; Apel et al., 2004; Torres and Dangl, 2005) result more susceptible to *F. verticillioides* colonization and the kernels result in a higher level of fumonisins contamination. But as widely known stresses affect also plant vitality becoming in a reduction of all the metabolic activity energy-cost as resistance response stimulating biochemical changes that involves the synthesis of reactive oxygen species (ROS) (Belozerskaya and Gessler, 2007). Recent in vitro studies demonstrate that, as

for other mycotoxigenic fungi *Aspergillus flavus* and *F. graminearum* (Reverberi *et al.*, 2007, Pont *et al.*, 2009) levels of ROS compatible with the ones present in maize plant augment fumonisin synthesis (Ferrigo *et al.*, in press). Environmental condition can also affect the fitness of the BCA. As said above water availability in soil affect root colonization, reasonably changes in environmental condition can impact the effectiveness of BCA in inducing resistance response, too.

Although the effectiveness of treatment vary among different sites and years mean result shown a significantly reduction both in *F.verticillioides* kernel colonization and in fumonisin contamination (tab. 4 and 5, fig. 5a and 5b). This results were obtained in trials set in geographic area with high disease pressure where neither irrigation nor ECB control were done predisposing maize plant to high stresses level. However, an enhance of T22 seed treatment control effectiveness is reasonably expected if the application of the biological control agent is used in an integrated control strategy where good agricultural practices (seeding time, fertilizing, choose of maize hybrid....) supported by a correct and effective control of European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*) reduce biotic and abiotic stress that affect maize plant vitality.

In conclusion T22 seed treatment is an attractive proposition for BCA distribution because this technique have the potential to deliver agents in the right amount, at the right place and at the right time (McQuilken *et al.*, 1998) resulting in an effective control of *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination and can be easily implement in the normal agricultural technique.

References

- Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55, 373-399.
- ARPAV, 2009. Irriweb Veneto. <http://irrigation.altavia.eu/LoginARPAV.aspx>
- Bacon C.W., Snook M. E., Mitchell T., Hiton D. M., 2009. Isolation and Characterization of Leu7-Surfactin from the Endophytic Bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a Biocontrol Agent for *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4287–4292
- Battilani, P., Barbano, C., Bertuzzi, T., Marocco, A., Pietri, A., Scandolara, A., Scudellari, D., 2008. Micotossine in Emilia-Romagna, risultati incoraggianti. *Informatore Agrario* 64 (15), 39-41.
- Belozerskaya T. A. and Gessler N. N., 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43, 506-515.
- Bisset J., 1984a. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. Nov. *Canadian Journal of Botany* 62:924-931
- Bisset J., 1984b. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany* 69:2418-2420
- Bisset J., 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69:2357-2372
- Bisset J., 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasidium*. *Canadian Journal of Botany* 69:2372-2417
- Bluhm B.H., Woloshuk C.P., 2005. Amylopectin Induces Fumonisin B₁ Production by *Fusarium verticillioides* During Colonization of Maize Kernels. *Molecular Plant-Microbe interactions* 18 (12): 1333-1339.

- Bush B. J., Carson M. L., Cubeta M. A., Hagler, W. M., Payne G. A., 2004. Infection and Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* in Developing Maize Kernels. *Phytopathology* 94 (1): 88-93.
- Causin R., Scopel C. e Rasera R. , 2009. Conoscere le vie infettive per combattere le fumonisine. *L'informatore agrario*. 15: 64-68.
- Cavaglieri L., Orlando J., Rodríguez M.I., Chulze S., EtcheverryM., 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156 (5-6): 748-754.
- Chet I., Benhamou N. and Haran S., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 2. Taylor and Francis, London.
- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. & Hofte, M., 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104, 279–286.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Lu, M., Caflin, J.E., 1998. Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production. *Plant Disease* 82, 953–958
- Elad, Y., 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European. Journal of Plant Pathology* 102, 719–732.
- FDA, 2001. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. Chapter 3:Aerobic Plate Count. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm063346.htm>
- Ferrigo D., Piccolo E., Scopel C., Rasera R., Causin R., 2010. *Trichoderma harzianum* strain T22 induces in maize systemic resistance against *Fusarium verticillioides*. In press.
- Girardin P., 1999. *Ecophysiologie du maïs*. Ed. AGPM, Montardon.

- Harman, G. E. and Kubicek C. P., 1998 a. *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 1. Taylor and Francis, London.
- Harman, G. E. and Kubicek C. P., 1998 b. *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Taylor and Francis, London.
- Harman, G. E., 2000. Myths and dogma of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease* 84 (4), 377-393.
- Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A. & Chen, J., 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94 (2), 147-153.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M., 2004a. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2, 43-56.
- Howell, C. R., 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92, 177–180.
- Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D. & Puckhaber, L. S, 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90, 248–252.
- Kachroo, A. He, Z., Patkar, R., Zhu, Q., Zhong, J., Li, D., Ronald, P., Lamb, C., Chattoo B.B. 2003 Induction of H₂O₂ in Transgenic Rice Leads to Cell Death and Enhanced Resistance to Both Bacterial and Fungal Pathogens. *Transgenic Research*. 12, 577-586.
- Koike, N., Hyakumachi, M., Kageyama, K., Tsuyumu, S., Doke, N., 2001. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. *European Journal of Plant Pathology* 107, 523–533.

- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Oxford.
- Lo, C.-T., Liao, T. F. & Deng, T. C., 2000. Induction of systemic resistance of cucumber to cucumber green mosaic virus by the root-colonizing *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 90 (Suppl.), S47.
- Lo, C.-T., Nelson, E. B., and Harman, G. E. 1996. Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 80:736-741.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Bottalico, A., 2002. Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108 (7), 597–609.
- McQuilkem, M.P., Halmer, P., Rhodes, D.J., 1998. Application of microorganism to seed. In: *Formulation of microbial biopesticides*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Morris, S. W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C. C., Frederiksen, R. A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S., and Uknes, S. 1998. Induced resistance responses in maize. *Molecular. Plant-Microbe Interaction* 11,643-658
- Munkvold G. P., 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705–713.
- Munkvold G. P., McGee D. C., Carlton W. M., 1997. Importance of Different Pathways for Maize Kernel Infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87 (2): 209-217.
- Munkvold GP, Carlton WM (1997) Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. *Plant Disease* 81: 211–216

- Nayaka, S. Chandra, Niranjana, S. R., Shankar, A.C. Uday, Raj, S. Niranjana, Reddy, M. S., Prakash, H. S. and Mortensen, C. N., 2008. Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Archives of Phytopathology And Plant Protection*, 1477-2906.
- Nelson, P.E., 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117 (1), 29–36.
- Nikitin D. I., Kunc, F., 1988. Structure of microbial soil associations and some mechanisms of their autoregulation. *Developments in Agricultural and Managed-Forest Ecology* 17, 157-190.
- Placinta, C.M., D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78 (1–2), 21–37.
- Ponts, N., Couedelo, C., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.N., Barreau, C., Richard-Forget, F. 2009. *Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent. *FEMS Microbiology Letters*. 293, 255 - 262
- Repka, V. 1999. Improved Histochemical Test for In Situ Detection of Hydrogen Peroxide in Cells Undergoing Oxidative Burst or Lignification. *Biologia Plantarum*. 42, 599-607.
- Reverberi, M., Punelli, M., Smith, C., Punelli, F., Zjalic, S., Ricelli, A., Payne, G., Fabbri, A.A., Fanelli, C. 2007. Cell redox balance, lipid metabolism and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus sect. flavi*. *Journal of Plant Pathology*. 89.
- Segvic M.; Pepeljnjak S., 2003. Distribution and fumonisin B₁ production capacity of *Fusarium moniliforme* isolated from corn in Croatia. *Periodicum biologorum* 105 (3): 275-279.
- Sivan, A., and Harman, G. E. 1991. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. *Journal General Microbiology* 137, 23-29.

- Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., 1998. In *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 1. Taylor and Francis, London.
- Sobowale A., A., Cardwell K., F., Odebode A., C., Bandyopadhyay R., Gbolagade S. J., 2005. Growth inhibition of *Fusarium verticillioides* by isolates of *Trichoderma pseudokoningii* strain from maize plant parts and its rhizosphere. *Journal of plant protection research*, 45 (4), 249-265.
- Soriano, J.M., Dragacci, S., 2004. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International* 37 (10), 985–1000.
- Torres, M.A. and Dangl, J.L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*. 8, 397-403.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22, 837-845.
- Weindling, R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* 24:1153-1179.
- Wilke A.L., Bronson C.R., Tomas A., Munkvold G.P., 2007. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Disease* 91 (9), 1109–1115.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I., 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12), 7343-7353.
- Zhao, Z., Chen, G., Zhang, C. 2001. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Australian Journal Plant Physiology*. 28, 1055–1061.

Zhou, F., Menke, F.L.H., Yoshioka, K., Moder, W., Shirano, Y., Klessig, D.F. 2004. High humidity suppresses *ssi4*-mediated cell death and disease resistance upstream of MAP kinase activation, H₂O₂ production and defense gene expression. *The Plant Journal* 39, 920–932.

Trichoderma harzianum* strain T22 induces in maize systemic resistance against *Fusarium verticillioides

Davide Ferrigo, Elisabetta Piccolo, Cristina Scopel, Riccardo Rasera, Roberto Causin*

T.E.S.A.F.– Department of Land Use and Agro-Forestry Systems – Plant Pathology,
University of Padova, Campus of Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro
(Padova).

Type of article: research article, proposed for publishing

Abstract

Fusarium verticillioides is one of the most common plant pathogen fungi affecting maize and the nearly totality of strains are able to produce fumonisins at very different levels. The *Trichoderma harzianum* T22 ability to induce resistance was verified in maize plant against the pathogen *F. verticillioides*. Plants grown from T22-treated seed had reduced symptoms following inoculation of stems with *Fusarium verticillioides*, which confirm that root colonization by T22 induces systemic resistance in maize. Enzymatic and transcriptional markers for ISR and SAR were surveyed and the kinetics of response of primed plants towards *F. verticillioides* were shown. Field trials evidenced once more the effectiveness of *Trichoderma harzianum* inoculation reducing both pathogen and fumonisins occurrences in maize kernels.

Keywords, *Trichoderma harzianum*; *Fusarium verticillioides*; biocontrol; maize; fumonisins; induced systemic resistance.

1.Introduction

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg (teleomorph: *Gibberella moniliformis* Wineland, = *G. fujikuroi* mating population A, sect. *Liseola*) is one of the most common plant pathogen fungi affecting maize (Leslie, 1991; Nelson, 1992; Sharma *et al.*, 1993) and the prevalent one isolated in Italian harvested maize (Rossi *et al.*, 2004). This pathogen can attack roots, stems and ear causing reductions in crop yields that can vary between 10% and 30%. Most of *F. verticillioides* infection come from infected seeds (Bacon *et al.* 1996), soil inoculum through roots colonization (Kedera *et al.*, 1992; Lumsden *et al.*, 1995), environmental damages (Wicklow *et al.*, 1988), corn borer lesions (Sobek *et al.*, 1999; Placinta *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2001), and silks (Munkvold *et al.*, 1997). Despite the inoculation pathways, the pathogen spreads to the whole plant and kernels before yielding. *F. verticillioides* colonization of maize kernels results in fumonisin B₁ (FB₁) and B₂ (FB₂) contamination. Surveys have indicated that fumonisins occur at biologically significant levels in maize and a variety of maize-based human foodstuffs and animal feed produced worldwide (Marasas *et al.*, 1995; Bolger *et al.*, 2001). FB₁ and FB₂ are the most common mycotoxins in maize kernels (Placinta *et al.*, 1999) having a notable impact on human and animal health (Logrieco *et al.*, 2002), they are toxic and known to cause pulmonary oedema in swine, encephalomalacia in horses (Prelusky *et al.*, 1994) and immunological disorder in ducks (Bennet *et al.*, 2003). Human exposure to *F. verticillioides* contaminated maize has been linked to elevated rates of oesophageal cancer and FB₁ itself has been evaluated by IARC as a Group 2B carcinogen "possibly carcinogen to humans" (Vainio *et al.*, 1993).

Maize is one of the most important cereal grown worldwide. Detection, prevention and control of the infections by *F. verticillioides* in maize are difficult, especially when infection remain at endophytical stage and kernels appear to be uninfected (Bacon *et al.*, 1995). All these evidences make necessary the identification of effective control strategies to *F.*

verticillioides infections in maize. To date, the principal strategies consisted in indirect control as Good Agriculture Practice or limitation of European corn borer occurrence in fields, however very few is known on the possibility to use agrochemicals or biological agents. The opportunities to employ fungicides against *F. verticillioides* has been referred by (Causin *et al.*, 2008; Folcher *et al.*, 2009), while potentiality of biological control are yet not well broaden (Cavaglieri *et al.*, 2005; Nayaka *et al.*, 2008; Nayaka *et al.*, 2009). Control by biological control agents (BCA) can be a promising strategy for managing seed-borne, soil-borne and foliar diseases in a wide range of crops and could be considered also to control fumonisin contamination in maize. An exciting perspective could be the resistance induction through seed treatments with BCA.

Trichoderma harzianum appears as one of the more promising BCA: it is able to colonize roots and compete for space and nutrient with plant-pathogenic fungi (Elad, 1996), it produces antifungal substances (Sivasithamparam *et al.*, 1998; Vinale *et al.*, 2008) and enhance plant growth improving nutrient uptake and the efficiency of nitrogen use (Yedidia *et al.*, 2001; Harman *et al.*, 2000; Harman *et al.*, 2004^a). Furthermore avirulent symbiotic interaction (Harman *et al.*, 2004^a) with releasing of elicitors (Woo *et al.*, 2006) and secondary metabolites auxin-like (Vinale *et al.*, 2008) can trigger, through jasmonic acid and ethylene signals pathway (Shoresh *et al.*, 2005; Djonović *et al.*, 2007), inducing systemic resistance (ISR) in more than 10 different dicots and monocots, including graminaceae, solanaceae, and cucurbitaceae to infection by fungi (*R. solani*, *B. cinerea*, *Colletotrichum spp.*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora spp.*, *Alternaria spp.*, etc.), bacteria (*Xanthomonas spp.*, *Pseudomonas syringae*, etc.), and even viruses (*Cucumber mosaic virus*) (Lumsden *et al.*, 1989; Zimand *et al.*, 1996; Mao *et al.*, 1998; Howell, 2002; Harman *et al.*, 2004^a; Chet *et al.*, 2006).

Among commercially available *Trichoderma* strains, T22 is the most useful, characterized by a good rhizosphere competence is able to colonize plants root in different type of soil and pH

(Harman and Björkman, 1998). Up to date, several works have been published about interaction between *T. harzianum*, maize and a variety of pathogens but *F. verticillioides* (Chen *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004^b; Rojo *et al.*, 2007; Shores and Harman, 2008) or about the effect of a range of BCA against *F. verticillioides* but *T. harzianum* (Bacon *et al.*, 2001; Cavaglieri *et al.*, 2005; Nayaka *et al.*, 2009) but very few has been investigated on *F. verticillioides*-maize-*T. harzianum* interactions and their dynamics (Sobowale *et al.*, 2007; Nayaka *et al.*, 2008). This work was conducted to determine 1) the ability of *T. harzianum* T22 to induce resistance in maize against *F. verticillioides*; 2) the involvement of two enzymatic activities and four molecular markers in induced resistance; 3) the ability of *T. harzianum* T22 to decrease endophytic *Fusarium* colonization in maize; 4) the effects of seed biopriming with *T. harzianum* T22 to decrease in field trials the *F. verticillioides* kernel colonization and the consequent fumonisin B1 and B2 content.

2. Materials and methods

Plant and fungal material

Subjects utilized in this work were *T. harzianum* Rifai strain T22, KERMESS hybrid maize and *F. verticillioides* strain 19 (*FvS19*). Uncoated Kermess (FAO 600 KWS) seeds were used in all experiments in the present work. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* T22 was carried out using commercial formulation (ROOTSHIELD[®] Intrachem Italia - BioWorks, Inc., Geneva, NY, USA) containing 10^7 CFU g⁻¹ (propagules and conidia) of that strain. *F. verticillioides* strain used in the present work was chosen after morphological identification (Leslie and Summerell, 2006), among some *Fusaria* strains isolated from maize kernels grown in North East of Italy. From these *F. verticillioides* isolates were obtained monoconidial cultures as reported by Tuite (Tuite, 1969). Monoconidial isolates were subcultured in PDB (Difco. Detroit, MI, USA) at 25°C for 7 days, mycelium was extracted

and genomic DNA used to molecular identification with primers VER1 and VER2 coding calmodulin (Mulè *et al.*, 2005). All the monoconidial strains were inoculated in maize plant, 15 days post inoculation the pathogenicity was assessed by measurement of necrotic areas and the strain 19 (*FvS19*) was selected as the most aggressive towards KERMESS hybrid.

Resistance induction assays

The effect of T22 in inducing resistance in maize was preliminarily studied in planta as reduction of necrotic lesions produced by *F. verticillioides* as a consequence of infection. Experiments were carried-out under gnotobiotic conditions: kernels were subjected to double treatment with surface disinfection in H₂O₂ 10% for 15 min and a heat treatment (65°C for 5 minutes) to remove both external and internal bacteria and fungi (Bacon *et al.*, 1994). Five seeds per pot (24 cm diameter) were sown in aseptic soil in separated and sterilized greenhouses box, and grown in standard conditions (25 ± 1°C, 16h photoperiod and 75 ± 5% RH). After 15 days, germinated seeds were inoculated with T22 and/or *FvS19* as briefly summarized in Table 1. T22 inoculation were performed with 50 ml per pot of 10⁶ CFU/ml conidial suspension. For each repetition, plant roots were analyzed to assess colonization by T22 and leaves were also analyzed to confirm absence of T22 inoculum. At the same time the inoculation with *FvS19* was carried out. A pocket-like lesion was produced in the stalks through a gentle cut, a 25 mm² mycelium plug of PDA actively colonized by *FvS19* was inserted in the pocket and lesions were protected with Parafilm (Pechiney Plastic Packaging Company, Inc. Chicago, ILL, USA). Control plants (T-F-) had the same treatment but the plug inserted was sterile. Fifteen days after pathogen challenging, plants were collected and the necrotic area of lesions was digitally calculated with Autocad[®] Autodesk after digitalization of areas. Disease areas were collected from 75 plant per thesis. The same experiment was carried out to comparison using as biocontrol agent *T. harzianum* strain T39

(TRICHODEX, Intrachem Italia - BioWorks, Inc., Geneva, NY, USA). Furthermore, to score each sample, we categorized the severity of symptoms in classes from 1 to 6, from “no yellowing” to “deep stalk necrosis” as reported in Fig. 2.

Table 1: Description of different treatments among the thesis.

Thesis	Treatments inoculation	
	To germinated seeds	To plants
T-F-	-	-
T-F+	-	<i>F. verticillioides</i> strain 19
T+F-	<i>T. harzianum</i> T22	-
T+F+	<i>T. harzianum</i> T22	<i>F. verticillioides</i> strain 19

Enzyme extraction and activity assays

For enzymatic assays seeds were grown and inoculated as previously described. After the inoculation of T22 and *FvS19*, roots and leaves were collected every 12 hours starting from 0 h to 84 hpi and stored at -80 °C until extraction and analysis. All reagents utilized in the following experiments were purchased by Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA). Crude enzymes for PAL activity were extracted from 0.5 g of fresh tissues in a potassium borate buffer 100 mM pH 8.8 added of β -mercaptoethanol 14 mM and then centrifuged for 35 min at 13000 g, 4°C. (Ke and Saltveit, 1986) To a substrate solution containing 950 μ l potassium borate buffer 100 mM and 0.2% L-phenylalanine, 50 μ l of crude extract were added and incubated at 35 °C for 30 min. The use of 50 μ l of HCl 5M stopped the enzymatic reaction. PAL activity was determined as formation from substrate of trans-cinnamic acid and monitored by spectrophotometer (Biomate 3, Thermo Scientific, Waltman, WA, USA) as the increase in absorbance at 290 nm. Amount of trans-cinnamic acid synthesized was calculated using molar extinction coefficient 9630 (Dickerson *et al.*, 1984; Shi *et al.*, 2007). Crude enzymes for LOX activity were extracted from 0.5 g of fresh tissues in a sodium phosphate buffer 50 mM pH 6.5 added to 1% PVPP, 1mM PMSF and then

centrifuged for 35 min at 13000 g, 4°C (Vieira *et al.*, 2001). The substrate solution with a 25 mM final concentration of linoleic acid was obtained by mixing 155 µl of pure linoleic acid, 157 µl of Tween-20 and 4.59 ml of deionized water (Anthon and Barret, 2001). To measure LOX activity, to 860 µl of a sodium phosphate buffer 50 mM, 40 µl of substrate solution and 100 µl of crude enzyme extract were added and incubated at 30°C for 5 min. The use of 0.2 M NaOH both stopped the enzymatic reaction and ensured the optical clarity. LOX activity was determined as formation of hydroperoxide was monitored as the increase in absorbance at 234 nm due to the presence of a conjugated hydroperoxydiene moiety (Gökmen *et al.*, 2002). The amount of hydroperoxydiene synthesized was calculated using its extinction coefficient of 23000 (Anthon and Barret, 2001). Enzymatic activity data were obtained from 5 samples of roots and leaves per thesis per hpi both for PAL and LOX.

Protein quantification

Protein determinations were carried out using the dye-binding method of Bradford (Bradford, 1976). To Bradford Reagent ,50 µl of crude extract in sodium phosphate buffer 50 mM pH 6.5 were added as described in manufacturer's instructions. A standard curve was constructed using BSA in the concentration range 5–25 µg/ml. The dye-binding was monitored as the increase in absorbance at 595 nm.

RNA isolation

To study the expression of defence related genes, plants inoculated and grown as previously described condition were harvested seven days after T22 treatment, at 0, 24, 48 and 72 hours from *FvS19* inoculation. Daily sampling and collection was chosen to limit effects of circadian rhythm on genes (Linthorst *et al.*, 1993; Epple *et al.*, 1995; Rogers *et al.*, 2005; Nemchenko *et al.*, 2006). Stalks were stored at -80 C° until extraction and analysis. Total

RNA was extracted using the Illustra Rna Mini Spin Kit (GE Healthcare. Chalfont St. Giles, UK) following the manufacturer instructions. Total RNA was extracted from 50 mg of maize stalks challenged with *FvS19*, quantified with a spectrophotometer (Biomate 3, Thermo Scientific, Waltman, WA, USA), and run on 1% agarose gel to check its integrity. Ten µg of total RNA were treated with 10 U of RQ1 RNase free DNase (Promega. Madison, WI, USA) and 2 Unit of RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (Promega. Madison, WI, USA) for 30 min, then purified by phenol–chloroform extraction and precipitated in isopropyl-alcohol as described by Sambrook (Sambrook and Russel, 2001). cDNA was synthesized from 2 µg of DNA-free total RNA using the Reverse Transcription System (Promega. Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

Real Time-PCR

One tenth of cDNA was used to optimize PCR amplification and primers efficiency. Sequences for gene-specific primer pairs for *ZmPal*, *ZmHpl* (Farag *et al.*, 2005) and *ZmLox10* (Nemchenko *et al.*, 2006) were obtained from previous work. Gene-specific primer pairs for *ZmGAPc* (Accession EU953063; forward 5'-CTG GTT TCT ACC GAC TTC CTT G-3' and reverse 5'-CGG CAT ACA CAA GCA GCA AC-3') and *ZmPr1* (Accession U82200; forward 5'-CTA GCA CCA CGA CAC CAA CA-3' and reverse 5'-ACA AAT CGC CTG CAT GGT-3') were designed using Primer3 v0.4.0 software available at <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> (Rozen and Skaletsky, 2000). Specific primers were checked with PerlPrimer software (available at <http://perlprimer.sourceforge.net/download.html>) to confirm absence of dimerization. *ZmGAPc* was used as internal control (Farag *et al.*, 2005). Reaction condition were optimized as follows: 40 cycles composed by 95°C for 15s, annealing for 30 sec, 72°C for 35 s. Annealing temperatures were 50°C for *ZmLox10*, 55° C for *ZmPr1*, 58°C for *ZmPal*, *ZmHpl* and *ZmGAPc*. A final extension step of 72°C for 4 min

was employed. All reactions were carried out in triplicate. The absence of dimer formation was checked in no-template samples by product dissociation analysis and electrophoretic separation in agarose gel. Transcript expressions were analyzed with ΔC_t (cycle threshold) method according to Pfaffl adaptation (Pfaffl, 2001) using Q-Gene software (Muller *et al.*, 2002). *ZmGAPc* was used as housekeeping gene to normalize raw expression data. The main parameters of primers used are listed in Table 2.

Table 2: Sequences and melting temperature of primer of surveyed genes and melting temperature of PCR products .

Primer	Sequence	T _m primer °C	T _m product °C
<i>ZmGAPc_F</i>	5'-CTG GTT TCT ACC GAC TTC CTT G-3'	66	84,2
<i>ZmGAPc_R</i>	5'-CGG CAT ACA CAA GCA GCA AC- 3'	66	
<i>ZmPal_F</i>	5'-CGA GGT CAA CTC CGT GAA CG- 3'	64	86,2
<i>ZmPal_R</i>	5'-GCT CTG CAC GTG GTT GGT GA-3'	64	
<i>ZmHpl_F</i>	5'-TAC GAG ATG CTG CGG ATG-3'	56	83,6
<i>ZmHpl_R</i>	5'-CTC GAA GTC GTC GTA GCG-3'	58	
<i>ZmLox10_F</i>	5'-ATC CTC AGC ATG CAT TAG TCC A-3'	64	75,8
<i>ZmLox10_R</i>	5'-AGT CTC AAA CGT GCCTCT T-3'	56	
<i>ZmPr1_F</i>	5'-CTA GCA CCA CGA CAC CAA CA- 3'	62	80,6
<i>ZmPr1_R</i>	5'-ACA AAT CGC CTG CAT GGT-3'	58	

DNA isolation and quantification of endophytic content

To analyze *F. verticillioides* endophytic content, maize seeds were only externally disinfected, sowed and grown as previously described. Seven days after T22 inoculation leaves were wounded with a toothpick previously submerged in 10⁸ CFU/ml *FvS19* conidial suspension (water and 0.01% Tween-20), to simulate European corn borer damage. At 15 dpi from pathogen inoculation, stalks were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. For analysis of endophytic content, 10 samples from 10 different plants per thesis were

processed. Genomic DNA from maize stalk was extracted using Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Absolute quantification was performed by Real Time-PCR using Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with primer coding *F. verticillioides* calmodulin gene VER1: 5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3' and VER2: 5'-AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3' (Mulè *et al.*, 2005). Real Time-PCR condition were optimized to 35 cycles with 95°C for 15s, 56°C for 50 sec, 72°C for 60 s. A final extension step of 72°C for 4 min was employed. Genomic DNA of *FvS19* was used to fit standard curve.

Field experiment

Commercial product ROOTSHIELD[®] and moistened seeds (30 min in sterile water) were put in sterile bags (in ratio of 1g of commercial product per 10g of seeds) and shaken for ten minutes. The treated seeds were placed on sterile paper towels and allowed to dry overnight in a laminar flow hood. The *T. harzianum* colonization was checked on a sample of 100 seeds placed (5 seeds per plate) on PDA plates (Difco, Detroit, MI, USA) added with streptomycin sulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA). The plates were incubated in the dark at 20°C. After 5 days the kernels showing *Trichoderma* mycelia growth were counted. After the seeds had dried they were sowed. The thesis were arranged in a complete randomized block designed with 3 replications (300 m² each). Ten days after germination and at silking, 30 maize plant from each thesis, 10 per replication, were uprooted and a samples of roots were collected. The roots were rinsed with tap water and 100 fragments for thesis were placed on PDA plates with streptomycin sulfate (5 fragments per plate) and incubated in the dark at 20°C; after 5 days fragments developing *Fusarium* or *Trichoderma* colonies were checked. Seven days after silking and at the end of female flowering, ten samples of silk per repetition were collected. At waxy and at harvest time, for each plot, 100 ears were collected by hand

and shelled. Silk and kernel samples were milled, homogenized and a serial dilution with sterile distilled water were made starting from 10^{-2} to 10^{-6} concentration. For every dilution, aliquots of 0,5 ml were spread on PDA plates (5 replicates per dilution). Plates were incubated 7 days at 25°C and total count and count per colony type were done. The colonies were isolated and subcultured for fungal species identification. *F. verticillioides* colonies were morphologically identified (Leslie and Summerell, 2006). Samples collected at harvest time were also analysed for fumonisin B1 and B2 content using certified HPLC methods (NEOTRON. Modena, Italy)

Statistical analysis

Data were analyzed using Statistica 6.0 software (StatSoft, Tulsa, USA) The normal distribution and homogeneity of variances were verified by performing the Wilk-Shapiro test and the Levene test, respectively. Excluding field trials, all biological experiments were conducted twice. Mean values for disease areas were analyzed by ANOVA test with $\alpha = 0.001$. Mean values for enzymatic activity and gene expression were analyzed by ANOVA test with $\alpha = 0.05$. For dynamic analysis of *Fusarium* spp. CFU in samples, dataset were compared to 95% confidence limits estimated for the mean. For field trials, the mean values for *F. verticillioides* presence and fumonisin content were analyzed by ANOVA test with $\alpha = 0.05$. Multiple mean values comparison were performed according to the Student–Newman–Keuls test.

3.Results

Effect of T22 on disease symptoms reduction

Maize plants were grown in greenhouse in sterile conditions to avoid microorganisms able to interfere with experiments. Sterile conditions were maintained also to prevent the cross-

contaminations during the inoculation steps, cultivation operations and sampling activities. As a consequence of inoculation, *T. harzianum* colonized 92% of root fragments belonging to plants of thesis T+F+ and T+F-, while it was not detectable in roots of uninoculated maize plants. A significant reduction of 65% in the size necrotic area was observed in T+F+ plants compared to the T-F+ ones (Fig. 1). The same result was obtained using *T. harzianum* T39 but with a lower reduction (59%) of the necrotic areas (Fig. 1). Severity of lesions produced by *FvS19* resulted strongly reduced in plant treated with T22 in comparison to those untreated with the BCA, the reduction for the higher severity classes was of 31%, 10% and 27% for classes 4, 5 and 6 respectively (Fig. 2)

Effects of T22 inoculation on F. verticillioides endophytic content

The endophytic presence of *F. verticillioides* in plants treated or less with T22 was quantified a quantitative Real-Time PCR from a sample containing total genomic maize DNA. The effect of T22 inoculation was remarkable on the endophytic content only in artificially infected plant (T+F+). In fact, these plants showed a 45% reduction of *F. verticillioides* DNA compared to the untreated ones. Furthermore, T22 treatment resulted in a reduction of 50% of *F. verticillioides* DNA in plants where only natural infection was present (T+F-) but for the high variability among replications these data lack of statistical significance. (Fig. 3)

Figure 1 Effect of T22 and T39 treatment on necrotic lesion by *FvS19*. The graph illustrates the mean lesion area (in mm²) in maize stalks, collected after 15 days from infection. The lighter gray corresponds to T22 treatment, the darker gray corresponds to T39 treatment. Each bar represent mean lesion area of 75 plants in two independent experiments with SE bar. From the left: *Trichoderma* uninoculated-*FvS19* infected (T-F+); *Trichoderma* inoculated-*FvS19* infected (T+F+); *Trichoderma* inoculated- *FvS19* uninfected (T-F-) and *Trichoderma* inoculated- *FvS19* uninfected (T+F-)

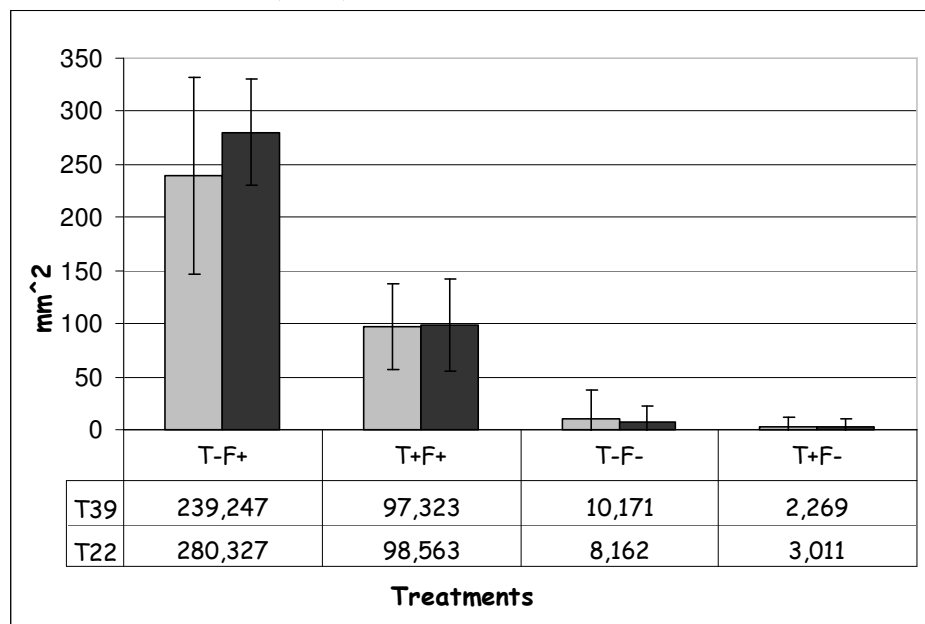


Figure 2: Effect of T22 treatment on severity of disease produced by *FvS19* on maize stalks in treated plants (**2a**: T+F+) and untreated (**2b**: T-F+). Lesions were classified according to severity of disease on necrotic areas. Class 1: “no yellowing”; Class 2: “Yellowing of inoculum site”; Class 3: “Localized necrosis of inoculum site”; Class 4: “Localized necrosis with aerial fungal mycelium”; Class 5: “Extended necrosis over inoculum site”; Class 6: “Extended necrosis to deeper tissues of stalk” The cake graphs illustrate the component of each class relative to treatment. **Left graph**: 19% Class 6; 39% Class 5; 35% Class 4 and 7% Class 3. **Right Graph**: 46% Class 6; 49% Class 5; 4% Class 4; 1% Class 3.

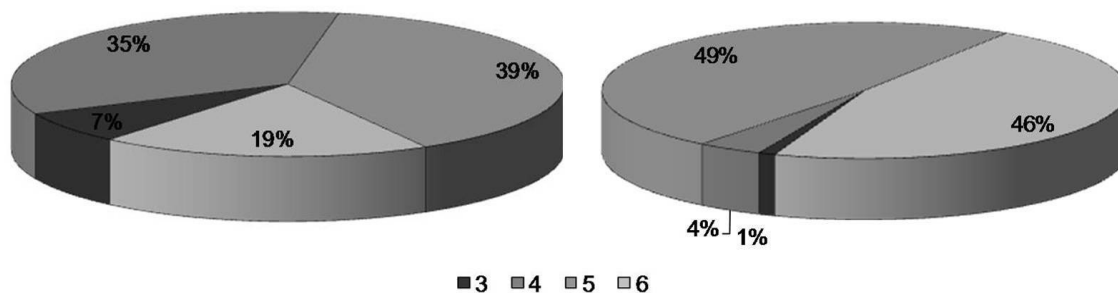
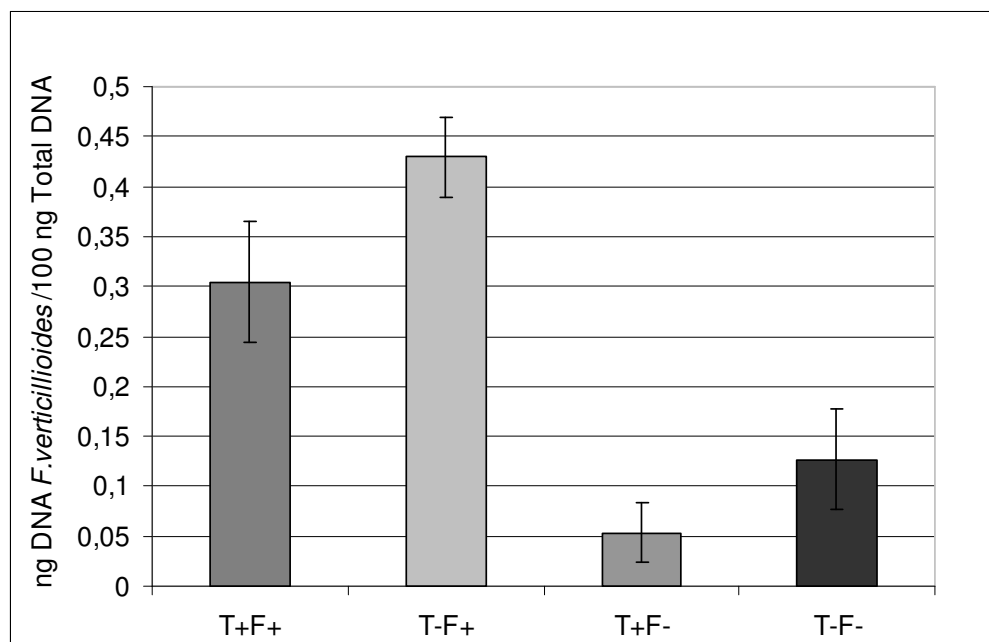


Figure 3: Endophytic content of *Fusarium verticillioides* on maize. Total DNA extracted from maize stalk were submitted to quantitative Real-Time PCR to quantify *F. verticillioides* endophytic contamination. T22 inoculation was performed on two-week-old maize plants, 15 days after, plants were infected with FvS19. Samples were collected from infection site. From the left: T22 inoculated-FvS19 infected (T+F+); T22 uninoculated-FvS19 infected (T-F+); T22 uninoculated- FvS19 infected (T+F-) and T22 uninoculated- FvS19 uninfected (T-F-)



Effects of T22 inoculation on PAL and LOX enzymatic activity in maize

The enzymatic activity of PAL and LOX in roots and leaves was quantified. In general we found in leaves, two-fold phenylalanine ammonia-lyase levels than in roots. Results showed that both in roots and leaves, the plants inoculated with T22 increased PAL activity at 36 hpi. In particular the T22-treated plants compared to the untreated ones, increased the PAL activity of 2.5 fold and 3 fold higher in roots and leaves respectively (Fig. 4a and 4b). In addition, although trend of PAL activity were higher in inoculated plants compared to non-inoculated ones, T22-treated plants were statistically different only at 36 hpi for roots and leaves and at 60 hpi in leaves. Regard to LOX enzyme, activity in leaves was detected as 4-fold higher compared to roots. Data analysis of LOX activity showed significance only for inoculated plants at 36 hpi in roots and from 48 to 60 hpi in leaves (Fig. 4c and 4d)

Effects of F. verticillioides infection and T22 inoculation on enzymatic activity in maize.

Maize plant inoculated with T22 and challenged with *FvS19* were collected to analyze enzymatic activity changes respect to *Trichoderma* inoculation and *F. verticillioides* infection. The PAL activity in roots was constant in non-infected plants, while decreased in *FvS19*-challenged plants since 12 hpi and rapidly raised up to highly significant amounts. At 60 hpi PAL activity in T+F+ plants resulted 1.5 fold higher compared to not inoculated T-F+ plants (Fig. 5a). In leaves, PAL activity trend was very similar to roots, with a reduction in infected plants that reached its minimum at 36 hpi before to rise up. At 48 hpi plants treated with T22 and *FvS19* showed a PAL activity of 1,5 to 2 fold higher compared to all others thesis (Fig. 5b). Quantification of lipoxygenase activity in roots gave data highly variable and no reliable consideration can be advanced, (data not shown), in leaves results were more clear and a trend very similar to PAL activity in leaves was observed (Fig. 5c).

Effects of F. verticillioides infection on resistance related gene expression in T22 primed maize

The expression of *ZmPal* and *ZmPRI* genes known as markers for acquired resistance and *ZmLox10* and *ZmHpl* genes known as markers for induced resistance, were examined in the four thesis listed in Table 1 (T-F-, T+F-, T-F+ and T+F+ plants). In Fig. 6 data were normalized according to T-F- values to remove physical damage component in gene expression. PAL transcript in T+F+ plants at 24 hpi seemed to be non-induced, anyway it increase rapidly since 48 hpi to surpass other thesis from 72 hpi. In particular, when T22 and *FvS19* separately colonized plants, effect of T22 on *ZmPal* expression resulted higher in those treated only with T22 rather than those infected only with pathogen. Further, in comparison to the respective enzyme, reduction of transcript in T+F+ at 24 hpi coincided with enzymatic results.

As far as it concern expression of *ZmPr1*, the plants inoculated with *FvS19* (T-F+ and T+F+) reported an increase of transcript over time. Also in plants primed with T22 (T+F-) it was possible to observe a slight increment in transcription fold, however at lower level compared to infected plants. Expression of *ZmLox10* showed a trend without large differences both overtime and among thesis. At 72 hpi this gene was expressed in the same way in plants primed or not with T22 and inoculated or not with *FvS19*. On the contrary, the expression of *ZmHpl* grown over time. The plants inoculated with the pathogen presented an induction stronger compared to the uninfected just from 24 hpi despite T22 treatment. The priming with T22 without *FvS19* inoculation resulted in a similar trend to other thesis but induction occurred 24 hours later. The highest values in *ZmHpl* gene expression was reached in T22 primed and pathogen infected (T+F+), in particular at 72 hpi the induction of *ZmHpl* in double treated plants (T+F+) was twice compared to the infected but unprimed thesis (T-F+). Finally, the confrontation among thesis at 72 hpi was highlighted to better explain resistance response in advanced infection. In *ZmPal* and *ZmHpl* expression the infection with *FvS19* brought in T22 primed plants (T+F+) an induction of 3-fold and 2-fold respectively in comparison to the uninoculated ones (T-F+). Further, while *ZmLox10* expression was comparable and not different between thesis, PR1 expression was stimulated above all by infection. In Figure 7 data were normalized by the highest value and expressed as arbitrary unit.

Figure 4: Enzymatic activity of phenylalanine ammonia lyase in roots (a) and leaves (b) of plants inoculated with T22. In graphs (c) and (d) LOX activity in roots and leaves respectively were showed. T22 inoculation was performed on two-week-old maize plants. Activity were surveyed each 12 h from 0 hpi (before T22 inoculation) to 84 hpi. Activity were measured as formation of product of enzymatic activity in nmol/mg protein per minute.

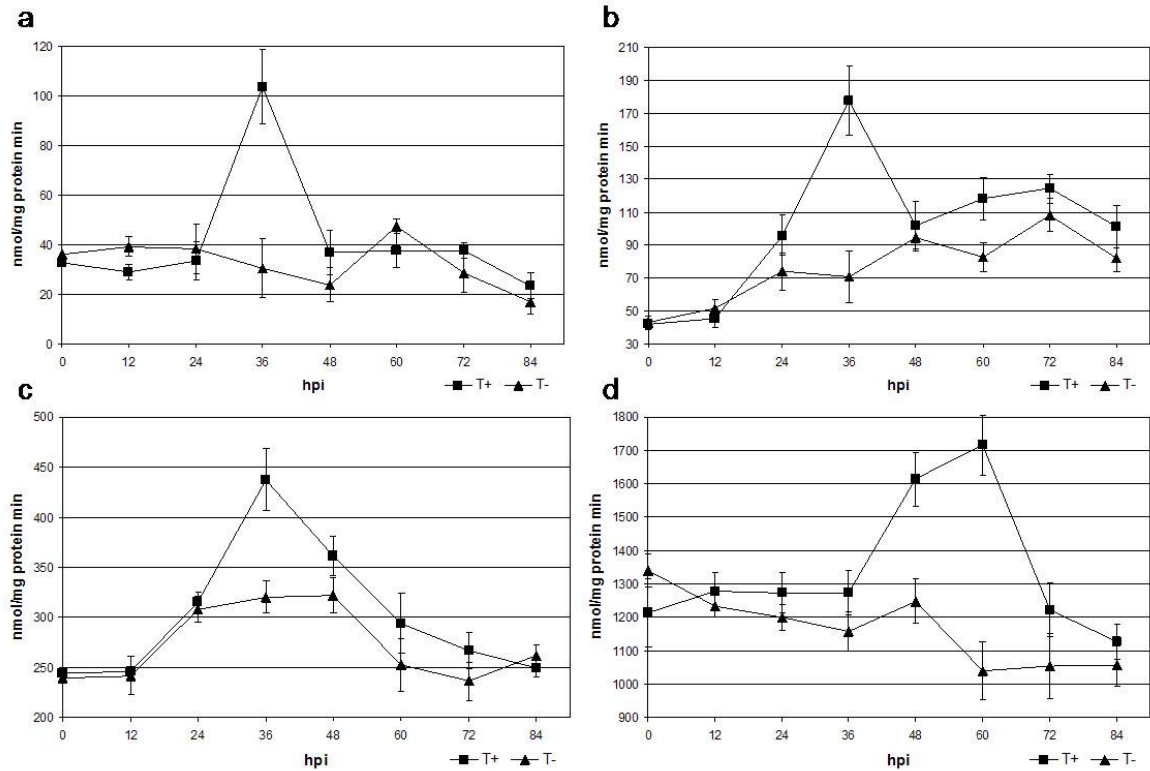


Figure 5: Enzymatic activity of lipoxygenase in roots (a) and leaves (b) of plants inoculated with T22 and infected with the pathogen FvS19. In graphs (c) LOX activity in leaves respectively was showed. T22 inoculation was performed on two-week-old maize plants, 15 days after, plants were infected with *FvS19*. Activity were surveyed each 12 h from 0 hpi (before pathogen challenge) to 84 hpi. Activity were measured as formation of product of enzymatic activity in nmol/mg protein per minute.

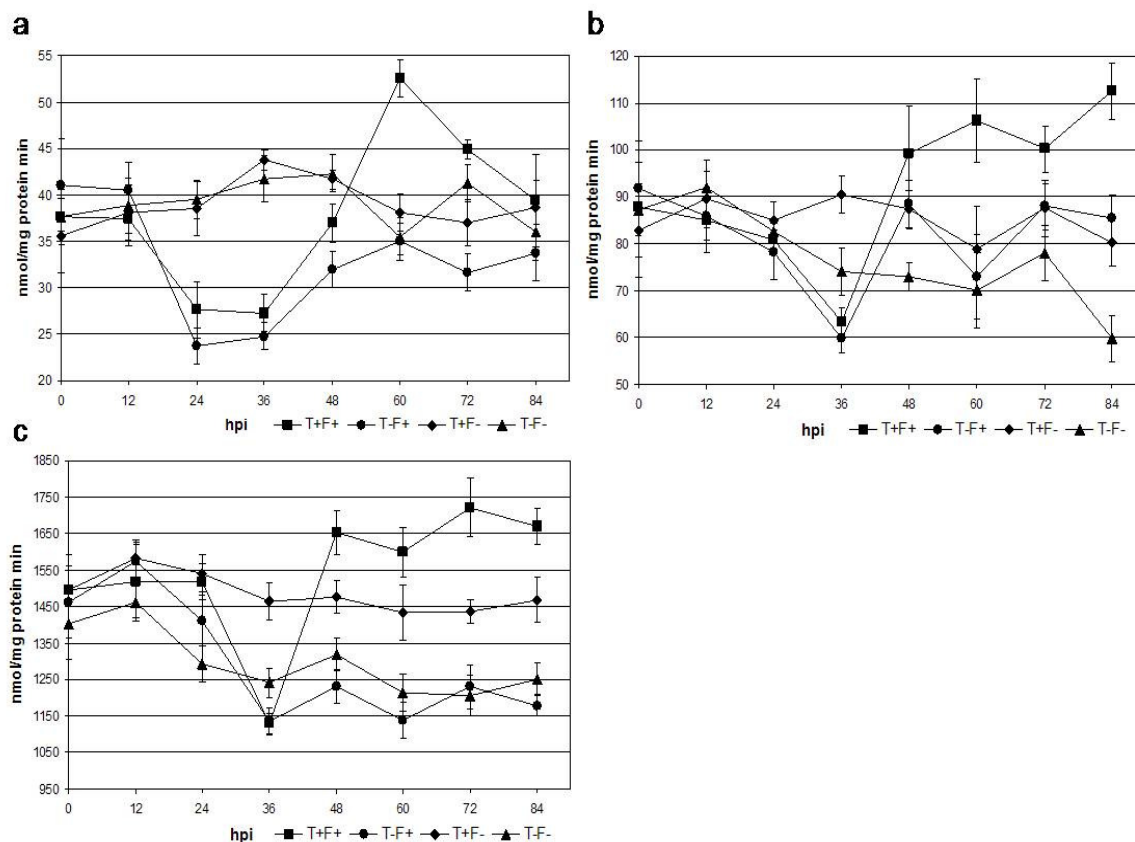


Figure 6: Expression of defence-related genes in plants induced by *T. harzianum* T22 and challenged with *F. verticillioides* strain 19. SAR related genes: (a) *ZmPal* and (b) *ZmPRI*. ISR related genes: (c) *ZmLOX10* and (d) *ZmHpl*. Expression of *ZmGapC* was used as reference gene expression. One week-old maize plants were inoculated with *T. harzianum* T22, after 7 days stalks were infected with *F. verticillioides* strain 19. Samples were collected from infection site each 12 h from 0 hpi (before pathogen challenge) to 72 hpi. Values are the average of two independent replica with SE bar.

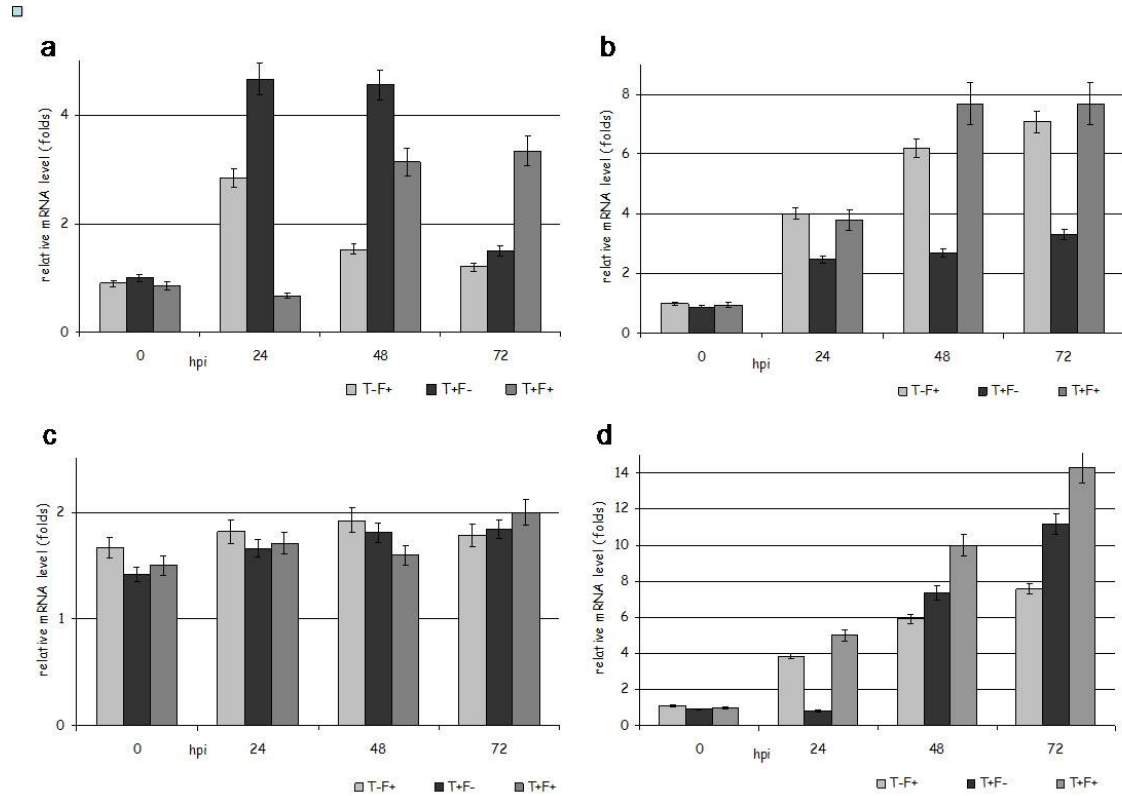
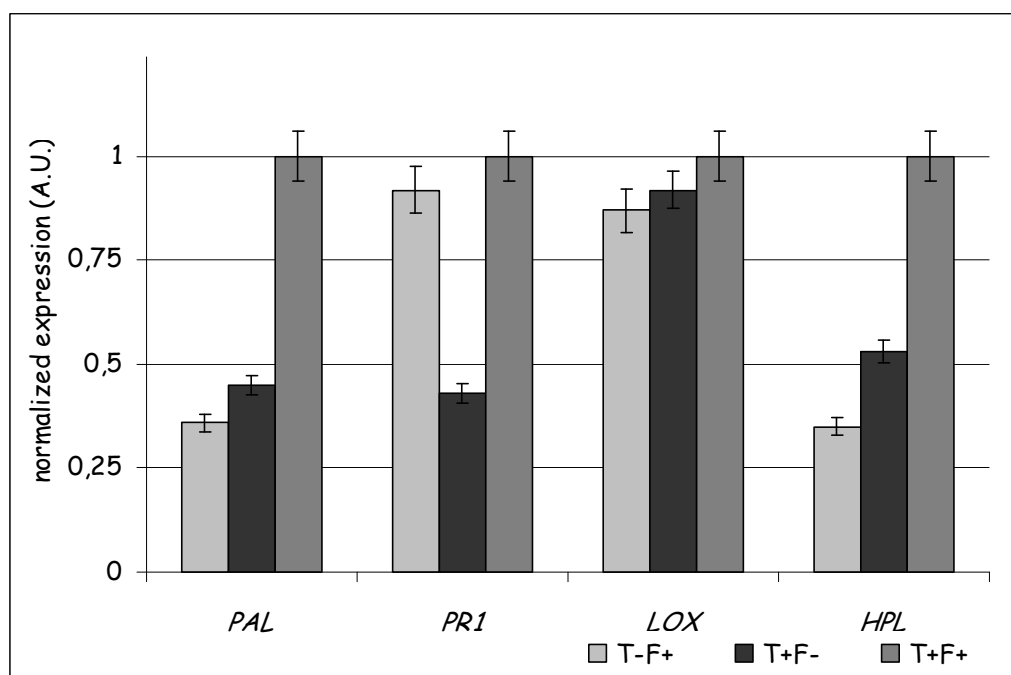


Figure 7: Expression of defence-related genes in plants induced by *T. harzianum* T22 and challenged with *F. verticillioides* strain 19 in advanced infection (72.hpi) SAR related genes: *ZmPal* and *ZmPR1*. ISR related genes: *ZmLOX10* and *ZmHpl*. Expression of *ZmGapC* was used as reference gene expression.



Effect of T22 seed treatment on F.verticillioides colonization and fumonisin contamination of maize kernels.

In preliminary assays carried out before sowing, treated seeds resulted 100% colonized by *T. harzianum*. Ten days after germination, 82% of maize roots belonging to T22 treated seeds were colonized by *Trichoderma* and 30% by *F.verticillioides* while in untreated plants, 22% of roots were colonized by *Trichoderma* and 40% by *F. verticillioides*. At silking in treated thesis, the roots colonized by *Trichoderma* were still higher than in untreated ones, 50% and 18% respectively while level of *F.verticillioides* root colonization remained stable (29% and 42%). Silks colonization by *F. verticillioides* seven days after silking was undetectable in treated thesis, while reached values of $\sim 10^2$ CFU at the end of flowering when the silks were senescent and the colonization levels were rather similar. During kernel ripening the treated

thesis were less colonized than the untreated ones, but at harvest time the levels were rather similar (Fig. 8). At the harvest time the fumonisin B1 and B2 contamination of kernels was higher in the untreated thesis compared to those primed with T22. (Fig. 9).

Figure 8: Graphic represent *F.verticillioides* colonization level as logarithm of CFU values. Samples were collected at the beginning of silking (7 days after) and at the end (30 days after), at the waxy stage and at the harvest time. *Fusarium verticillioides* CFU in treated sample 7 days after silk, were under detection limits. Bars are the 95% confidence limits estimated for the means.

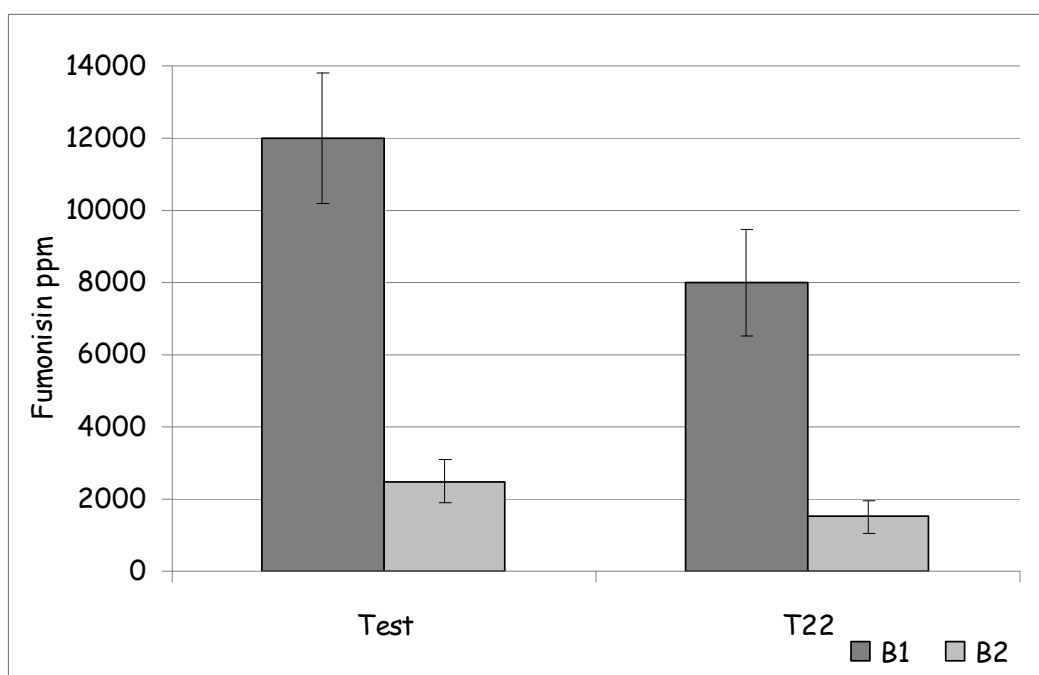
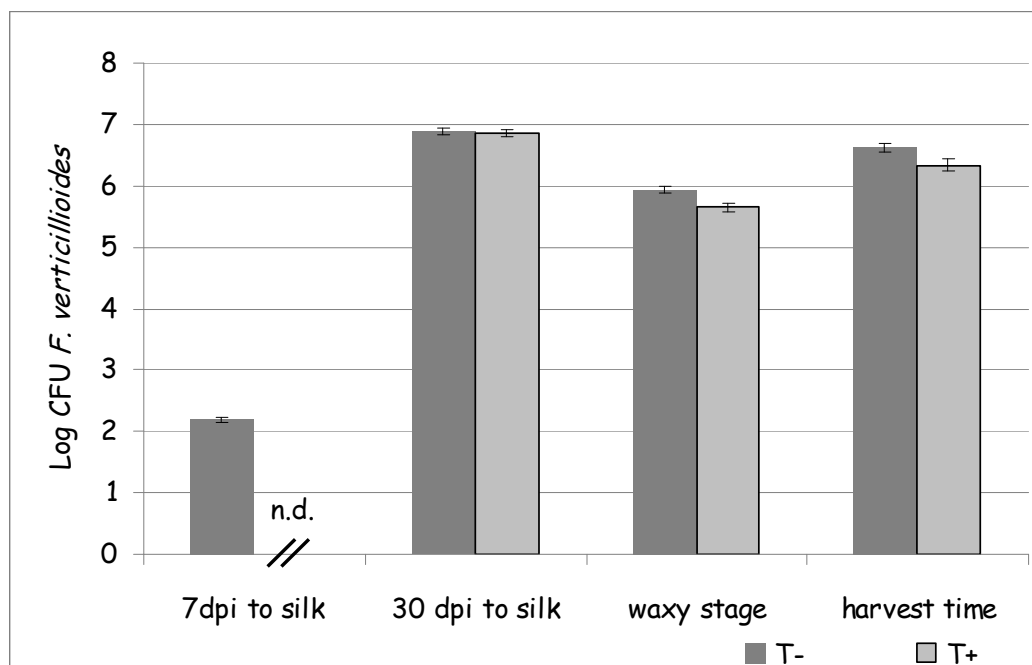


Figure 9: HPLC quantification of fumonisins content in kernels non-primed with T22 or primed. First bar (darker grey) for each histogram correspond to fumonisin B1 content, the latter bar (lighter grey) correspond to fumonisin B2 content. Values are the average of two independent replicates with SE bar.



4. Discussion and conclusions

Species belonging to genera *Trichoderma* are known to be able to induce a variety of beneficial responses in plants. Their efficacy vary from increasing in seed germination (Harman and Björkman, 1998) or leaf greenness (Harman and Dozelli 2001; Harman *et al.*, 2004^b) to improvement in nitrogen uptake and utilisation (Harman, 2000). Furthermore, some *Trichoderma spp* are proposed as potential biocontrol agents able to decrease plant pathogen infection by triggering systemic resistance (Harman *et al.*, 2004^a; Harman, 2006; Djonović *et al.*, 2007) or negatively affecting growth or penetration of the pathogen into plants (Elad *et al.*, 1999; Elad and Kapat, 1999). Once induced, plants may remain protected for a considerable part of their lifetime, indicating that when the resistance state has been triggered in the plant, it is rather stable (Van Loon *et al.*, 1998). Although fungi of genera *Trichoderma*

have been reported to induce resistance, this activity depends on different *Trichoderma* species and strains, pathogenic fungus and host plant. Defence reactions induced by one particular BCA strain can show a strong heterogeneity depending on plant species: the same BCA could have a strong effect against a pathogen infecting an host but it can lose this ability when used on a different host or against a different pathogen (Benhamou and Chet, 1996; Van Loon *et al.*, 1998). In dicotyledons ISR and SAR pathways are supported by several works carried out both in model plants and in cultivated ones, whereas the triggering of resistance in monocotyledons have not been well documented and not yet completely clarified (Yedidia *et al.*, 2003; Shores *et al.*, 2005).

In maize systemic resistance response may be triggered both by defence related signal as SA (Morris *et al.*, 1998) or by modulation of JA/ET-responsive genes, as reported by Djonović *et al.* (2007). Recent studies shown that SAR pathways can play (Gao *et al.*, 2006) or not (Djonović *et al.*, 2006) an important role in *Trichoderma spp.* mediated resistance, nonetheless, global expression profiling in many plant-pathogen interaction primed with *Trichoderma* revealed several crosstalk between ISR and SAR signalling pathway (Glazebrook *et al.*, 2003).

In our work the *T. harzianum* T22 ability to decrease the severity of symptoms of *F. verticillioides* disease in maize was investigated. In the experiment carried out to evaluate the ability of priming to induce resistance against this pathogen, the maize roots were primed with T22 and stalks were inoculated with *FvS19*. Roots of primed plant resulted well colonized by *Trichoderma*. In T22-primed plants, compared to the untreated ones, a significant abatement (65%) of surface extension of necrotic areas was observed. Protective effects of T22 can also be appreciable by the reduction of necrotic area depth. Compared to T22 primed plants, lesions in T22 non-inoculated ones were deeper and hosted actively growing mycelium. According to other authors (Harman *et al.*, 2004^b; Shores *et al.*, 2005,

Shoresh and Harman, 2008), the root colonization by *Trichoderma spp.* combined to its absence in shoots, evidenced that in the observed interactions among maize, T22 and FvS19 a resistance phenomenon could be involved.

This hypothesis was supported also by the effect of T22 root priming in lowering the endophytic *F. verticillioides* content in stem. *Trichoderma* treated plants presented a significant reduction (31%) of endophytic pathogen density in consequence of artificial inoculation. The asymptomatic plants instead, characterized only by natural *F. verticillioides* seed-borne inoculum, presented an highly variability in contamination values. Variability among data could be due to typically observed differences in *F. verticillioides* natural infections, but another interesting hypothesis could be done. *F. verticillioides* can colonize the maize both as pathogen and as endophyte (Schulz *et al.*, 1999), since resistance response depends to specificity among BCA, host and pathogen, changes of *F. verticillioides* behaviour from pathogenicity to endophytic state could led changes also in resistance responses. As demonstrated in *A. thaliana* (Pieterse *et al.*, 2001), ISR is related to enhanced sensitivity to precise signal molecules produced after infection, lacking of this kind of signals in endophytic *F. verticillioides* could unable plants to trigger systemic defence systems at effective level.

To verify the hypothesis that T22 can stimulate resistance phenomenon and considering that there is a strong maize genetic component in plant response to *Trichoderma spp* (Harman, 2006), two enzymatic markers known to be involved in systemic defence responses of plants, PAL and LOX, were surveyed. PAL and LOX are the first enzymes involved in biosynthesis of salicylic and jasmonic acid respectively. PAL is a key regulatory enzyme in SAR pathway and his expression is reported to be activated by JA/Et signalling pathway (Diallinas and Kanellis 1994; Kato *et al.*, 2000; Shoresh *et al.*, 2005). As the first enzyme in the phenylpropanoids pathway, PAL lead to the formation of several antimicrobial compound like phytoalexins (Hahlbrock and Scheel, 1989) and also it is the rate-limiting enzyme of lignin

formation (Li *et al.*, 1991). A further involvement of PAL in induced systemic resistance triggered by PGPF may be correlated to the deposition of phenolic compounds like lignin that reinforce the cell wall structure as evidenced in cucumber (Meera *et al.*, 1995; Koike *et al.*, 2001) and other plants (Saldajenom *et al.*, 2008). Lipoxygenases (LOX) belonging to the first step of biosynthetic signalling in ISR pathway. LOX are ubiquitous enzymes converting polyunsaturated fatty acids to 9- and 13-hydroperoxides. LOX biosynthetic pathway produce a large variety of metabolites involved in ISR signalling as jasmonic acid and oxylipins (Pieterse *et al.*, 2006) as well as other oxygenated fatty acids used as substrate by other enzymes as HPL.

In our experiments, application of T22 to maize roots gave a transient elevation of PAL activity in roots and leaves at 36 hpi. Elevated activity in leaves, where T22 was absent, was the evidence that signal was translocated from roots. Initially the activity in infected plants decreased despite T22 treatment, then the same rapidly increased with a positive and synergic effect of T22 priming and *FvS19* infection (T+F+) while the untreated plant risen to basal level (T-F+). In leaves, PAL behaviour was the same of roots except that the decrease appeared later, and the subsequent increase in T+F+ was stronger. Results on LOX activity showed that, in absence of pathogen infection, roots treatment with T22 induces an increase in LOX activity in roots and similar effects can be visible also in leaves. In plants infected with *FvS19* and primed with T22 (T+F+), a clear trend was noticed only in leaves where, as observed for PAL, following an initial decrement the activity of lipoxygenase incremented.

The observed increment in PAL and LOX activity induced by T22, agreed with results obtained in cucumber with *T. asperellum* T203 (Shoresh *et al.*, 2005). One point of disagreement compared to Shoresh's work was the initial decrease of PAL and LOX activity in maize plants infected by *F. verticillioides*, despite T22 priming. This result represent an anomalous instance compared to current knowledge (Kato *et al.*, 2000; Shoresh *et al.*, 2005)

that never reported such a decrement. A possible elucidation involves reactive oxygen species (ROS) that can be produced following the pathogenic infection. As reported in tomato, ROS formation promoted by low level of UV-C radiation induced a transient decrement both in PAL and LOX activity (Britt, 1995; Barka, 2001). However, our results on enzymatic activity in T22-maize-FvS19 interaction cannot be considered definitive and further analysis must be carried out to confirm and widen our surveys.

To better elucidate the effects of T22 maize priming in resistance response, transcription of *ZmPal* and *ZmPRI*, known as SAR markers, and *ZmLox10* and *ZmHpl*, known as ISR markers, were quantified.

Transcription analysis of *ZmPal* overlaps the results of PAL enzymatic activity; this enzyme in later phases of infection process appear to be stimulated in synergy by priming and infection, according to other authors (van Wees *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2000) that reported a *Pal* mRNA increment during pathogen infection resistance. Moreover, in maize primed with *T. virens* and infected by *Colletotrichum graminicola*, the consistent upregulated *ZmPal* expression suggested once more the strong importance of this gene in *Trichoderma* mediated defence responses in maize (Djonović *et al.*, 2007). While for *ZmPal* the kinetic of expression resulted relatively simple to argue, *ZmLox10* didn't show a clear transcriptional profile associable to resistance induction and pathogen infection. Lacking of response of *ZmLox10* to pathogen infection is apparently in contrast with Nemchenko *et al.* (2006) findings. These authors found that *ZmLox10* transcription, a 13-LOX, was induced in response to JA, SA, wounding and *Cochliobolus carbonum* infection suggesting that this gene play an important role in both systemic acquired and induced defence reactions. Our findings about lipoxygenase transcription fully agree Djonović *et al.* (2007) in maize and Gallou *et al.* (2009) on potato. These authors working on different plants primed with *Trichoderma* and infected by pathogen found that *Lox* expression was not different between treatments.

In our work we used a different pathogen, *F. verticillioides*, and this fungus could not induce *ZmLox10* transcription. This hypothesis was supported by the works of Gao *et al.* (2007; 2009) that found that the inactivation of *ZmLox3* increases maize susceptibility to *Aspergillus* infection, while disruption of the same gene enhances resistance towards *F. verticillioides* and decreases the fumonisin production. On the basis of that findings the authors suggested that LOX-governed host-pathogen interactions are pathogen-specific.

Discrepancy in our results between LOX enzymatic activity and *ZmLox10* transcription analysis, that didn't revealed the same dynamics, could be related to the large variety of subfamily in lipoxygenase enzymes or to yet unknown regulatory effectors. In fact while highly similar and clustered together different lipoxygenases may be induced by different “stimuli” (Majerana *et al.*, 2005), Weichert *et al.* (1999) working on a barley chloroplast-targeted 13-LOX reported its induction both by methyl jasmonate and SA and the same was reported by Nemchenko *et al.* (2006) in maize for *ZmLox10* transcription. This can be surprisingly since many papers reported that generally JA and SA act antagonistically in defence reactions (Pena-Cortes *et al.*, 1993; Feys and Parker, 2000; Cipollini *et al.*, 2004) but in monocot there is evidences suggesting that both ISR and SAR signal pathways simultaneously contributes to resistance mechanisms (Djonović *et al.*, 2007)

Known as ISR marker connected to LOX activity, hydroperoxide lyase (HPL) is part of the octadecanoic pathway and utilize some lipoxygenase products to produces antimicrobial and wound-related molecules. HPL products include several volatile C-6 aldehydes and alcohols called green leaf volatiles (GLVs). In defence responses to pathogens, GLVs are reported to act as signalling molecule (Bate and Rothstein, 1998; Matsui, 2006; Shiojiri *et al.*, 2006) and to have antifungal activity toward several microorganisms (Croft *et al.*, 1993; Nakamura and Hatanaka 2002; Prost *et al.*, 2005). Dynamics of transcript show that *ZmHpl* was more expressed in challenged plants and that the T22 priming was able to promote its transcription,

enhancing the resistance to pathogen. A similar observation on hydroperoxide lyase gene were reported also by other authors (Yedidia *et al.*, 2003; Djonović *et al.*, 2007; Choudhary *et al.*, 2008; Shah, 2009).

Transcripts analysis of *ZmPal*, *ZmLox10* and *ZmHpl* resulted overlapping Djonović 's data found in maize-*T. virens*-*C. graminicola* interaction. In agreement with this author it's possible to suggest that also in maize-*T. harzianum* T22-*F. verticillioides* a ISR-like resistance mechanism could be involved. This hypothesis was further confirmed by *ZmPRI* transcription analysis. PR proteins, known as SAR markers, are produced in leaves in response to a pathogen and are accumulated in the intercellular fluid. While in dicotyledonous PR proteins were induced by SA, in monocotyledonous PR genes can be promoted also by JA as seen by wounding, enzymatic and hormonal treatment in rice (Agrawal *et al.*, 2000). Moreover, also in dicot an overlapping activation of PR genes by MetJA was noticed as reported in tobacco and tomato (Ding *et al.*, 2002). PRs family in maize was well characterized and *ZmPRI* was found to be induced by SA (Morris *et al.*, 1998) and involved in maize resistance response towards *F. verticillioides* infection (Casacuberta *et al.*, 1992). In a further elucidation, Djonović *et al.* (2006) showed that in maize infected with *C. graminicola*, PR1 and PR5 level didn't change with or without *T. virens* treatment. Present work shows that, despite T22 treatments, infected plants showed an overexpression in *ZmPrI* compared to non-infected plants and then changes in *ZmPRI* expression can be related to *F. verticillioides* infection rather than T22 priming.

Our findings provide further evidences that the biocontrol agent *T. harzianum* T22 was able to induce resistance and decrease infection ratio in maize against *F. verticillioides*. We observed an activation of systemic resistance and, according to previous works, resistance was mediated by ISR pathway (De Meyer *et al.*, 1998; Shores *et al.*, 2005; Horst *et al.*, 2005; Ruocco *et al.*, 2007; Di Stefano *et al.*, 2008). Dynamics of gene expression suggest that the

early resistance response provided an effective defence since the second day post infection, as previously reported in cucumber by application of *T. harzianum* and *T. asperellum* (Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2003). The quickness of resistance activation against *F. verticillioides* could be useful also in field cultivation, but not evergreenhouse results can be applied to standard farming condition, so open field tests were carried out.

The well known ability of T22 to colonize maize rhizosphere (Harman *et al.*, 2004) was confirmed also in fields' condition. The effect of T22 on roots resulted in a decrement of colonization by *F. verticillioides* both in roots, silks and kernels of treated plants compared to the untreated. Only in senescent silks the abatement of inoculum was not detected, in fact senescent silks are reasonably not viable and thus defence reactions were not present. The decrement of *F. verticillioides* presence reflected on fumonisin content in kernels; T22 primed plants compared to the untreated ones showed lower 40% less concentration for both FB1 and FB2. Although this decrement could be explained with the reduction of pathogen inoculum, it is well known that plant stresses can enhance fumonisin accumulation (Bacon *et al.*, 1994; Bacon *et al.*, 2001; Yates *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2006), therefore also the ability of *Trichoderma spp.* to mitigate the effects of biotic and abiotic stresses, (Dana *et al.*, 2006; Montero Barrientos *et al.*, 2008; Shores and Harman, 2008; Bae *et al.*, 2009), could be involved in lowering fumonisin concentration.

At our best knowledge, this is the first work investigating the temporal dynamics of early activity of defence enzyme and the expression gene responses in maize challenged by *F. verticillioides* in presence of *T. harzianum* T22. Seed biopriming with *T. harzianum* was demonstrated to be interesting due to low environmental impact, low doses needed to seed treatments and the possibility to readily enhance this practice with integrated strategies of fumonisin biocontrol. Our results demonstrate that in maize T22 confers resistance against *F.*

verticillioides and this ability can be useful exploited in field to control of fumonisins accumulation cultivated in operative farm conditions.

References

- Abbas, H.K., Cartwright, R.D., Xie, W., Shier W.T.. 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Protection*. 25, 1-9
- Agrawal G.K., Jwa N.S., Rakwal R. 2000. A Novel Rice (*Oryza sativa* L.) Acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochemical and Biophysical*. 274, 157-165.
- Anthon G.E. and Barrett D.M. 2001. Colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 32–37.
- Bacon C.W., Hinton D.M., Richardson M.D. 1994. A corn seedling assay for resistance to *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease*. 78, 302-305 .
- Bacon W. and Hinton D. M. 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Canadian Journal of Botany*. 74, 1195–1202.
- Bacon C.W., Yates I.E., Hinton D.M., Filmore M. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in Maize. *Environmental Health Perspectives*. 109, 325-332.
- Bae H., Sicher R.C., Kim M.S., Kim S.H., Strem M.D., Melnick R.L., Bailey B.A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*. 60, 3279–3295.
- Barka E.A. 2001. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28, 785–791.

- Bate N.J., Rothstein S.J. 1998. C-6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant Journal*. 16, 561–69.
- Benhamou N. and Chet I. 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*, ultrastructural and cytochemicals aspects of the interaction. *Phytopathology*. 86, 405-416.
- Bennett J.W.; Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497-516.
- Bolger M., Coker R.D., Dinovi M., Gaylor D., Gelderblom M.O., Paster N., Riley R.T., Shephard G., Speijers J.A. 2001. Fumonisin safety evaluation of certain mycotoxins in food and agriculture organization of the United Nations. World Health Organization Food Additives. 47, 103– 279.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Britt A.B. 1995. Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiology*. 108, 891-896.
- Casacuberta J.M., 2, Raventós D., Puigdoménech P., San Segundo B. 1992. Expression of the gene encoding the PR-like protein PRms in germinating maize embryos. *Molecular and General Genetics*. 234, 97-104.
- Causin, R., Costa, E., Rasera, R., Rossi, G., Scopel C. 2008. Chemical treatments at silk stage reduce fumonisin contamination of maize kernels. “The World Mycotoxin Forum – the Fifth Conference - The international networking conference for the food and feed industry”. 124.
- Cavaglieri L., Orlando J., Rodríguez M.I., Chulze S., Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*. 156, 748-754.

- Chen J., Harman G.E., Comis A., Cheng G. 2004. Proteins related to the biocontrol of *Pythium* damping-off in maize with *Trichoderma harzianum* Rifai. *Journal of Integrative Plant Biology* 47, 988-997.
- Chet I., Viterbo A., Brotman Y. 2006. Enhancement of plant disease resistance by the biocontrol agent *Trichoderma*. Life Science Open Day. Weizmann Institute of Science.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N., Prakash, A. 2008. Volatiles as priming agents that initiate plant growth and defence responses. *CURRENT SCIENCE*. 94, 595-604.
- Cipollini D., Enright S., Traw M.B., Bergelson J. 2004. Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Spodoptera exigua*. *Molecular Ecology*. 13, 1643–1653.
- Croft K.P.C., Juttner F., Slusarenko A.J. 1993 Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *PLANT PHYSIOLOGY*. 101, 13-24.
- Dana, M.M., Pintor-Toro, J.A., Cubero, B. 2006. Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Chitinases of Fungal Origin Show Enhanced Resistance to Biotic and Abiotic Stress Agents. *Plant Physiology*. 142, 722-730
- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., Höfte, M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 104, 279-286
- Diallinas G. and Kanellis A.K. 1994. A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit, cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Molecular Biology*. 26, 473-479.
- Dickerson D.P., Pascholati S.F., Hagerman A.E., Butler L.G., Nicholson R.L. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate, CoA ligase in maize mesocotyls

- inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiology Plant Pathology*. 25, 111-123.
- Ding C.K., Wang C., Gross K.C., Smith D.L. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*. 214, 895-901.
- Distefano, G., La Malfa, S., Vitale, A., Lorito, M., Deng, Z., Gentile A. 2008. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Research*. 17, 873-879.
- Djonović S., Pozo M.J., Dangott L.J., Howell C.R., Kenerley C.M. 2006. *Sm1*, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 19, 838–853.
- Djonović S., Vargas W.A., Kolomiets M.V., Horndeski M., Wiest A., Kenerley C.M. 2007. A proteinaceous elicitor *Sm1* from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology*. 145, 875–889.
- Elad J. 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*. 102, 719-732.
- Elad, Y., David, D.R., Levi, T., Kapat, A., Kirshner, B., Guvrin, E. 1999. Modern Fungicides and Antifungal in Compounds II . Intercept Ltd. 459–467.
- Elad, Y. and Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal Plant Pathology*. 105, 177–189.
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H. 1995. An *Arabidopsis thaliana* Thionin Gene is Inducible via a Signal Transduction Pathway Different from That for Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiology*. 109, 813-820

- Farag M.A., Fokar M., Zhang H.A., Allen R.D., Pare P.W. 2005. (Z)-3-Hexenol induces defense genes and downstream metabolites in maize. *Planta*. 220, 900–909.
- Feys B.J., Parker J.E. 2000 Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*. 16, 449-455.
- Folcher, L., Jarry, M., Weissenberger, A., G rault F., Eychenne, N., Delos, M., Regnault-Roger, C. 2009. Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. *Crop Protection*. 28, 302-308.
- Gallou A., Cranenbrouck S., Declerck S. 2009. *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology*. 124, 219-230.
- Gao L., Smith F.A., Smith S.E. 2006. The *rmc* locus does not affect plant interactions or defence-related gene expression when tomato (*Solanum lycopersicum*) is infected with the root fungal parasite *Rhizoctonia*. *Functional Plant Biology*. 33, 289–296.
- Gao, X., Shim, W., G bel, C., Kunze, S., Feussner, I., Meeley, R., Balint-Kurti, P., Kolomiets, M. 2007. Disruption of a Maize 9-Lipoxygenase Results in Increased Resistance to Fungal Pathogens and Reduced Levels of Contamination with Mycotoxin Fumonisin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 922-933
- Gao X., Brodhagen M., Isakeit T., Horowitz Brown S., G bel C., Betran J., Feussner I., Keller N.P., Kolomiets M.V. 2009. Inactivation of the Lipoxygenase *ZmLOX3* Increases Susceptibility of Maize to *Aspergillus spp.* *Molecular Plant Microbe Interactions*. 22, 222-231.
- Glazebrook, J., Chen W., Estes B., Chang H.S., Nawrath C., Metraux J.P., Zhu T., Katagiri F. 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal*. 34, 217-228.

- Gökmen V., Bahgeci S., Acar J. 2002. Characterization of crude lipoxygenase extract from green pea using a modified spectrophotometric method. *European Food Research and Technology*. 215, 42-45.
- Green R. and Fluhr R. 1992. UVB-induced PR1 accumulation is mediated by active oxygen species. *The Plant Cell*. 7, 203-212.
- Guo A.; Salih G., Klessig D. 2000 Activation of a diverse set of genes during the tobacco resistance response to TMV is independent of salicylic acid; induction of a subset is also ethylene independent. *Plant Journal* 21, 409-418
- Hahlbrock K. and Scheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 40, 347-369 .
- Harman G. E. and Björkman T. 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. 229-265.
- Harman G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. 84, 377-393.
- Harman G.E., Dozelli B.G.G. 2001. Enhancing crop performance and pest resistance with genes from biocontrol agents. *Enhancing Biocontrol Agents and Handling Risks*. IOS Press. 114-128.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004^a *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2, 43-56.
- Harman G.E. , Petzoldt R., Comis A., Chen J. 2004^b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Biological Control*. 94, 147-153.

- Harman G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology*. 96, 190-194.
- Horst, L.E., Locke, J., Krause, C.R. 2005. Suppression of *Botrytis* Blight of Begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in Peat and Compost-Amended Potting Mixes. *Plant Disease*. 89, 1195-1200
- Howell C.R. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium spp.* and its biological control with *Trichoderma spp.*. *Biological Control*. 92, 177-180.
- Inbar J., Abramsky M., Cohen D., Chet I. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*. 100, 337-346.
- Kato M., Hayakawa Y., Hyodo H., Ikoma Y., Yano M. 2000. Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) synthase, ACC Oxidase, Phenylalanine Ammonia-Lyase, and Peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiology*. 41, 440-447.
- Ke D., Saltveit ME. 1986. Effects of calcium and auxin on russet spotting and phenylalanine ammonia-lyase activity in iceberg lettuce. *Horticulture* 21, 1169-1171.
- Kedera C.J., Leslie J.F., Clattin L.E. 1992. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 84, 603-607.
- Koike N., Hyakumachi M., Kageyama K., Tsuyumu S., Doke N. 2001. Induction of Systemic Resistance in Cucumber against Several Diseases by Plant Growth-promoting Fungi, lignification and Superoxide Generation. *European Journal of Plant Pathology*. 107, 523-533.
- Leslie, J.F. 1991. Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). *Phytopathology*. 81, 1058-1060.

- Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. The Fusarium laboratory manual-Blackwell Publishing
- Li J., Li R.Q., Yuan W.J. 1991 On the change of enzyme activities of cucumber leaf infected by *Pseudoperonospora cubensis* rosws. Acta Phytapathologica Sin. 21, 277–283 (in Chinese).
- Linthorst, H.J.M., van der Does, C., Brederode, F.T., Bol, J.F. 1993. Circadian expression and induction by wounding of tobacco genes for cysteine proteinase . Plant Molecular Biology. 21, 685-694
- Logrieco A., Mulè G., Moretti A., Bottalico A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. European Journal of Plant Pathology. 108, 597-609.
- Loon, van L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology. 36, 453-483 .
- Lumsden R.D. and Locke J. C. 1989 Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. Phytopathology. 79, 361-366.
- Lumsden R.D., Lewis J.A., Fravel D.R. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. Biorational Pest Control Agents. 166-182.
- Marasas W.F. 1995. Fumonisin, Their implications for human and animal health. Natural Toxins. 3, 193-198.
- Majerana W., Cai Y., Sun Q., van Wijka K.J. 2005. Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. The Plant Cell 17, 3111-3140.
- Mao W. , Lumsden R.D. , Lewis J.A. , Hebbbar P.K. 1998. Seed treatment using pre-infiltration and biocontrol agents to reduce damping-off of corn caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. Plant Disease. 82, 294-299.

- Matsui K. 2006 Green leaf volatiles, hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 9, 274–280.
- Meera M.S., Shivanna M.B., Kageyama K., Hyakumachi M. 1995. Persistence of induced systemic resistance in cucumber in relation to root colonization by plant growth promoting fungal isolates. *Crop Protection*. 14, 123-130.
- Miller J.D. 2001. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environmental Health Perspectives*. 109, 321-324.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Nicolás, C., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Monte, E. 2008. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. *Fungal Genetics and Biology*. 45, 1506-1513.
- Morris S.W., Vernooij B., Titatarn S., Starrett M., Thomas S., Wiltse C.C., Frederiksen R.A., Bhandhufalck A., Hulbert S., Uknes S. 1998. Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11, 643-658.
- Mulè G., Bailey J.A., Cooke B.M., Logrieco A. 2005. Molecular diversity and PCR-detection of toxigenic *Fusarium* species and ochratoxigenic fungi. *Mycopathologia*. 160, 95-96.
- Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques*. 32, 1372-1379 .
- Munkvold, G.P., McGee, D.C., Carlton, W.M. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. 87, 209-217
- Nakamura S., Hatanaka A. 2002. Green-leaf-derived C6-aroma compounds with potent antibacterial action that act on both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 50, 7639-7644.
- Nayaka S.C., Niranjana N.R. , Shankar A.C.U. 2008. Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. 1-19.

- Nayaka, C., Shankar U., , Arakere C, Munagala, S., Siddapura, R., Harishchandra, S., Hunthrike, S., Carmen, N. 2009. Control of *Fusarium verticillioides*, cause of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. Pest Management Science. 65, 769-775.
- Nelson, P.E. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia. 117, 29-36.
- Nemchenko A., Kunze S., Feussner I., Kolomiets M. 2006. Duplicate maize 13-lipoxygenase gene are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. Journal of Experimental Botany. 57, 3767–3779.
- Ousley M.A., Lynch J.M., Whipps J.M. 1994. Potential of *Trichoderma spp.* as consistent plant growth stimulators. Biology and Fertility of Soils. 17, 85-90.
- Pena-Cortés H., Albrecht T., Prat S., Weiler E.W., Willmitzer L. 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. Planta. 191, 123-128.
- Pfaffl. M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acid reserch. 29, 2000-2007.
- Pieterse C.M.J., Van Pelt J.A., Van Wees C.M., Ton J., Léon-Kloosterziel K.M., Keurentjes J.B., Verhagen W.M., Knoester M., Van der Sluis I., Bakker A.H.M., Van Loon L.C. 2001. Rhizobacteria-mediated Induced Systemic Resistance, Triggering, Signalling and Expression. European Journal of Plant Pathology. 107, 51-61.
- Pieterse C.M.J., Schaller A., Mauch-Mani B., Conrath U. 2006. Signaling in plant resistance responses, divergence and cross-talk of defense pathways. Multigenic and induced systemic resistance in plants. 166-196.
- Placinta C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. 1999 A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. Animal Feed Science and Technology. 78, 21-37.

- Prelusky D.B., Rotter B.A., Rotter R.G., 1994. Mycotoxins in grain. Compounds other than Aflatoxin. Toxicology of mycotoxins. 359-403.
- Prost I., Dhondt S., Rothe G., Vicente J., Rodriguez M.J., Kift N., Carbonne F., Griffiths G., Esquerré-Tugayé M.T., Rosahl S., Castresana C., Hamberg M., Fournier J. 2005. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. Plant Physiology. 139, 1902-1913.
- Rogers, L.A., Dubos, C., Cullis, I.F., Surman, C., Poole, M., Willment, J., Mansfield, S.D., Campbell, M.M. 2005. Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis. Journal of Experimental Botany. 56, 1651-1663.
- Rojó F., Ferez M., Reynoso M., Torres A., Chulze S. 2007. Effect of *Trichoderma* species on growth of *Fusarium proliferatiom* and production of fumonisins, fusaproliferin and beauvericin. Mycotoxin Research. 23, 173-179.
- Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol. Biol. 132, 365-386.
- Rossi V., Battilani P., Battisti D., Scandolara A. 2004. Epidemiological aspects of *Fusarium verticillioides*, the causal agent of maize pink ear rot. Journal of Plant Pathology. 86, 331.
- Ruocco, M., De Masi, L., Soriente, I., De Palma, M., D'Amore, R., Lorito, M., Tucci, M. 2007. *Trichoderma*-Plant interactions are modulated by the plant genotype. XIII IS MP-MI Congress, Sorrento. 21-27
- Saldajenom.G.B., Chandanie W.A., Kubota M., Hyakumachi M. 2008. Effects of interactions of arbuscular mycorrhizal fungi and beneficial saprophytic mycoflora on plant growth and disease protection. Mycorrhizae, Sustainable Agriculture and Forestry. 211-226.
- Sambrook, J., Russell, W.D. 2001. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. CSHL Press, Woodbury NY, USA.

- Schulz B., Rommert A.K., Dammann U., Aust H.J., Strack D. 1999. The endophyte-host interaction, a balanced antagonism?. *Mycological Research*. 103, 1275-1283.
- Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Trichoderma and Gliocladium*.
- Shah, J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*. 12, 459-464.
- Sharma, R.C., De Leon, C., Payak, M.M. 1993. Diseases of maize in South and South-East Asia: problems and progress. *Crop Protection*. 12, 414-422
- Shi Z., Wang F., Zhou W., Zhang P., Yong J.F. 2007. Application of osthol induces a resistance response against powdery mildew in pumpkin leaves. *International Journal of Molecular Sciences*. 8, 1001-1012.
- Shiojiri K., Kishimoto K., Ozawa R., Kugimiya S., Urashimo S., Arimura G., Horiuchi J., Nishioka T., Matsui K., Takabayashi J. 2006. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants, An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *PNAS* 103, 16672-16676.
- Shoresh M., Yedidia I., Chet I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Biological Control*. 95,76-84.
- Shoresh M. and Harman G.E. 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root, a proteomic approach. *Plant Physiology*. 147, 2147-2163.
- Sivan A. and Harman G.E. 1991. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*. 137, 23-29.

- Sobek E.A., Munkvold G.P. 1999. European corn borer (Lepidoptera, Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *Journal of economic entomology* 92, 503-509.
- Sobowale A.A., Cardwell K.F., Odebode A.C. 2007. Persistence of *Trichoderma* species within maize stem against *Fusarium verticillioides*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 40.
- Tuite, J., 1969. *Plant Pathological Methods, Fungi and Bacteria*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, MN, USA.
- Vainio H., Heseltine E., Wilbourn J. 1993. Report on an IARC working group meeting on some naturally occurring substances. *International Journal of Cancer*. 53,535 – 537.
- Vieira A., Goreti M. , Chamel I.J., Piovesan N.D., De Rezende S.T., Moreira M.A., De Barros E. G., 2001. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 13, 4-12.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Barbetti M.J., Li H., Woo S.L., Lorito M. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 72, 80-86.
- Wees, Van S.C.M., Lujendijk M., Smoorenburg I., Van Loon L.C. and Pieterse C.M.J. 1999 Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect expression of known defence-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible genes *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology*. 41, 537-549.
- Weichert H., Stenzel I., Berndt E., Wasternack C., Feussner I. 1999 Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves — preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS*. 464, 133-137 .

- Wicklow D.T., Horn B.W., Shotwell O.L., Hesseltine C.W., Caldwell R.W. 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathology*. 78, 68-74.
- Windham M.T., Elad Y., Baker R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma spp.* *Phytopathology*. 76, 518-521.
- Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M. 2005. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma spp.*, Phytopathogenic Fungi, and Plants. Symposium The Nature and Application of Biocontrol Microbes II: *Trichoderma spp.*
- Yates, I., Sparks, D., Glenn, A. 2007. Natural and introduced *Fusarium verticillioides* populations in ears of field-grown corn plants. *Phytopathology*. 97, 127.
- Yates I.E. and Sparks D. 2008. *Fusarium verticillioides* dissemination among maize ears of field-grown plants. *Crop Protection*. 27, 606-613.
- Yedidia I., Benhamou N., Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 1061-1070.
- Yedidia I., Srivastva A.K., Kapulnik Y., Chet I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*. 235, 235-242.
- Yedidia I., Shores M., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. 2003. Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae pv. lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation of Phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 7343-7353.
- Zimand G., Elad Y., Chet I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology*. 86, 1255-1260.

***Acremonium zeae* maize endophytic colonization, effect on *Fusarium verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination.**

R. Causin¹, R. Rasera¹, R. Ballan²

¹ Department of Land and Agroforest Environments - TESAF, section Plant Pathology, University of Padua. Viale dell'università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy.

² Istituto Tecnico Agrario "D.Sartor" - Via Postioma di Salvarosa 28, 31033 Castelfranco Veneto (TV), Italy.

Type of article: research article, proposed for publishing

Abstract:

In recent extensive research conducted to understand *Aspergillus flavus* kernel colonization and aflatoxin contamination dynamics, *Acremonium zeae* was found to be antagonistic not only against this mycotoxigenic fungus but also against *Fusarium verticillioides*. *F. verticillioides* is the most common toxigenic fungus colonizing maize; it causes ear rot disease and produces primarily fumonisin toxins even at concentration that make maize grain inadvisable for the use for human consumption and for feed of more susceptible animal species. *A. zeae* antagonistic activity is due to pyrrolicidines A and B that are also active against major stalk and ear rot pathogens of maize but antagonistic effects against maize pathogens have been tested only in laboratory or greenhouse. Results of these works demonstrate, in open field trials, that the plant becoming from treated seed inoculated with *A. zeae* NRRL 13540 results in an enhancement in maize plant *A.zeae* colonization in stalk, at flowering, three months after inoculation, and in kernel at harvest time 2 months later. *A. zeae* endophytic colonization enhancement has an effect in reduction *F.verticillioides* endophytic colonization in stalk and in kernel and also on fumonisin B₁ and B₂ contamination at harvest time.

Keywords: *Acremonium zeae* NRRL 13540, *Fusarium verticillioides*, fumonisins, seed treatment, biological control.

1.Introduction

Acremonium zeae W. Gams & Sumner together with *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg has long been reported as the most predominant fungus recovered from seed and stem core tissue of naturally infected healthy maize plant (Manns and Adams, 1923, Wicklow et al., 2005). Reddy and Holbert in 1924 isolated *A. zeae* from blackened vascular bundles and, even if the symptoms were inconsistent (Harris, 1936), they described for the first time *A. zeae* as a seed-borne maize endophytes beginning its development with the germinating seed, and resulting in a systemic infection of the plant through the vascular system, eventually invading the ears and seeds of plants that appear outwardly healthy (Reddy and Holbert, 1924). *A. zeae* have been never more indicate as causing ear, kernel or storage rots of maize (White, 1999). As for other endophytes fungi, *A. zeae* developing inside the host plant not only can be an immediate defense against pathogen attack at the seed and seedling stage, where natural enemies of the host plant would have the greatest impact on fitness (Faeth 2002) ,but also it can act as biological control agent (BCA) in later plant developing stage. In recent extensive research conducted to understand *A.flavus* kernel colonization and aflatoxin contamination dynamics, *A. zeae* was found to be antagonistic not only against this mycotoxigenic fungus but also again *F.verticillioides* (Wicklow et al., 1980 and 2005). *F. verticillioides* is the most common toxigenic fungus colonizing maize (Munkvold, 2003); it causes ear rot disease and produces primarily fumonisin toxins even at concentration that make maize grain inadvisable for human consumption and feed of more susceptible animal species (Placinta et al., 1999; Soriano and Dragacci, 2004). Because of the harmful effects associated with the presence of fumonisins, the control of *F. verticillioides* has become an important area in food safety. In *in vitro* assay has demonstrated that the antagonistic activity of *A. zeae* against *F.verticillioides* and *A.flavus* is due to two polyketide – amino acid derived antibiotics that is pyrrocidines A and B (Wicklow et al., 2005). The antifungal activity of

these compounds is due to the pyrrolidinone functional group. This group is also present in other molecules such as talaroconvolutin A, tetramic acid derivatives, rubratoxin B produced by different fungi (*Talaromyces convolutes*, *Penicillium rubrum*, *Cylindrocarpon spp.*). These substances interfering with cell wall synthesis leads to hyphal deformation in many fungi (Suzuki et al. 2000; West et al. 1996; Reiss 1972; He et al. 2002, Bigelis et al. 2003). Recent studies on pyrrocidines reveal also their activity against major stalk and ear rot pathogens of maize (*F. graminearum*, *Nigrospora oryzae*, *Stenocarpella (Diplodia) maydis*, *Rhizoctonia zeae*) (Wicklow and Poling, 2009). According to authors knowaledge *A. zeae* antagonistic effects against maize pathogens and mycotoxigenic fungi as *A.flavus* and *F.verticillioides* have been tested only in controlled environment, in laboratory or greenhouse ,and there is no report on its effect in open field trials (Wicklow et al., 1988). The first aim of this research is first to assess if an easy to do seed treatment with the selected *A. zeae* strain NRRL 13540, able to control *F.verticillioides in vitro*, is possible to determine a systemic plant colonization. While the second one considers if seed inoculation determines *A.zeae* systemic infection in open field trials, too, with effectiveness against *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination.

2.Materials and methods

A. zeae NRRL 13540 inoculum production

A. zeae strain NRRL 13540 was kindly supplied by the ARS culture collection. Ten 11 Erlenmeyer flasks containing 0,8 l potato dextrose broth (PDB) and 50 slants of potato dextrose agar (PDA) were inoculated with *A. zeae* NRRL 13540 and store in dark at 25±1°C. After 14 days *A. zeae* liquid cultures were homogenized and filtered with a sterile cotton gauze. In the same time on each slant were spread 5 ml of sterile water, the surface was gently scraped, the fungal suspension was filtered with a sterile cotton gauze and recovered in a

Erlenmeyer flask. The concentrations of the two fungal suspension were determined with a haemocytometer. The suspension produced from slants was used to enrich the concentration of the one derived from liquid culture; the two suspensions were mixed together to obtain a target final concentration of 10^6 propagules/ml.

Greenhouse studies

Greenhouse experiments were conducted under gnotobiotic conditions: seeds were subjected to: surface sterilization by immersion in H_2O_2 10% for 15' and a mild heat treatment ($60 \pm 2^\circ C$ for 15') to remove both external and internal bacteria and fungi (Bacon *et al.* 1994). Disinfected seeds were inoculated by a four hour immersion in a 10^6 propagules/ml *A. zeae* fungal suspension. As a control an equal amount of disinfected seeds was put for the same period in sterile water. After that treated and untreated seeds were separately placed on sterile paper towels and allowed to dry in a laminar flow hood. 100 seeds for thesis were sowed in 20 sterile natural soil pots (autoclaved for 1 hour at $121^\circ C$), five seeds for pot. Sowed pots were placed randomly on a greenhouse bench ($25 \pm 2^\circ C$, 16h photoperiod and $75 \pm 5\%$ RH) and irrigated weekly with sterile water. Before sowing 50 seeds for treatment were half cut and placed on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) in 20 Petri dishes (\varnothing 90 mm), 5 seeds for plate, and incubated in the dark at $25^\circ \pm 1C$. After 10 days the number of seeds developing *A. zeae* or other fungi was recorded. Identification of fungi was performed studying macroscopic and microscopic morphological characteristic. *A. zeae* experimental isolate characteristics were compared with those of *A. zeae* reference strain NRRL 13540, NRRL 34560, CBS 114370 and CBS 114368. Identification of *Fusarium* was performed to the species level according to Leslie *et al.* (2006), for other fungi the identification was performed to the genus level according to Samson *et al.* (2004).

30 day old seedlings A. zeae colonization

30 days after germination the whole greenhouse plants were harvested, risen thoroughly with tap water and surface sterilized (10 min in 15% H₂O₂). From each sterilized stem a fragment (about 3mm long) was sampled from the middle part. Fragments were placed on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) in 20 Petri dishes (Ø 90 mm), 5 fragments per plate, and incubated in the dark at 25°±1C. After 10 days the fragments developing fungal colonies were recorded; fungal identification was performed as described above.

Field trial:

Seed inoculation:

Non coated maize seeds were soaked with a 10⁶ propagules/ml *A. zeae* suspension (0,1 l of suspension for 1 kg of seed) and shook every 20 minutes for four hour in a sterile plastic bag. Inoculated seeds were placed on sterile paper towels and allowed to dry overnight in a laminar flow hood. *A. zeae* seed colonization was checked on a sample of 100 seeds as described before. The two thesis sowed with untreated (UN) and treated (T) seeds were arranged in a randomized complete block design with 3 replications of 300 m² each. Geographic and agronomic information about the experimental fields are reported in the table 1.

Table 1. Geographic and agronomic information about the experimental fields

Trial	Site	Year	Previous crop	Sowing date	N fertilization (kg ha ⁻¹)	Plant density (pt ha ⁻¹)	Irrigation	ECB control	Harvest date
T1	Castelfranco Veneto 45°40'N, 11°55'E	2006	Maize	01/04	250	70000	No	No	15/09
T2	San Pietro Polesine 45°03'N, 11°19'E	2006	Maize	19/03	260	70000	No	No	28/08
T3	Rovigo 45°01'N, 11°47'E	2009	Maize	11/04	230	70000	No	No	03/09

Isolation of F.verticillioides and A .zeae from stalk

To study in field *A. zeae* maize endophytic colonization and the effect on *F.verticillioides*, in site one, at female flowering, 20 cm of stalk between the sixth and seventh internode was cut from 35 plants randomly chosen in each replication. Samples were transported in sterile plastic bags to the laboratory and stored at $6\pm 1^{\circ}\text{C}$. The day after stalk fragments were risen thoroughly with tap water and surface sterilized (10 min in 15% H_2O_2). From each sterilized stem a fragment (about 3mm long) was sampled from the middle part. Fragment were placed on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) in 20 Petri dishes (Ø 90 mm), 5 fragments per plate, and incubated in the dark at $25^{\circ}\pm 1\text{C}$. Petri dishes were observed two times: 5 and 10 days after inoculation. The fragments developing fungal colonies were recorded and fungal identification was performed as described above.

Isolation and quantification of F.verticillioides and A. zeae on maize kernel

At harvest time (kernel moisture $25\pm 2\%$) 35 ears were randomly collected from each replication, immediately transported to the laboratory were stored at $6\pm 1^{\circ}\text{C}$. The day after all ears were completely shelled and kernels were dried with a hot (50°C) and dry air flow to obtain a 10% final grain moisture. Before milling, to study *A. zeae* kernel endophytic colonization the first year in site one, from each thesis 2 kg of kernel, randomly chosen, were surface sterilized (10 min in 15% H_2O_2), 100 seeds were half cut and placed on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) in 20 Petri dishes (Ø 90 mm), 5 kernels per plate, and incubated in the dark at $25^{\circ}\pm 1\text{C}$ for 10 days; the fragments developing fungal colonies were recorded; fungal identification was performed as described above. The remaining part of sterilized kernels as non sterilized grains and the whole samples in other sites, were milled with a laboratory knife mills, homogenized and reduced through the technique of quartering to two 1kg sub-sample each. One sub-sample, stored frozen (-20°C) was used for toxin

analysis; the other one was used for mycological analyses. Mycological analyses were performed with the serial dilution methods. Serial decimal dilution were done starting from 10^{-1} to 10^{-6} . For each dilution aliquot of 0,5 ml was spread on PDA added with streptomycin-sulphate (50 mg/l) plates, five replicates for dilution were done. Plates were incubated 7 days at 25°C and total count and count per colony type was done. Colony was isolated and purified. Fungal identification was performed as described above.

Fumonisin B₁ and B₂ analyses

From flour frozen samples 20g were sub-sampled and used for fumonisin quantification. Total fumonisin content was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the method UNI EN 14352:2004. Acetonitrile:methanol:water (25:25:50, v/v/v) was utilized as extraction solvent. Immunoaffinity columns (IAC) were used for the isolation of toxins after centrifugation, filtration and dilution steps. Derivatization of fumonisins was carried out with orthophthaldehyde (OPA) and toxins were detected with a fluorescence detector (λ_{ex} : 335 nm, λ_{em} : 440 nm). Isocratic mobile phase used was methanol:sodium dihydrogen phosphate buffer (NaH_2PO_4 0.1M), pH 3.35 (77:23, v/v) with a flow rate of 1 ml/min at 25°C. Recovery for FB₁ and FB₂ is 90%; LOD: FB₁ = 94 µg/kg, FB₂ = 51 µg/kg; LOQ: FB₁ = 164 µg/kg, FB₂ = 74 µg/kg.

Statistical analysis

Different statistical analyses were done according with the different characteristics of data collected. *A.zeae* stalk and kernel fragment colonization frequencies were compared using confidence limits of the percentage for $p = 0,05$. Data belonging to the dilution method were analysed as described in the Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2001) and express as colony forming unit per gram of vegetal material (Cfu/g). Cfu/g and fumonisin concentration

(B₁+B₂) were analyzed by analysis of variance. The data were previously transformed, if needed, to log₁₀(x+1) to obtain the homogeneity of variance (Cavalieri et al., 2005). Means were compared using Tukey HSD test. The analysis were made using the software R version 2.10.0 (open source: <http://www.r-project.org>).

3. Results

Effect of A. zeae maize plant systemic colonization on endophytic F. verticillioides colonization

Results from greenhouse and field trials reveal the effectiveness of disinfection and inoculation protocols. All sterile tested seeds result uncolonized by any fungus or bacteria. Otherwise sterilize or unsterilized seed treated with *A. zeae* used for greenhouse and field trials give *A. zeae* colonies while untreated ones not. Mycological studies of 30 days old greenhouse maize plant reveal that 72% of plants obtained from inoculated seeds result endophytically colonized by *A. zeae* while stalks from untreated thesis did not. (fig.1a). In field experiments, at flowering, plants developed from treated seed result in a significant enhancing of *A.zeae* stalk endophytic colonization and in a reduced *F.verticillioides* endophytic colonization (fig.1b). At harvest time kernels collected from the same thesis reveal a significant reduction either in endophytic or in total *F.verticillioides* kernel colonization that leads also in a reduction of fumonisin contamination (tab.2). The analyses performed with the methods based on plating of half cut grain and direct isolation of fungi permitted to observe that 19% of kernels becoming from the treated thesis are endophytically colonized by *A zeae* (tab.2).

Fig.1 Effect of *A.zeae* seed treatment on stalk colonization. a) 30 days old maize plant stalk *A.zeae* endophytic colonization;b) *F.verticillioides* and *A.zeae* stalk endophytic colonization at flowering. Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,05.

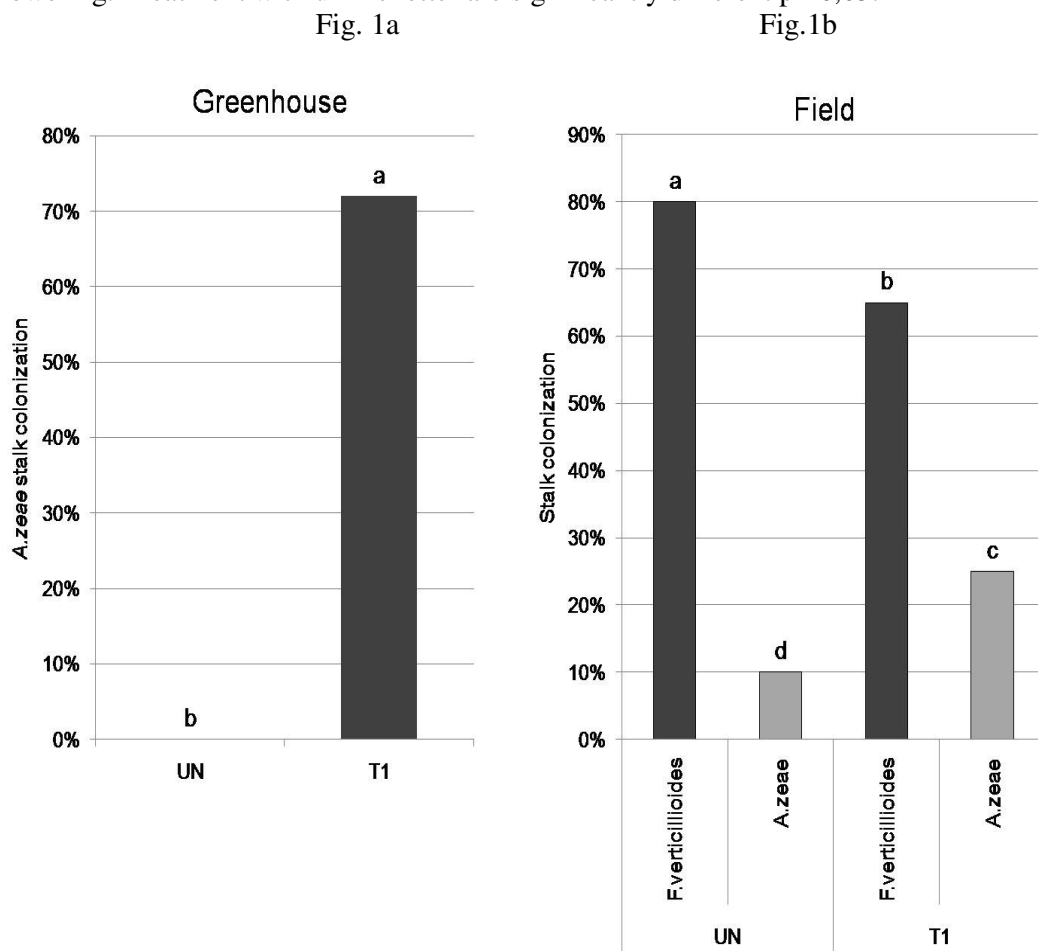


Table 2. Effect of seed treatment on *A. zeae* and *F.verticillioides* kernel endophytic colonization and on fumonisin B₁ and B₂ contamination in trial 1.

Thesis	<i>A.zeae</i> endophytic colonization as percentage of infected kernel	<i>F.verticillioides</i> endophytic colonization as cfu/g	<i>F.verticillioides</i> kernel colonization as cfu/g	Fumonisin B ₁ and B ₂ kernel contamination as µg/kg
UN	0 b	10,0*10 ⁵ a	29,6*10 ⁵ a	14488 a
T	19 a	2,7*10 ⁵ b	8,2*10 ⁵ b	1136 b

Means with unlike letter are significantly different p= 0,05.

Influence of A. zeae seed treatment on F.verticillioides kernel colonization and fumonisin contamination

Mycological studies and chemical analyses carried on kernels at harvest time reveal a significant (p=0,001) mean reductions of 60% both in *F.verticillioides* kernel colonization (fig.2a) and in fumonisin contamination in treated thesis (fig.2b). Statistical analyses of data reveal that *F. verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination are influenced by the single factor (treatment and trial) but also by the interaction between the factor (treatment x trial) (tab.3). In trail T3 and T1 where there are the higher levels of kernel colonization there is also the higher efficacy of *A.zeae* in controlling *F.verticillioides* colonization respectively T3 of -60% and T1 of -70%, in T2 there is also an effectiveness of seed treatment but not statistically significant (-20%) (tab.4). The same is for the fumonisin contamination, seed treatment is effective in controlling maize kernel colonization in all three trials but only in T2 and T1 the reduction is statistically significant and respectively T1-92% and T2 -69% while in T3 no (T3: -20%) (tab.4).

Table 3. Analysis of variance results for *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin B₁ and B₂ contamination.

	Df	<i>F.verticillioides</i> kernel colonization			Fumonisin B ₁ and B ₂ contamination		
		F value	Pr(>F)	*	F value	Pr(>F)	*
Treatment	1	4.291	0.0392	*	6.589	0.0117	*
Trial	2	78.690	1.28e-06	***	40.887	3.431e-05	***
Treatment*Trial	2	12.212	0.0012	**	5.154	0.0242	*

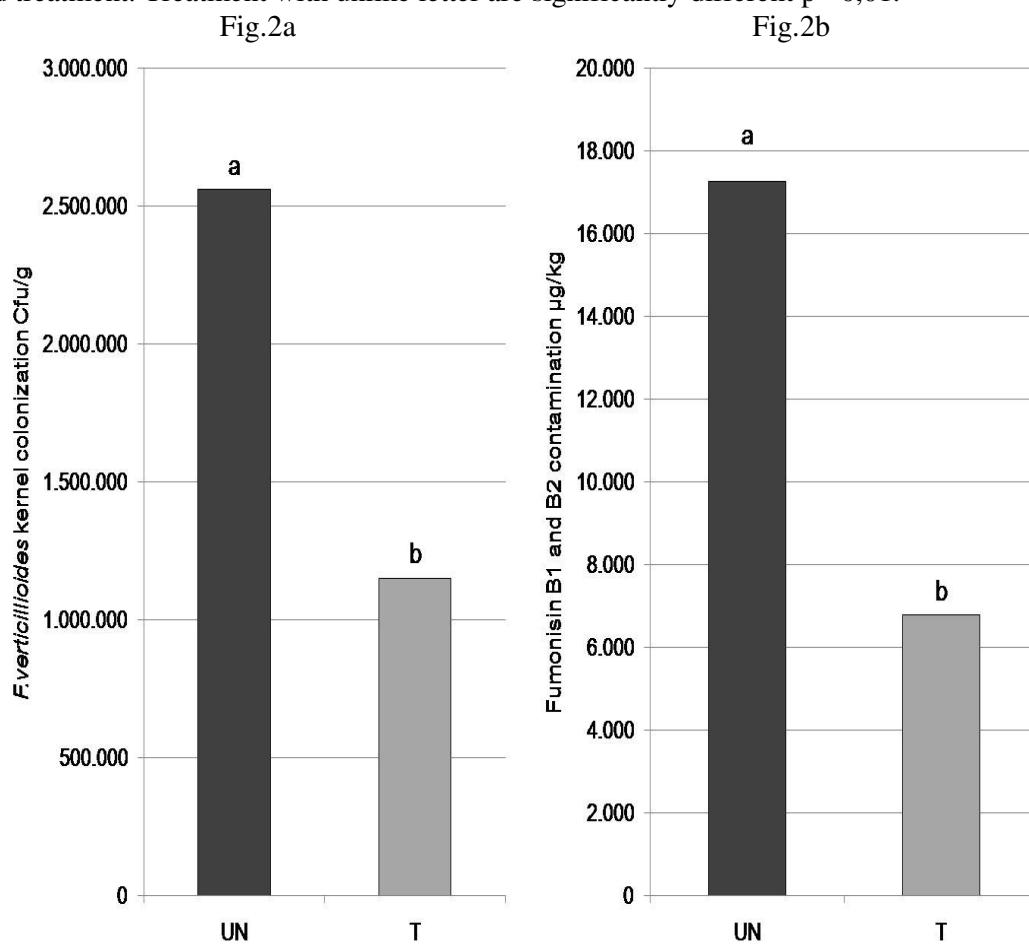
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Table 4. Effect of *A. zeae* seed treatment on *F.verticillioides* kernel colonization and fumonisin B₁ and B₂ contamination.

	<i>F.verticillioides</i> kernel colonization cfu/g		Fumonisin B ₁ and B ₂ contamination µg/kg	
	UN	T	UN	T
T1	29,6*10 ⁵ a	8,2*10 ⁵ b	14488 a	1136 b
T2	17,3*10 ⁵ a	13,9*10 ⁵ a	21600 a	6600 b
T3	29,8*10 ⁵ a	12,4*10 ⁵ b	15700 a	12600 a
Means	25,5*10 ⁵ a	11,5*10 ⁵ b	17263 a	6779 b

Means with unlike letter are significantly different p= 0,01

Fig.2 Effect of *A.zeae* seed treatment on *F.verticillioides* kernel colonization (a) and fumonisin B₁ and B₂ kernel contamination (b), means of three experiments. UN: untreated; T: seed treatment. Treatment with unlike letter are significantly different p= 0,01.



4. Discussion e conclusion

The results demonstrate the possibility not only to inoculate maize seed with a selected *A.zeae* strain, but also that the fungus carried inside the seeds colonizes endophytically maize plants

invading the ears and kernels (fig.1a and b, tab.2). *A.zeae*, as demonstrated by Wicklow and Poling (2009), growing from germinated seed invades seedling root, the mesocotile, and the root crown, also forming single celled propagules which move within the xylem sap of healthy maize tissue and are capable of increasing their numbers through microcyclic conidiation. The results show that *A.zeae* endophytic colonization occurs not only in greenhouse where humidity and temperature are strictly controlled to favor BCA development and competition with other microorganism is avoided but also in open field where biotic and abiotic condition can interfere with BCA development (fig. 1a and 1b). In fact in open field trial, set in site 1, is recorded, in plants becoming from treated seeds, an enhancement in *A.zeae* stalk colonization at flowering, three month after inoculation, and in kernel at harvest time five month later (tab.2). Enhancement that is associated with a reduction of *F.verticillioides* endophytic colonization in stalk and in kernel and in fumonisin contamination. The effectiveness of *A. zeae* seed treatment results in a mean reduction of -60% of both *F.verticillioides* maize plant colonization and fumonisin accumulation (fig.2).

In trials higher control effects are recorded in site where in untreated thesis are recorded the higher level of *F.verticillioides* colonization (tab.4). High level of colonization and contamination can be indicate that the maize plants suffered to biotic or abiotic stresses. In warmer region as the Po Plain maize plants are frequently subjected to temperature and drought stresses condition (ARPAV, 2009) that in recent studies are indicated as selective for more efficient *A. zeae* pyrrocidine production strain (Wicklow et al., 2008). Otherwise data collected in this research don't permit to clarified if the control effect are due to pyrrocidine but only hypothesis on *A. zeae* control activity can be formulate. As said above *in vitro* studies show that control activity of *A. zeae* NRRL13540 is due to pyrrocidine production. Production that *in vivo* has not been investigated. However the recorded enhancement in kernel *A. zeae* endophytic colonization permit to hypothesize a *in loco* inhibition as in paper

disk assay. However the recovering of cerebroside, a molecule able to induce resistance response in lettuce, tomato, melon and sweet potato against *Fusarium* (Umemura et al.,2004), from fermented rice culture of *A.zeae* NRRL13540 during isolation and purification of pyrrocidine, open new perspective (Wicklowsky et al.,2008). Also in this case there are no studies on *A. zeae* elicitor-mediated plant-induced resistance in maize. Other studies are in progress in our department to understand which of these mechanisms of control have more effectiveness in controlling *F.verticillioides* colonization and fumonisin contamination and how it is possible to enhance their control efficacy.

In conclusion enhancing *A. zeae* plant endophytic colonization is a way to obtain a reduction in *F.verticillioides* stalk and kernel endophytic colonization resulting in a reduction of fumonisin B₁ and B₂ contamination. Colonization that also can result in a protection of maize plant from other stalk and ear rot pathogens as *F. graminearum* which is the causal agent of deoxynivalenol accumulation (Wicklowsky and Poling, 2009). This control strategy is very interesting because the inoculum of *A. zeae* NRRL 13540 can be carried inside the seed, as demonstrated in this work, with a easy to do seed treatment, inoculum that can be viable for a long time (at least 7 years) and can be seed transmitted (Dungan and Koehler 1944).

As whole seed treatment is an attractive proposition for BCA distribution because this technique has the potential to deliver agent in the right amount, at the right place and at the right time (McQuilken et al., 1998) and can be easily implemented in the normal agricultural technique.

References:

- ARPAV, 2009. Irriweb Veneto. <http://irrigation.altavia.eu/LoginARPAV.aspx>
- Bigelis, R., He, H., Yang, H. Y., Chang, L. P., Singh, M. P., Carter, G. & Greenstein, M., 2003. Production of new antibiotics using polyester-cellulosic solid supports: pyrrocidines from *Cylindrocarpon* sp. LL-Cyan426 and Acremonidins from *Acremonium* sp. LL-Cyan416. In SIM Annual Meeting Program and Abstracts [Minneapolis, MN, August 10–14, 2003]: 91. Society for Industrial Microbiology, Fairfax, VA.
- Cavaglieri L., Orlando J., Rodríguez M.I., Chulze S., EtcheverryM., 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156 (5-6): 748-754.
- Dungan G.H., Koehler B., 1944. Age of seed corn in relation to seed infection and yielding capacity. *Journal of American Society of Agronomy* 36:436-443.
- Faeth, S. H., 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos* 98: 25–36.
- FDA, 2001. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 3:Aerobic Plate Count. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm063346.htm>
- Harris, M. R., 1936. The relationship of *Cephalosporium acremonium* to the black-bundle disease of corn. *Phytopathology* 26: 965–980.
- He, H., Yang, H. Y., Bigelis, R., Solum, E. H., Greenstein, M., Carter, G. T., 2002. Pyrrocidines A and B, new antibiotics produced by a filamentous fungus. *Tetrahedron Letters* 43: 1633–1636.
- Manns, T. F. & Adams, J. F. (1923) Parasitic fungi internal to seed corn. *Journal of Agricultural Research* 23: 495–523.

- McQuilkem, M.P., Halmer, P., Rhodes, D.J., 1998. Application of microorganism to seed. In: Formulation of microbial biopesticides. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands
- Munkvold G. P., 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705–713.
- Placinta, C.M., D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78 (1–2), 21–37.
- Reddy, C. S., Holbert, J. R., 1924. The black bundle disease of corn. *Journal of Agricultural Research* 27: 177–206.
- Reiss, J. (1972) Toxicity of rubratoxin B to fungi. *Journal of General Microbiology* 71: 167–172.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J. C., 2004. *Introduction To Food- And Airborne Fungi*, 7th Edition. ASM press.
- Soriano, J.M., Dragacci, S., 2004. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International* 37 (10), 985–1000.
- Suzuki, S., Hosoe, T., Nozawa, K., Kawai, K.-I., Yaguchi, T., Udagawa, S.-I., 2000. Antifungal substances against pathogenic fungi, Talaroconvolutins, from *Talaromyces convolutus*. *Journal of Natural Products* 63: 768–772.
- Umemura K., Tanino S., Nagatsuka T., Koga J., Iwata M., Nagashima K., Amemiya Y., 2004. Cerebroside Elicitor Confers Resistance to *Fusarium* Disease in Various Plant Species. *Phytopatology* 94 (8): 813-818
- West, P. R., van Ness, J., Varming, A.-M., Rassing, B., Biggs, S., Gasper, S., McKernan, P. A., Piggott, J., 1996. ZG-1494a, a novel platelet-activating factor acetyltransferase

- inhibitor from *Penicillium rubrum*, isolation, structure elucidation and biological activity. *Journal of Antibiotics* 49: 967–973.
- White, D. G., 1999. *Compendium of Corn Diseases*. 3rd edn. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.
- Wicklow D. T., Poling S. M., 2009. Antimicrobial Activity of Pyrrocidines from *Acremonium zeae* Against Endophytes and Pathogens of Maize. *Phytopathology* 99 (1):109-115.
- Wicklow D.T., Roth R., Deyrup S.T., Gloer J.B., 2005. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research* 109 (5):610-618.
- Wicklow, D. T., 1988. Patterns of fungal association with maize kernels harvested in North Carolina. *Plant Disease* 72: 113–115.
- Wicklow, D. T., Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Adams, G. L., 1980. Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology* 70: 761–764.
- Wicklow, D. T., Horn, B. W., Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Caldwell, R. W., 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathology* 78: 68–74.
- Wicklow, D. T., Poling S. M., Summerbell, R. C., 2008. Occurrence of pyrrocidine and dihydroresorcylide production among *Acremonium zeae* populations from maize grown in different regions. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30 (3): 425-433.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI GENERALI

Gli innumerevoli studi condotti sulla qualità sanitaria delle produzioni di granella di mais provenienti dalle principali plaghe maidicole mondiali hanno permesso di evidenziare come, a seconda della zona di provenienza, esse risultino contaminate da una o più micotossine, tra cui le più importanti, per frequenza ed effetto sulla salute umana ed animale, si sono rivelate essere il deossinivalenolo (DON), lo zearalenone (ZEA), le aflatossine (AF), l'ocratossina (OCRA) e le fumonisine (FUM) (Logrieco et al., 2002; Battilani et al., 2008). Gli studi condotti nella regione Veneto, nel nord Italia, ma anche in altre regioni del mondo, allo scopo di monitorare la presenza di queste tossine, hanno rivelato che le fumonisine, oltre ad essere la classe di tossine più spesso riscontrata nella granella di mais, sono spesso presenti a livelli tali da sconsigliare l'impiego delle partite di mais analizzate non solo per l'alimentazione umana, ma anche per l'alimentazione delle specie animali più sensibili (suini, equini (*Equidi*), conigli e animali da compagnia) (Soriano e Dragacci, 2004, Placinta et al., 1999, AA. VV. 2006, GLM, 2008). I principali responsabili della contaminazione da fumonisine della granella di mais sono *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg e in seconda battuta *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg che risultano anche essere le due specie fungine più frequentemente isolate dalle cariossidi di mais (Nelson, 1992; Logrieco et al., 2002). A causa degli effetti negativi che le fumonisine hanno sia sulla salute umana sia su quella animale, comportando ingenti danni alle produzioni zootecniche, sia sotto l'aspetto qualitativo che quantitativo (Smith et al., 1996; Haschek et al., 2001; Voss et al., 1989; Voss et al., 1990; Voss et al., 2001, Marijanovic et al., 1991; Weibking et al., 1993; Bermudez et al., 1995; Bermudez et al., 1997a; Bermudez et al., 1997b), la messa a punto di strategie di controllo, capaci di contenere la colonizzazione della granella da parte di *F.verticillioides* e la conseguente contaminazione da fumonisine, sono diventati aspetti di prioritario interesse nell'ambito della sicurezza alimentare.

Attualmente in Italia ed in Europa le uniche misure disponibili per contenere la contaminazione da fumonisine, ma anche di tutte le altre micotossine, nella granella di mais, sono rappresentate dall'applicazione delle buone pratiche agricole (BPA) (Racc. CEE 583/2006) comprendenti un

efficace controllo dei fitofagi che possono colpire la pianta di mais e seguite dall'attuazione di buone pratiche di fabbricazione (BPF) durante la manipolazione, il magazzinaggio, la trasformazione e la distribuzione dei cereali destinati all'alimentazione umana e animale.

Tuttavia gli studi condotti, in varie parti del mondo, hanno evidenziato come gli andamenti climatici caratterizzanti i diversi areali di produzione del mais e le loro annuali fluttuazioni condizionino lo sviluppo dei *Fusaria* e la conseguente contaminazione da micotossine, rendendo variabile il vantaggio ottenuto con l'applicazione delle BPA (Munkvold, 2003 a; Tealdo et al., 2009). Inoltre, in areali a forte pressione di malattia come il Veneto, l'applicazione di strategie di controllo indiretto, quali le BPA, non risulta sufficiente a contenere la contaminazione da fumonisine al di sotto di livelli ritenuti sicuri (Reg. CE 1126/2007 e Racc. CE 576/2006) (Tealdo et al., 2009; GLM, 2008). Risulta quindi indispensabile mettere a punto delle strategie di controllo dirette al contenimento delle infezioni di *F.verticillioides*, del suo sviluppo e di conseguenza della sua capacità di sintesi delle tossine. Strategie individuabili nell'applicazione di prodotti fitosanitari o agenti di controllo biologico che però devono essere messe a punto, in primis, in relazione alle possibili vie che *F.verticillioides* utilizza per infettare il mais (Causin et al., 2009 a; Causin et al., 2009 b).

Essendo variabile il contributo dell'inoculo derivante dalle diverse vie d'infezione sul contenuto finale di fumonisine della granella a seconda delle differenti condizioni ambientali che caratterizzano gli areali di coltivazione del mais (Munkvold, 2003b), una prima serie di esperimenti è stata realizzata al fine di chiarire questo aspetto. I risultati ottenuti, se da una parte hanno confermato, come atteso, l'importanza delle infezioni favorite dall'azione trofica delle larve di Piralide nel determinare il contenuto finale di fumonisine, dall'altra hanno sottolineato l'importanza dell'apparto che proviene dalle infezioni che si sviluppano attraverso le infiorescenze femminili del mais (sete) e, sempre in accordo con quanto riportato in bibliografia, hanno confermato la marginale importanza delle fonti di inoculo provenienti dal seme e dal suolo (Causin et al., 2009 a; Causin et al., 2009 b). E' stato inoltre possibile effettuare delle interessanti osservazioni sulle interazioni che si stabiliscono tra le diverse vie di inoculo ed in particolare la non additività delle contaminazioni e

colonizzazioni provenienti dalle diverse vie di infezione, infatti, se si sommano i pesi relativi non si raggiunge il livello registrato nella tesi dove nessuna delle vie di infezione viene controllata che risulta superiore (Causin et al., 2009 a). Probabilmente in questa tesi, la pianta, sottoposta sia all'azione trofica delle larve di Piralide ma anche all'aggressione da parte del patogeno attraverso tutte le vie possibili, risulta in uno stato di stress che, se da una parte ne aumenta la suscettibilità all'attacco del patogeno, dall'altra ne stimola la produzione di composti di difesa, tra questi le specie attive dell'ossigeno, che, a loro volta, stimolano nel fungo la sintesi delle fumonisine (Belozerskaya and Gessler, 2007; Ferrigo et al., 2010 in press). I risultati ottenuti mettono quindi in luce una sinergia tra le diverse vie di inoculo e lo stato fitosanitario della pianta, nella sua più ampia accezione, che richiede la messa a punto di protocolli di controllo integrato nei quali si mettano in atto una serie di strategie differenziate allo scopo di controllare sia lo sviluppo dell'inoculo proveniente dalle diverse vie di infezione sia i fattori che possono causare nella pianta stati di stress. Sedimentata l'importanza di un efficace controllo della piralide nel contenimento delle infezioni di *F.verticillioides* e della contaminazione da fumonisine da esse derivanti, che però non risulta risolutiva, poiché, almeno nell'aerale veneto, non permette di contenere la presenza della micotossina sotto i livelli ritenuti sicuri per l'impiego della granella di mais nell'alimentazione umana ed animale (Tealdo et al., 2009; GLM, 2008), in una visione di un approccio integrato, si è voluto verificare quale fosse il vantaggio ottenibile dal controllo delle infezioni provenienti dalle altre vie di inoculo, cioè da quelle che prendono l'avvio dal seme o dal suolo e, attraverso la colonizzazione endofitica della pianta, giungono fino alle cariossidi o da quelle che avvengono attraverso le setole.

La prima strategia che si è voluta valutare è stata la possibilità di impiegare principi attivi di origine chimica. Tuttavia, se per il frumento ed altri cereali autunno vernini, sono disponibili una ampia gamma di prodotti fitosanitari registrati per il controllo delle fusariosi della spiga e si è ampiamente dimostrata l'efficacia dei triazoli nel contenere sia la colonizzazione della spiga da parte delle diverse specie di *Fusarium* sia la contaminazione da micotossine (Paul et al., 2008), per il controllo

delle fusariosi della spiga di mais, ad oggi, non esiste in Europa alcun principio attivo ne alcun prodotto fitosanitario registrato.

Il primo passo è stato quindi quello di effettuare una serie di saggi in ambiente controllato, laboratorio e serra, allo scopo di verificare l'efficacia dei triazoli nel contenere lo sviluppo di *F.verticillioides* e il secondo è stato quello di verificarne l'efficacia anche in prove di pieno campo (Causin, 2010 c).

Sebbene i risultati ottenuti hanno evidenziato l'efficacia dei diversi principi attivi nei confronti di *F.verticillioides*, la loro applicazione al seme, che in condizioni di serra ha limitare lo sviluppo endofitico di *F.verticillioides* nei germinelli, nelle prove di pieno campo non ha dimostrato un effetto chiaro ne nel ridurre il livello di colonizzazione da *F.verticillioides* ne nel ridurre il livello di contaminazione da fumonisine della granella alla raccolta (Causin, 2010 e). Risultato peraltro atteso, sia per la dimostrata poca importanza di queste vie di infezione nel determinare la contaminazione e colonizzazione finale delle cariossidi, sia per la lontananza temporale e spaziale del punto di applicazione di questi principi attivi rispetto al momento e al luogo in cui avvengono le infezioni che hanno un importanza principale. Non bisogna però dimenticare l'importanza che la concia del seme riveste nel difendere la pianta dagli attacchi dei patogeni nelle prime fasi di sviluppo, quando essa risulta essere più suscettibile (Munkvold et al., 2002). Attacchi che potrebbero determinarne l'insorgenza immediata di stati di stress che possono determinarne un aumento della suscettibilità alla colonizzazione endofitica da parte di *F.verticillioides* ma anche causare delle difficoltà di affrancamento della coltura che si possono riflettere, nelle fasi successive di sviluppo della cultura, in una maggiore suscettibilità a stress di tipo nutrizionale e idrico (Wilke et al., 2007).

Risultati completamente diversi si sono ottenuti nelle prove in cui le diverse miscele di prodotti fitosanitari sono state distribuite sulle infiorescenze femminili (sete) sette giorni dopo la loro emissione. In queste prove tutte le miscele saggate si sono dimostrate in grado di contenere la contaminazione da fumonisine della granella alla raccolta, riducendone il contenuto finale dell'

80% (Causin 2010 c). La miscela composta dai principi attivi Metconazolo e Procloraz è risultata in tutti i saggi la più efficace riducendo mediamente il livello di colonizzazione del 78% e il livello di contaminazione del 81% rispetto al testimone non trattato. La sperimentazione ha tuttavia messo in luce alcuni aspetti che meritano un ulteriore approfondimento, il primo legato alla diversa efficacia che i prodotti fitosanitari esprimono, non solo nei confronti di ceppi di *Fusarium* appartenenti a specie diverse, aspetto già osservato nelle prove di efficacia realizzate su frumento, ma anche nei confronti di ceppi appartenenti alla stessa specie, il secondo è in relazione al fatto che i diversi ceppi hanno dimostrato diversa attitudine nel produrre fumonisine e anche diversa velocità di sviluppo (Causin et al., 2010 c; Segvic e Pepeljnjak). Risultati che, se da una parte motivano la non perfetta concordanza tra livello di colonizzazione della granella e il livello di contaminazione registrato in alcune prove, dall'altro richiederebbero uno studio più approfondito delle popolazioni che caratterizzano i diversi areali di coltivazione del mais. Infatti, in questa ottica, risulterebbe utile verificare che l'impiego di un prodotto fitosanitario non controlli solamente i ceppi di *Fusarium* appartenenti ad una specie o ad un numero di specie limitato poiché, sebbene da una parte si potrebbe registrare una riduzione nel contenuto di una micotossina, dall'altra si potrebbe registrare l'aumento nella presenza di un'altra legata all'affermarsi di una specie di *Fusarium* differente ed inoltre bisognerebbe anche verificare che il prodotto fitosanitario impiegato non sia efficace solamente nel contenere i ceppi scarsamente produttori ma anche nei confronti di quelli con elevate capacità di sintesi.

Quindi, sebbene i risultati ottenuti dall'applicazione dei prodotti fitosanitari sulle sete 7 giorni dopo la fioritura abbiano dato dei risultati estremamente positivi, nonostante le criticità appena discusse, come già sottolineato, non è possibile pensare di applicare questa strategia al di fuori di protocolli di lotta integrata che comprendano tutte le possibilità di lotta, tra cui di fondamentale importanza è l'esecuzione del trattamento insetticida per il controllo della Piralide e l'applicazione delle BPA. In questa prospettiva sarebbero però necessari due distinti interventi, fungicida ed insetticida, realizzati mediamente a 21 giorni di distanza uno dall'altro, il primo sette giorni dopo la fioritura femminile

ed il secondo da eseguirsi al picco di catture della Piralide che normalmente si verifica nella seconda decade del mese di luglio. La limitata redditività della cultura del mais, tuttavia, non consente di ipotizzare l'esecuzione di un doppio trattamento si è quindi voluta sperimentale la possibilità di associare in un unico intervento il trattamento insetticida e fungicida.

I risultati ottenuti, oltre a confermare il ruolo della Piralide nel promuovere lo sviluppo del patogeno fungino e l'accumulo di micotossine, hanno permesso di osservare come all'aumentare del livello di danno causato dalla azione trofica delle larve, si verifici anche un aumento della superficie in cui è stato possibile rilevare l'evasione del fungo (ammuffimento) aumento che si è verificato anche in aree della spiga non lesionate dall'insetto (Causin, 2010 a). Anche questo fatto potrebbe essere legato alla reattività di *F.verticillioides* nei confronti delle specie attive dell'ossigeno (ROS). Questi risultati permettono di ipotizzare che i ROS sicuramente prodotti dalla pianta di mais a seguito dei danni causati dall'azione trofica del fitofago (Repka, 1999, Kachroo et al., 2003, Zhou et al, 2004) non solo, come dimostrato in lavori in fase di pubblicazione (Ferrigo et al., in press), stimolino il fungo a produrre un quantitativo superiore di fumonisine ma potrebbero anche interferire con il suo comportamento facendolo passare da endofita a patogeno stimolandone la capacità di aggredire attivamente i tessuti della pianta.

Questi stessi risultati hanno anche evidenziato, nelle condizioni sperimentali in cui è stata svolta la prova, il verificarsi di una interazione negativa tra insetticida e fungicida che nelle tesi in cui è stata applicata la miscela dei due prodotti fitosanitari ne ha ridotto fortemente l'efficacia (Causin et al., 2010 a).

Alle criticità appena riferite va inoltre aggiunto il fatto che, sebbene le prove siano state realizzate con l'impiego di una manica d'aria montata su macchina semovente scavalcante (trampolo), attrezzatura già disponibile e presente in molte aziende, dove viene impiegata per la distribuzione dei trattamenti insetticidi per il controllo della piralide, attualmente non è disponibile alcun prodotto fitosanitario registrato per questo tipo di impiego ed oltre ad essere noti gli ingenti costi che comporterebbe la registrazione, va tenuto in considerazione quale potrebbe essere l'impatto

ecologico che l'applicazione di questi prodotti potrebbe avere, sebbene prevista all'interno di protocolli di difesa integrata volti a ridurre ragionevolmente l'impiego, su una superficie, che solo in Veneto, è superiore ai 240.000 ha (Fonte ISTAT).

Un'altra interessante ed efficace strategia di controllo diretto si è dimostrata essere l'impiego di agenti di controllo biologico. Le prove svolte in laboratorio, in serra e in campo hanno permesso di verificare l'efficacia di trattamenti al seme con *T. harzianum* ceppo T22 e *A. zeae* ceppo NRRL 13540 nel contenere sia la colonizzazione dei diversi organi della pianta di mais da parte di *F. verticillioides* sia della contaminazione da fumonisine nella granella alla raccolta (Causin, 2010 b e 2010 d). In particolare l'applicazione di T22 in concia al seme ha permesso di ridurre del 70% il livello di colonizzazione e del 60% il livello di contaminazione da micotossine della granella alla raccolta (Causin, 2010 d) mentre l'applicazione di NRRL 13540 ha avuto una azione di contenimento simile nei confronti sia della contaminazione sia della colonizzazione riducendone i livelli del 60% (Causin 2010 b). L'interpretazione dei risultati ottenuti e gli approfondimenti eseguiti hanno permesso di verificare che mentre nel caso di T22 gli effetti di riduzione registrati sono legati alla capacità del BCA di indurre nella pianta di mais una risposta di resistenza sistemica del tipo ISR (induced systemic resistance) (Ferrigo, 2010; Morris et al., 1998; Harman, 2004) nel caso di NRRL 13540 invece si può ipotizzare, essendo gli studi ancora in corso, che l'effetto di contenimento sia legato ad una azione di inibizione diretta nei confronti di *F. verticillioides*. Infatti nei tessuti in cui si è registrata un minor livello di colonizzazione da parte di *F. verticillioides* si è osservato contestualmente un aumento nel livello di colonizzazione endofitica da parte di *A. zeae*, situazione che non si è verificata nel caso di T22. Gli studi condotti in vitro, da altri autori, supportano ulteriormente questa ipotesi poiché hanno evidenziato che l'azione di controllo svolta da *A. zeae* nei confronti di *F. verticillioides* è legata alla capacità del BCA di sintetizzare delle molecole con capacità antibiotica le pirrocidine A e B (Wicklow et al., 2005), anche se, recenti studi hanno dimostrato anche la capacità di sintesi da parte di *A. zeae* del cerebrosite, molecola in grado di stimolare delle risposte di resistenza che riducono in alcune piante di interesse orticolo e

ornamentale la sensibilità all'attacco di patogeni appartenenti al genere *Fusarium* . (Umemura et al.,2004)

Qualunque sia il meccanismo espresso dai due BCA, risulta interessante osservare che l'effetto finale di contenimento nel livello di colonizzazione e contaminazione della granella alla raccolta, non risulta solamente legato alla capacità da parte di *T. harzianum* o *A. zeae* di controllare le infezioni che avvengono attraverso il sito di applicazione dell'agente di controllo biologico seme e radici che, come già discusso, sono di secondaria importanza, ma anche di quelle che avvengono attraverso le altre vie di infezione, sete e soluzioni di continuità causate dall'azione trofica della piralide, che avvengono in organi e in tempi molto distanti da quelli in cui è stato applicato l'agente di controllo biologico. Inoltre i BCA hanno dimostrato una efficacia dell'azione che si protrae per un periodo che copre tutto il ciclo di sviluppo della pianta, facendo registrare un livello di colonizzazione più ridotta in radici, fusto, sete e cariossidi a diversi stadi di maturazione, protezione che sarebbe impensabile pensare di ottenere con l'impiego di principi attivi di origine chimica se non tramite applicazioni ripetute per più volte (Causin et al., 2010 b; Causin et al., 2010 d).

Concludendo, sebbene sia l'applicazione di prodotti fitosanitari, sulle infiorescenze femminili sette giorni dopo l'emissione, sia la concia del seme con agenti di controllo biologico, si siano rivelati interventi efficaci nel controllare la colonizzazione da parte di *F.verticillioides* e la contaminazione da fumonisine della granella alla raccolta, in tutte le prove realizzate, l'analisi statistica dei dati ha rivelato che l'efficacia dei trattamenti è risultata significativamente correlata alle caratteristiche climatiche dell'area e dell'anno in cui le prove sono state realizzate. Caratteristiche che possono aver influito sia sulla vitalità di *F.verticillioides* e sulla sua capacità di sintesi delle fumonisine, ma anche sulla vitalità e efficacia degli agenti di controllo biologico e delle molecole chimiche come sullo stato fitosanitario della pianta di mais, risulta quindi indispensabile approfondire ulteriormente le ricerche al fine di mettere a punto protocolli di controllo integrato che prevedano l'impiego delle strategie di controllo diretto e indiretto più efficaci a seconda dell'areale di coltivazione del mais in cui si sta operando.

Bibliografia

- A.A.V.V., 2006. *Mais e sicurezza alimentare*. Ed. Veneto Agricoltura, Sezione per l'innovazione e lo sviluppo rurale.
- Battilani, P., Barbano, C., Bertuzzi, T., Marocco, A., Pietri, A., Scandolara, A., Scudellari, D., 2008. Micotossine in Emilia-Romagna, risultati incoraggianti. *Informatore Agrario* 64 (15), 39-41.
- Bermudez, A. J., Ledoux, D. R., and Rottinghaus, G. E., 1995. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducklings. *Avian Dis.* 39:879–886.
- Bermudez, A. J., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., and Bennett, G. A., 1997a. The individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins moniliformin and fumonisin B1 in turkeys. *Avian Dis.* 41:304–311.
- Bermudez, A. J., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Stogsdill, P. L., and Bennett, G. A., 1997b. Effects of feeding *Fusarium fujikuroi* culture material containing known levels of moniliformin in turkey poults. *Avian Pathol.* 26:565–577.
- Causin R., Cecchinato R., Bailoni L., Rasera R., Scopel C., 2009 b. Sete del mais, facile ingresso alle micotossine. Supplemento a L'Informatore Agrario. 2009 16: 14-17.
- Causin R., Mori N., Rasera R., Pavanello R., Bozzolan M., Gambetta S., Tealdo E., 2010 a. Effetto di trattamenti insetticidi e fungicidi, effettuati in epoche diverse, sullo stato fitosanitario del mais. Articolo in fase di pubblicazione.
- Causin R., Rasera R., Ballan R., 2010 b. *Acremonium zeae* maize endophytic colonization, effect on *Fusarium verticillioides* kernel colonization and fumonisin contamination. Articolo in fase di pubblicazione.

- Causin R., Rasera R., Costa E., 2010 c. Effects of fungicides on *Fusarium verticillioides* kernel colonization and fumonisin B1 and B2 contamination. Articolo in fase di pubblicazione.
- Causin R., Rasera R., Ferrigo D., Bologna S., Rossi G., 2010 d. *Trichoderma harzianum* strain T22 seed treatment effect on *Fusarium verticillioides* maize kernel colonization and fumonisin contamination. Articolo in fase di pubblicazione.
- Causin R., Rasera R., Scopel C., Tarlazzi S., 2010 e. Effect of maize seed-treatments on *Fusarium verticillioides* infection and fumonisin contamination. Articolo in fase di pubblicazione.
- Causin R., Scopel C. e Rasera R. , 2009 a. Conoscere le vie infettive per combattere le fumonisine. L'informatore agrario. 15: 64-68.
- Ferrigo D., Piccolo E., Scopel C., Rasera R., Causin R., 2010. *Trichoderma harzianum* strain T22 induces in maize systemic resistance against *Fusarium verticillioides*. Articolo in fase di pubblicazione.
- Glm, 2008. Mycotoxin contamination in unprocessed cereals - some data from Italy. V Fusarium Forum, 10-11 gennaio 2008. http://www.micotossine.it/public/pag_554.pdf
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M., 2004a. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2, 43-56.
- Kachroo, A. He, Z., Patkar, R., Zhu, Q., Zhong, J., Li, D., Ronald, P., Lamb, C., Chattoo B.B. 2003 Induction of H₂O₂ in Transgenic Rice Leads to Cell Death and Enhanced Resistance to Both Bacterial and Fungal Pathogens. Transgenic Research. 12, 577-586.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Bottalico, A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. European Journal of Plant Pathology 108 (7), 597–609.

- Marijanovic, D. R., Holt, P., Norred, W. P., Bacon, C.W., Voss, K. A., Stancel, P. C., and Ragland, W. L., 1991. Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. *Poult. Sci.* 70:1895–1901.
- Morris, S. W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C. C., Frederiksen, R. A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S., and Uknes, S. 1998. Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11,643-658
- Munkvold G.P., 2003 a. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 99-116
- Munkvold G.P., 2003 b. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705-713, 2003.
- Munkvold, G.P., and O'Mara, J.K. 2002. Laboratory and growth chamber evaluation of fungicidal seed treatments for maize seedling blight caused by *Fusarium* species. *Plant Disease*, 86:143-150.
- Nelson, P.E., 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117 (1), 29–36.
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78 (1–2), 21–37.
- Rasera R., Causin R., Scopel C., 2010. Conoscere le vie infettive per combattere le fumonisine
- Repka, V. 1999. Improved Histochemical Test for In Situ Detection of Hydrogen Peroxide in Cells Undergoing Oxidative Burst or Lignification. *Biologia Plantarum*. 42, 599-607.

- Segvic M.; Pepeljnjak S., 2003. Distribution and fumonisin B1 production capacity of *Fusarium moniliforme* isolated from corn in Croatia. *Periodicum biologorum* 105 (3): 275-279.
- Smith, G. W., Constable, P. D., Smith, A. R., Bacon, C. W., Meredith, F. I., Wollenberg, G. K., and Haschek, W. M., 1996. Effects of fumonisin-containing culture material on pulmonary clearance in swine. *Am. J. Vet. Res.* 57:1233–1238
- Soriano, J.M., Dragacci, S., 2004. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International* 37 (10), 985–1000.
- Tealdo E., Barcarolo R., Gambetta S., Causin R., Rasera R., Bonini Baraldi A., Checchetto F., Padoan M., 2009. Esiti di un monitoraggio quinquennale sulla presenza di micotossine nei cereali del Veneto. Terzo congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 settembre 2009.
- Umemura K., Tanino S., Nagatsuka T., Koga J., Iwata M., Nagashima K., Amemiya Y., 2004. Cerebroside Elicitor Confers Resistance to *Fusarium* Disease in Various Plant Species. *Phytopathology* 94 (8): 813-818
- Voss, K. A., Norred, W. P., Plattner, R. D., and Bacon, C. W., 1989. Hepatotoxicity and renal toxicity in rats of corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Food Chem. Toxicol.* 27:89–96
- Voss, K. A., Plattner, R. D., Bacon, C. W., and Norred, W. P., 1990. Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B1 and B2 content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material. *Mycopathologia* 112:81–92.
- Weibking, T. S., Ledoux, D. R., Bermudez, A. J., Turk, J. R., Rottinghaus, G. E., Wang, E., and Merrill, A. H., Jr., 1993. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material,

containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. *Poultry Science* 72:456–466.

Wicklow D.T., Roth R., Deyrup S.T., Gloer J.B., 2005. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research* 109 (5):610-618.

Wilke A.L., Bronson C.R., Tomas A., Munkvold G.P., 2007. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Disease* 91 (9), 1109–1115.

Wilke A.L., Bronson C.R., Tomas A., Munkvold G.P., 2007. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Disease* 91 (9), 1109–1115.

Zhou, F., Menke, F.L.H., Yoshioka, K., Moder, W., Shirano, Y., Klessig, D.F. 2004. High humidity suppresses ssi4-mediated cell death and disease resistance upstream of MAP kinase activation, H₂O₂ production and defense gene expression. *The Plant Journal* 39, 920–932.

Ringraziamenti:

Vorrei ringraziare il Prof. Roberto Causin, supervisore del progetto di ricerca, che con competenza, professionalità, dedizione ed ineguagliabile pazienza mi ha affiancato in tutte le fasi di realizzazione di questo progetto di ricerca ed inoltre le aziende e gli enti, nelle persone sotto riportate, che a vario titolo hanno reso possibile la realizzazione delle prove sperimentali, in ordine alfabetico:

Associazione Italiana Raccoglitori, Essicatori, Stocicatori: Gianfranco Pizzolato.

Basf Italia S.p.A.: Dott. Stefano Tarlazzi.

Bayer CropScience: Dott. Giovanni Arcangeli.

Cerealicola Rossi S.r.l.: Ing. Giovanni Rossi.

Consorzio Agrario Lombardo Veneto: Emilio Gaspari, Sandro Bologna, Marco Pavani.

Gruppo di Lavoro Micotossine: Dott. Enrico Costa.

Intrachem Bio Italia S.p.A.: Dott. Massimo Benuzzi.

Istituto Professionale di Stato per l'Agricoltura e l'Ambiente "D.Sartor" Castelfranco Veneto: Dott.
Renato Ballan.

Istituto Tecnico Agrario "O. Munerati", Rovigo: Dott. Luisa Tibaldo e studenti.

Kws Italia: Dott. Leopoldo Nurti, Dott. Roberto Cecchinato.

Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Dipartimento di Scienze degli Alimenti e della
Nutrizione: Prof. Amedeo Pietri.

Università degli studi di Padova, Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali:
Dott. Nicola Mori.

Università degli studi di Padova, Dipartimento Territorio e Servizi Agro-forestali, Sezione
Patologia Vegetale: Ch.mo Prof. Vittore D'Ambra, Dott.essa Cristina Scopel, Dott. Davide
Ferrigo, Dott.essa Genny Fanchin, Marco Bellonzi, Dott. Marco Stefenatti, Dott.
Massimiliano Mondin, Severino Zanella, tutti i tesisti e collaboratori.

Veneto Agricoltura: Dott. Luigino Disegna, Dott.essa Emma Tealdo, Dott. Stefano Gambetta, Dott.
Renzo Converso.

