

I GEORGOFILI

Quaderni
2008-IV



MICOTOSSINE NEI CEREALI. RISULTATI DEL PROGETTO INTERREGIONALE «MICOCER»

Firenze, 11 dicembre 2008



EDIZIONI POLISTAMPA

*Volume pubblicato con il contributo finanziario
del Progetto "Miglioramento qualitativo delle produzioni cerealicole
in relazione alla presenza di micotossine" (MICOCER), realizzato
nell'ambito del Programma Interregionale Sviluppo Rurale, sottoprogramma Innovazione
e Ricerca, con il contributo della Regione Lombardia in qualità di capofila.*

Copyright © 2009
Accademia dei Georgofili
Firenze
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili»
Anno 2008 - Serie VIII - Vol. 5 (184° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Edizioni Polistampa
Via Livorno, 8/32 - 50142 Firenze
Tel. 055 737871 (15 linee)
info@polistampa.com - www.polistampa.com
Sede legale: Via Santa Maria, 27/r - 50125 Firenze

ISBN 978-88-596-0664-2

Servizi redazionali, grafica e impaginazione
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

INDICE

<i>A Ersilio Desiderio</i> di MARIA GRAZIA D'EGIDIO, ANGELO VISCONTI	7
ELENA BRUGNA <i>Il bando "Miglioramento qualitativo delle produzioni cerealicole in relazione alla presenza di micotossine" e il Progetto "Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali (MICOCER)"</i>	9
ERSILIO DESIDERIO <i>Obiettivi e articolazioni del progetto interregionale MICOCER</i>	15
CARLO BRERA, FRANCESCA DEBEGNACH, BARBARA DE SANTIS, ELENA PANNUNZI, CLARA BERDINI, ELISABETTA PRANTERA, MARINA MIRAGLIA <i>Validazione di metodi immunoenzimatici per la determinazione delle micotossine in campioni di cereali</i>	23
MICHELANGELO PASCALE, MIRIAM HAIDUKOWSKI, ANGELO VISCONTI, GABRIELLA AURELI, MARIA GRAZIA D'EGIDIO, ERSILIO DESIDERIO, LUCA PLIZZARI, MARIA CORBELLINI <i>Confronto tra metodi ELISA e HPLC per la determinazione del deossinivalenolo (DON) in frumento tenero e duro</i>	47
GABRIELLA AURELI, MARIA GRAZIA D'EGIDIO, ANDREINA BELOCCHI, ERSILIO DESIDERIO <i>Monitoraggio delle produzioni nazionali di frumento duro per la presenza di deossinivalenolo (DON)</i>	57

<p>LUCA PLIZZARI, ANDREA BRANDOLINI, ERSILIO DESIDERIO <i>Monitoraggio della presenza di deossinivalenolo (DON) nella granella di frumento tenero</i></p>	69
<p>ALBERTO VERDERIO, NICOLA BERARDO, ALDA FERRARI, PAOLO LAGANÀ, CHIARA LANZANOVA, AMEDEO PIETRI <i>Le micotossine nelle produzioni italiane di mais</i></p>	79
<p>ERSILIO DESIDERIO, GABRIELLA AURELI, DARIO CONTI, GIULIANO MAZZIERI, MICHELANGELO PASCALE, ANDREINA BELOCCHI, MAURO FORNARA <i>Percorsi produttivi per la prevenzione della contaminazione da deossinivalenolo (DON) nel frumento duro</i></p>	93
<p>MASSIMO BLANDINO, AMEDEO REYNERI, MICHELANGELO PASCALE, MIRIAM HAIDUKOWSKI, MARIA CORBELLINI, LUCA PLIZZARI, GIULIANO MAZZIERI, DIEGO SCUDELLARI <i>Percorsi produttivi per la prevenzione della contaminazione da deossinivalenolo nel frumento tenero</i></p>	105
<p>AMEDEO REYNERI, MASSIMO BLANDINO, ALBERTO BONDI, GIANNI COLOMBARI, TERESINA MANCUSO, AMEDEO PIETRI <i>Percorsi produttivi per la prevenzione delle micotossine nel mais</i></p>	121
<p>GIANFRANCO PIVA, AMEDEO PIETRI, ANTONIO GALLO <i>Micotossine: fattore limitante nelle produzioni animali</i></p>	133

A Ersilio Desiderio

Questo volume, che riporta gli atti del Convegno tenutosi l'11 dicembre 2008, è stato curato dal Dott. Ersilio Desiderio, coordinatore scientifico del progetto MICOCER, il quale ha profuso il suo impegno, "grande" fino all'ultimo giorno, prima di lasciarci per sempre il 27 marzo 2009. Ed è proprio alla memoria di Ersilio che tutti gli autori e i partecipanti al progetto vogliono dedicare il volume, come giusto riconoscimento per la passione da lui dedicata al progetto stesso.

La tematica delle micotossine e della sicurezza d'uso dei cereali, lo aveva affascinato fin dai tempi della sua attività di segretario del Comitato Nazionale per le Scienze Agrarie del CNR, da lui svolta dal 1992 al 1999, quando seguiva con particolare attenzione l'attività scientifica e le vicende dell'allora Istituto di Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali del CNR diventato poi Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari.

Con Ersilio è iniziata un'intensa collaborazione tra l'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura e il CNR nel settore delle micotossine, collaborazione che si è sviluppata sempre più, allargandosi ad altri enti, fino a raggiungere il culmine con il progetto interregionale "Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali (MICOCER)" che ha raggruppato tutte le principali istituzioni nazionali nel settore delle micotossine. Questo progetto è stato per Ersilio un importante traguardo ed al tempo stesso motivo di grande orgoglio. Va riconosciuto che è stato possibile realizzare il progetto grazie alla sua capacità di far convergere, su obiettivi strategici, gruppi di ricerca di diversa estrazione e con diversi interessi.

Ersilio Desiderio aveva capacità straordinarie di mediazione per la realizzazione di obiettivi a lungo termine di grande portata e riusciva a far superare inevitabili difficoltà soprattutto di natura corporativa, grazie al fatto di aver

vissuto pienamente, e con passione, realtà diverse della ricerca pubblica in agricoltura.

Egli era dotato infatti di una forte personalità e di un'elevata capacità professionale e organizzativa, che lo hanno portato a ricoprire importanti incarichi fino ad essere il primo Direttore Generale del Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Ente nato dalla fusione degli ex Istituti di ricerca e sperimentazione agraria, per la cui realizzazione aveva a lungo e con impegno lottato.

Maria Grazia D'Egidio
Angelo Visconti

Il bando “Miglioramento qualitativo delle produzioni cerealicole in relazione alla presenza di micotossine” e il Progetto “Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali (MICOCER)”

La Regione Lombardia, in attuazione del Programma regionale di ricerca in campo agricolo 2004-2006¹ e del “Programma Interregionale “Sviluppo rurale”, sottoprogramma “Innovazione e ricerca”, promosso e finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali², a inizio 2005 ha emanato un bando finalizzato alla selezione e al finanziamento di un progetto di ricerca inerente il “Miglioramento qualitativo delle produzioni cerealicole in relazione alla presenza di micotossine”.

Si tratta di uno degli undici Progetti interregionali nati nel 2004 in applicazione della legge 23 dicembre 1999, n. 499, e attivati con modalità di intervento innovative per il finanziamento della ricerca agricola di livello interregionale. Tale modalità di intervento è stata condivisa e adottata dalle Regioni italiane e dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali che hanno individuato nella Rete Interregionale per la ricerca agraria, forestale, acquacoltura e pesca il supporto alla definizione di metodologie comuni per l’attuazione di questi Progetti Interregionali³.

La Regione Lombardia ha operato e opera tuttora in qualità di soggetto capofila, anche in nome e per conto delle Regioni Abruzzo, Basilicata, Campania, Emilia Romagna, Friuli Venezia Giulia, Lazio, Marche, Molise, Piemonte, Puglia, Sicilia, Toscana, Umbria, Veneto che hanno aderito formalmente all’iniziativa (di seguito Regioni aderenti).

* *Regione Lombardia Direzione Generale Agricoltura*

¹ D.g.r. 13 ottobre 2003, n. 7/14531, Bollettino ufficiale della Regione Lombardia 16 ottobre 2003, n. 42, 2° Supplemento ordinario.

² Decreto MiPAF 23 dicembre 2003, n. 25279 ai sensi della Legge 23 dicembre 1999, n. 499.

³ La rete per la Ricerca agraria, forestale, acquacoltura e pesca è stata riconosciuta dalla Conferenza dei Presidenti delle Regioni e delle Province autonome il 4 ottobre 2001.

Questa iniziativa dedicata alle micotossine nei cereali è stato un impegno qualificante per le Regioni che, riunite in un Comitato di progetto, in fase di elaborazione del bando e selezione dei progetti pervenuti, hanno svolto le seguenti funzioni:

- definire i contenuti progettuali specifici dell'Invito, tenendo in considerazione l'ambito di riferimento della scheda-progetto elaborata dalla Rete dei referenti regionali e contenuta nel documento MiPAF approvato dalla Conferenza Stato Regioni il 26 novembre 2003;
- stabilire i limiti e le condizioni dell'Invito, compatibilmente con le procedure in atto presso la Regione Lombardia;
- collaborare con il Comitato di valutazione della Regione Lombardia alla valutazione delle proposte progettuali.

Nella fase di realizzazione del progetto, tuttora in corso, l'attività si concretizza in:

- garantire l'effettiva interregionalità del progetto sia nella fase di realizzazione che in quella di diffusione dei risultati ottenuti;
- accertarsi della complementarità e della non sovrapposizione rispetto a ricerche già finanziate ai rispettivi livelli nazionale, regionale e/o sottoregionali del progetto finanziato;
- garantire il monitoraggio in corso d'opera del progetto;
- vigilare sull'efficacia delle azioni volte a garantire il trasferimento dei risultati e il collegamento funzionale tra le istituzioni scientifiche coinvolte e i Servizi di Sviluppo delle Regioni interessate.

LE MOTIVAZIONI DELLA SCELTA DELLA TEMATICA

Il comparto dei cereali ha un ruolo molto importante nell'agricoltura italiana rappresentando circa l'11% della produzione ai prezzi di base dell'agricoltura nazionale (Istat 2003), che nell'anno in esame è risultata pari a poco meno di 44.500 milioni di euro. Tra i cereali, le colture che assumono il maggior peso in termini economici sono il mais, il frumento duro e il frumento tenero la cui produzione ai prezzi di base è stata valutata, per lo stesso anno, pari, rispettivamente a 1.841, 1.109 e 671 milioni di euro; le tre colture citate rappresentano, quindi, oltre l'80% della produzione ai prezzi di base dei cereali nel loro complesso.

L'insieme dei cereali da granella (frumenti, mais, orzo, riso, avena, sorgo, segale, triticale) costituisce circa il 58% della superficie a seminativi, con valori abbastanza simili tra le tre grandi ripartizioni territoriali. Tale superficie

supera di gran lunga il 60% del totale dei seminativi qualora si considerino anche i cereali foraggeri (silomais, erbai, ecc.). Le colture di frumento duro e mais, le cui superfici sono risultate in sensibile crescita nel 2004, da sole rappresentano il 40% della superficie a seminativi in Italia.

Le micotossine sono metaboliti secondari di funghi parassiti; sono presenti naturalmente ed endemicamente nelle derrate agricole. Concentrazioni critiche di micotossine nelle matrici destinate all'alimentazione umana e animale hanno importanti implicazioni legate alla sicurezza alimentare. Il tenore di micotossine in tali matrici è stato oggetto, negli ultimi anni, di regolamentazione in molti paesi del mondo e ciò ha avuto importanti riflessi sugli scambi commerciali e sulla collocabilità delle derrate.

I cereali possono essere contaminati da micotossine durante la coltivazione, l'essiccazione e lo stoccaggio. Alcune micotossine si sviluppano soltanto in campo; altre contaminano le colture prima della raccolta per poi svilupparsi nelle fasi successive. In alcuni casi si assiste allo sviluppo di micotossine nelle fasi di essiccazione e stoccaggio, pur non avendone rilevata la presenza durante la coltivazione e la raccolta. In particolare le “*fusarium*-tossine” sono oggetto di grande attenzione da parte della Commissione Europea, che ne ha in corso la regolamentazione.

I CONTENUTI DEL BANDO

Due sono gli obiettivi che le Regioni hanno ritenuto prioritari:

- prevenire le contaminazioni da micotossine nei cereali, mediante la messa a punto di pratiche agronomiche e di processi di raccolta e gestione delle partite stoccate;
- migliorare la collocabilità e la qualificazione delle partite di cereali in funzione della destinazione d'uso delle partite.

Lo stesso Comitato ha effettuato una ricognizione sulle attività già svolte nell'ambito della contaminazione da micotossine dei cereali e ha individuato le azioni prioritarie e la motivazione per ciascuna di esse. Tenuto conto delle risorse disponibili, due azioni sono state ritenute obbligatorie:

1. Indagine sull'estensione, sul grado e sul tipo di contaminazione delle partite commerciali nelle diverse fasi (dalla coltivazione alla prima utilizzazione).
In passato e a più riprese sono state avviate indagini conoscitive per comprendere la portata del fenomeno in alcune produzioni cerealicole, indagini che hanno consentito di acquisire dati ancora parziali. Al fine di ottenere un corpo di dati sufficientemente esteso, come bacino di provenienza e

confrontabilità, era a questo punto necessaria una indagine più articolata e coordinata che coniugasse la necessità di una migliore conoscenza del fenomeno alla messa a punto di misure per la gestione del problema lungo tutta la filiera produttiva. L'indagine doveva essere modulata sulla base delle conoscenze fin qui acquisite.

2. Definizione di percorsi produttivi (dalla coltivazione alla prima utilizzazione) funzionali alla destinazione d'uso.

Numerose sono state le ricerche volte a mettere in luce l'influenza dei singoli fattori agronomici sul livello di contaminazione da funghi delle partite di cereali.

Meno indagata era stata, al momento della pubblicazione del bando, l'influenza delle tecniche di processamento dei cereali a partire dalla raccolta e delle tecniche di conservazione. Le normative vigenti, gli orientamenti delle istituzioni che a vari livelli possono intervenire nella regolazione del settore e le esigenze degli utilizzatori finali imponevano un approccio integrato che fornisse indicazioni su come produrre partite con "livelli soglia" di micotossine definiti in funzione della destinazione d'uso. Questo approccio integrato doveva coinvolgere sia la produzione di campo che le fasi di primo trattamento post raccolta e conservazione.

Il Comitato ha poi ritenuto di lasciare alla capacità di sviluppare sinergie e complementarità, anche di ordine finanziario, con altri progetti, la realizzazione di alcune linee di ricerca sviluppate recentemente quali la validazione di strumenti per la prevenzione e la gestione della contaminazione da micotossine. Tali linee avevano lo scopo di mettere a punto tecnologie che potessero supportare gli operatori del settore nella gestione della contaminazione da micotossine.

I settori di interesse principali riguardavano sia la produzione di campo che le fasi del post raccolta e in particolare per:

- modelli di supporto decisionale per la previsione del rischio di sviluppo di micotossine;
- metodi di determinazione in tempo reale del livello di micotossine nelle partite (da utilizzare nelle fasi immediatamente successive alla raccolta per permettere la separazione delle partite).

Le ricerche svolte fino all'emanazione del bando avevano riguardato prevalentemente la fase di implementazione di tali strumenti: il Comitato di progetto ha ritenuto che le azioni prioritarie previste nel bando potessero costituire l'occasione per la fase di validazione.

UN PRIMO BILANCIO

Questa iniziativa ha costituito uno dei primi casi di gestione di bandi di ricerca a livello interregionale e le Regioni hanno dimostrando un buon livello di collaborazione tra loro e con il partenariato che ha realizzato il progetto di ricerca. Al di là del patrimonio di dati e di informazioni, che saranno oggetto di ulteriori iniziative di comunicazione, va senza dubbio riconosciuto lo sforzo di costruire una rete integrata fra mondo della ricerca, della produzione e delle istituzioni su un tema così importante per la produzione cerealicola nazionale.

RIASSUNTO

L'attenzione dedicata alla presenza di micotossine nella produzione cerealicola è stata, negli ultimi anni, molto elevata sia da parte delle istituzioni che da parte delle filiere produttive per le importanti implicazioni legate alla sicurezza alimentare.

Il tenore di micotossine in tali matrici è stato oggetto di regolamentazione in molti paesi del mondo con importanti riflessi sugli scambi commerciali e sulla collocabilità delle derrate sui mercati nazionali ed esteri.

Le indagini condotte in passato sull'argomento, pur se di difficile generalizzazione per la limitata copertura territoriale delle stesse e per le differenti modalità di campionamento e metodiche analitiche utilizzate, hanno evidenziato tenori di micotossine talora elevati e tali da suggerire la necessità di approfondire lo studio sulla reale portata del problema e sulle cause predisponenti. Consapevoli di tale necessità, nell'ambito del Programma Interregionale Sviluppo Rurale, Sottoprogetto Innovazione e Ricerca, le Regioni Abruzzo, Basilicata, Campania, Emilia-Romagna, Friuli Venezia Giulia, Lazio, Marche, Piemonte, Puglia, Sicilia, Toscana, Umbria, Veneto, attraverso un bando di ricerca coordinato dalla Regione Lombardia in qualità di capofila, hanno sollecitato la comunità scientifica nazionale ad affrontare il tema con approccio interdisciplinare. Il percorso istituzionale intrapreso ha rappresentato una modalità innovativa di selezione e finanziamento dei progetti di ricerca e l'articolo ne approfondisce alcuni aspetti unitamente ai contenuti tecnici del bando.

ABSTRACT

The attention dedicated to mycotoxins presence in cereals has been very highly paid, in the past several years, both by institutions and producers because of the important implications related to the food safety.

Mycotoxins level in cereals has been submitted to be regulated in many countries worldwide, with important reflections on free international trades in relation to the observance of the different laws.

Investigations about this subject carried out in the past, even though difficult to be compared one with another because of the limited areas of interest and because of the

different sampling and analytical procedures, have sometimes evidenced so high mycotoxins levels, that the need of further studies about the real consistency and predisposition causes of the problem has arisen.

Aware of this necessity, within the Interregional Program of Rural Development, sub-project Innovation and Research, the Abruzzo, Basilicata, Campania, Emilia-Romagna, Friuli Venezia Giulia, Lazio, Marche, Piemonte, Puglia, Sicilia, Toscana, Umbria and Veneto Regions, through a call for a research project coordinated by Lombardia Region, have stimulated the national scientific community to face the subject with an interdisciplinary approach.

This institutional action has been a new way to select and finance research projects; this article is about some aspects of the institutional path and the technical details of the call.

Obiettivi e articolazioni del progetto interregionale MICOCER**

Il consumo di cereali è alla base dell'alimentazione dell'uomo e degli animali soprattutto nelle zone dell'area del Mediterraneo, dove sono ampiamente diffusi e coltivati secondo le esigenze climatiche di ciascuna coltura.

La gran parte del territorio agricolo italiano è destinato ai cereali, che occupano una superficie di circa 4 milioni di ettari; in particolare il frumento duro (*Triticum durum* Desf.) rappresenta la coltura principale del Meridione dove spesso viene coltivato in aree agricole nelle quali non sussistono alternative colturali. Dalle regioni meridionali proviene infatti la maggior parte del frumento duro, che costituisce la materia prima fondamentale per la produzione delle paste alimentari, e per il quale il nostro Paese è il maggiore produttore europeo.

La coltura del frumento tenero (*Triticum aestivum* L.), utilizzato prevalentemente per la panificazione, è concentrata soprattutto nel Centro-Nord e copre solo in parte il fabbisogno nazionale. Il nostro Paese si colloca ai primi posti in Europa, anche per la produzione di mais (*Zea mays* L.), coltura diffusa nelle aree settentrionali, soprattutto in Veneto e Lombardia, e destinato in larga misura all'alimentazione animale.

Negli ultimi decenni, tuttavia, la distribuzione tradizionale delle colture cerealicole nell'ambito del territorio agricolo nazionale ha visto un graduale cambiamento, dovuto soprattutto a un progressivo spostamento della coltivazione del frumento duro dalle regioni meridionali e insulari, dove prima era esclusivamente localizzata, verso le regioni dell'Italia centro-settentrionale, spesso in sostituzione del frumento tenero. Tale fenomeno ha portato gli agricoltori a dover affrontare nuove problematiche, legate soprattutto alla capacità di adattamento di questo cereale a situazioni climatiche diverse da quelle di

* CRA-QCE, *Unità di Ricerca per la Valorizzazione qualitativa dei Cereali*, Roma

** La stesura di questa introduzione, già iniziata da E. Desiderio, è stata completata da M.G. D'Egidio e G. Aureli che hanno cercato di interpretare, per quanto possibile, le sue idee in merito

origine e per le quali la ricerca legata al miglioramento genetico ha fornito sicuramente un grande contributo soprattutto in relazione agli aspetti agronomici, fitopatologici e qualitativi.

Attualmente l'attenzione dei consumatori è sempre più orientata sia verso gli aspetti nutrizionali-salutistici che verso quelli legati alla sicurezza d'uso degli alimenti. In quanto a caratteristiche nutrizionali i cereali rappresentano una fonte privilegiata di nutrienti, soprattutto carboidrati e proteine, e per questo si trovano alla base della piramide alimentare umana. Oltre ai costituenti di base, i cereali risultano ricchi anche di composti bioattivi quali, ad esempio, fibre e antiossidanti; proprio in considerazione del ruolo che assumono gli alimenti a base di cereali nella dieta la sicurezza d'uso della materia prima costituisce un elemento imprescindibile della qualità. Tra i principali contaminanti delle colture cerealicole rivestono un ruolo di particolare importanza le micotossine, prodotti tossici del metabolismo secondario di alcuni funghi fitopatogeni.

Sebbene i dati fino ad ora raccolti non coprano tutte le realtà agricole, in molte situazioni nazionali e internazionali sono stati riscontrati tenori di micotossine talora elevati e tali da evidenziare la necessità di approfondire lo studio sia sulle cause predisponenti sia sulla portata del problema (Pietri e Piva, 2000; Reyneri et al., 2004).

Le micotossine che più frequentemente vengono rilevate nei frumenti, nell'orzo e nel mais sono prodotte dai funghi del genere *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* o *F. moniliforme*), del genere *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ocraceus*) e *Penicillium*. Fumonisine (FUM), zearalenone (ZEN) e tricoteceni, fra questi ultimi il deossinivalenolo (DON o "vomitosina") e la tossina T-2, sono tra le più importanti micotossine prodotte da funghi filamentosi a diffusione cosmopolita del genere *Fusarium* spp. presenti nei cereali, alimenti zootecnici e foraggi. Eventi critici di diffusione di micotossicosi da metaboliti di *Fusarium* spp. sono stati registrati in Asia, Europa, Nuova Zelanda, America del Sud e in Italia. Il deossinivalenolo è il metabolita più importante per quanto riguarda il frumento, sia in termini quantitativi che di diffusione, ed è spesso associato ad altre fusariotossine (Lancova et al., 2008).

Significative manifestazioni di fusariosi della spiga sono state osservate a seguito dell'aumento dell'azoto distribuito con la concimazione. Per quanto riguarda i genotipi impiegati, alcune ricerche condotte sia in Europa centrale (Matthies et Buchenauer, 2000) che in Italia (Allegri et al., 2001; Menniti et al., 2003) hanno evidenziato la tendenza ad una maggiore sensibilità nelle varietà di ciclo precoce rispetto a quelle tardive. Tra le agrotecniche più intensive, l'impiego di fungicidi si è dimostrato il metodo più efficace per controllare la fusariosi della spiga e altre importanti malattie del frumento.

La contaminazione da micotossine può aver luogo sia in campo, durante le fasi di coltivazione e di raccolta, sia in magazzino, durante lo stoccaggio, che nelle diverse fasi di trasformazione da parte delle industrie agro-alimentari. Relativamente ai cereali in campo, la formazione di micotossine dipende da numerosi fattori, tra i quali: presenza e patogenicità di funghi tossigeni, suscettibilità delle varietà agli attacchi fungini, stress biotici e abiotici predisponenti le piante alle infezioni fungine, andamento climatico e tecniche colturali favorevoli allo sviluppo dei funghi.

La prevenzione risulta essere la miglior strategia di controllo per ridurre l'accumulo di tossine nelle cariossidi tramite la realizzazione di condizioni sfavorevoli allo sviluppo delle specie fungine tossigene (Riley e Norred, 1999).

Tra le tecniche di contenimento in campo della contaminazione da micotossine nei cereali, Munkvold (2003) individua come elemento di prevenzione fondamentale il miglioramento genetico, ma sottolinea come l'applicazione di tecniche agronomiche corrette possa ridurre in maniera significativa i rischi di elevati tenori di tossine nel corso della fase di coltivazione, sia per il mais, sia per i cereali a paglia.

La problematica relativa alla presenza ed al controllo delle micotossine nei cereali e nei prodotti derivati è affrontata da alcuni anni in Italia con indagini e progetti di ricerca finanziati dall'UE, dagli Enti pubblici, dalle Regioni e dai privati.

Senz'altro più numerose sono le indagini sulla presenza di micotossine nel mais, per lo più condotte nelle regioni dell'Italia settentrionale. Fino a pochi anni fa era diffusa la convinzione che l'accumulo di tali metaboliti tossici avvenisse prevalentemente nelle fasi successive alla raccolta del mais. Prove sperimentali e attività di monitoraggio lungo tutta la filiera hanno messo in evidenza però che la contaminazione da micotossine è elevata in campo e limitata durante lo stoccaggio (Reyneri et al., 2001). Altre ricerche (Reyneri et al., 2002) hanno mostrato l'efficacia dell'essiccazione forzata e dell'aerazione per contenere e uniformare l'umidità della massa accumulata nei silo nonché della movimentazione e ripetuta pulizia della granella, precedente e successiva all'essiccazione, per ridurre la presenza dei metaboliti fungini. Considerato quindi che il principale momento di accumulo di micotossine (specie quelle prodotte da *Fusarium* spp.) si incontra nelle fasi di campo, l'attività di ricerca si è focalizzata sull'influenza di alcune tecniche agronomiche e sugli aspetti entomologici e patologici delle contaminazioni in campo. Il fungo isolato con maggiore frequenza nei campioni di granella di mais è risultato il *Fusarium moniliforme*, che produce le fumonisine. Altre micotossine, come zearalenone, deossinivalenolo e ocratossina A, sono risultate presenti in maniera cospicua solo in caso di elevata piovosità durante la maturazione delle cariossidi (Rey-

neri et al., 2004). Altri lavori hanno evidenziato l'efficacia di alcune scelte agronomiche per limitare la produzione di fusariotossine nella granella di mais quali: scelta varietale (Reyneri et al., 2003), epoca di semina (Blandino et al., 2003), densità colturale, livello delle concimazioni (specie di quelle azotate) ed epoca di raccolta. Al contrario, negli stessi ambienti i trattamenti fitosanitari della semente e la precessione colturale non hanno sortito effetti significativi. I fenomeni fisici capaci di favorire la penetrazione del micelio fungino, come i danni prodotti dalle larve della piralide, sembrano promuovere maggiormente alcune infezioni rispetto ad altre (Alma et al., 2003). I risultati di queste indagini (Verderio et al., 2005) hanno evidenziato che le fumonisine sono le tossine più diffuse nelle partite commerciali di mais del nord Italia; poco meno del 50% degli oltre 1.500 campioni raccolti in un quadriennio presso i centri di stoccaggio della Lombardia ha mostrato concentrazioni di fumonisine superiori a 2000 µg/Kg. Risultati analoghi sono stati ottenuti su campioni di pieno campo prelevati nel biennio 2002-2003 in quattro regioni del Nord (Lombardia, Piemonte, Friuli e Veneto) e in Toscana (Battilani et al., 2005). Sia nei campioni prelevati presso i centri di stoccaggio che in pieno campo, quasi sempre limitata è risultata la contaminazione da DON, ZEA, ZEN aflatossine, anche se queste ultime hanno raggiunto livelli di attenzione nel 2003.

Altre ricerche sono state svolte nell'ambito di progetti finanziati dal Mi-PAF e finalizzate allo studio dei livelli di contaminazione da micotossine in alimenti a uso zootecnico a base di mais (es.: AFLARID e "Prevenzione delle contaminazioni chimiche e da micotossine nei sistemi agrozootecnici per la produzione di latte"). Al di là degli interessanti risultati conseguiti nell'ambito dei diversi programmi di ricerca svolti a livello sia nazionale che regionale, la frammentarietà delle iniziative, spesso dettata da problemi contingenti, non ha consentito di avere un quadro complessivo del livello di contaminazione da micotossine delle principali produzioni cerealicole nazionali, né di disporre di tutti gli elementi utili per l'attivazione di strumenti di supporto decisionale.

In questo contesto è stato avviato il progetto MICOCER.

IL PROGETTO INTERREGIONALE MICOCER

La cerealicoltura italiana deve rispondere alle crescenti esigenze di qualità che i mercati richiedono, sia per gli aspetti tecnologici sia per gli aspetti sanitari. È stata infatti spesso riscontrata una elevata frequenza di partite contaminate, in qualche caso con valori superiori a quelli normati. Poiché la problematica è molto complessa, in quanto i vari fattori predisponenti interagiscono fra loro

in modo sinergico e/o antagonistico, risulta talvolta difficile tradurre i dati attualmente disponibili in informazioni fruibili da parte della filiera produttiva. A testimonianza di queste difficoltà, basti analizzare le contraddizioni esistenti nei vari protocolli operativi (es.: campionamento, metodi di analisi, ecc.) che, da più parti, sono stati proposti e utilizzati negli ultimi anni.

Il monitoraggio delle produzioni dei cereali (frumento duro, frumento tenero e mais), prioritariamente considerati dal programma interregionale, ha tenuto conto della reale diffusione delle specie e delle varietà nonché delle variabili colturali e ambientali esistenti sul territorio. Pertanto, requisito fondamentale per le attività di controllo-riduzione e di gestione delle micotossine è la disponibilità sia di dati complessivi circa i reali livelli di contaminazione delle produzioni sia di alcune indicazioni fondamentali utilizzabili a scopo interpretativo e, in prospettiva, a scopo di previsione-prevenzione circa gli effetti generali del “campo” (bacino di produzione, ambiente pedoclimatico, pratiche agronomiche, andamento stagionale) e dei processi di ammassamento, condizionamento e stoccaggio delle produzioni.

Un problema che richiede particolare e preliminare attenzione è la definizione di valide e adeguate metodologie sperimentali, in grado di colmare le lacune ancora esistenti che limitano enormemente l'efficacia e la trasferibilità dei dati relativi alle attività di monitoraggio e controllo.

A tale riguardo, il progetto si è posto l'obiettivo di affrontare, in via preliminare, i problemi relativi allo sviluppo di un programma di informazione dei vari soggetti coinvolti con la sensibilizzazione al problema delle micotossine, la individuazione, valutazione, attuazione e divulgazione dei piani di campionamento per le micotossine di interesse e la diffusione degli aggiornamenti relativamente alla parte analitica. In questo contesto si inquadrano anche le problematiche connesse con la validazione di alcuni test analitici disponibili in commercio e largamente utilizzati per uno screening rapido di un elevato numero di campioni.

L'esperienza maturata in Italia da diversi gruppi di ricerca converge nell'attribuire primaria importanza al coordinamento dei diversi soggetti della filiera nelle fasi di coltivazione, post-raccolta e trasformazione, evidenziando in pari tempo la necessità di partire da un prodotto di campo più sano e controllato. Fra gli obiettivi del progetto di ricerca è stato inserito anche quello di fornire un contributo in merito alle problematiche sopra delineate, mettendo altresì a disposizione degli operatori della filiera e delle numerose e qualificate competenze scientifiche coinvolte, l'ingente mole di dati derivanti dall'attività di monitoraggio qualitativo delle produzioni cerealicole aziendali e delle reti di sperimentazione varietale su frumento duro, frumento tenero e mais, annualmente realizzate sull'intero territorio nazionale dal CRA.

La disponibilità dei dati del monitoraggio ha una utilità immediata in quanto tali dati forniscono agli operatori agricoli e ai trasformatori indicazioni utili per la programmazione e gestione degli approvvigionamenti.

La validazione preliminare di metodiche analitiche rapide per la determinazione di micotossine nel mais e di DON nei cereali può offrire l'opportunità agli operatori del settore che non possono disporre di laboratori dotati di strumentazione adeguata, di monitorare ugualmente le proprie produzioni con un metodo di analisi altrettanto sensibile, affidabile e meno costoso. L'impianto sperimentale delle indagini agronomiche è stato predisposto per avvicinare il più possibile i risultati ottenuti a una immediata applicabilità nei contesti produttivi e ridurre il più possibile i tempi del trasferimento e della fruibilità degli stessi.

OBIETTIVI DEL PROGETTO

Gli obiettivi del progetto MICOCER possono essere riassunti nei seguenti punti:

1. acquisire informazioni capillari e omogenee circa la presenza delle micotossine (deossinivalenolo per il frumento duro e tenero; deossinivalenolo, zearalenone, aflatossine e fumonisine per il mais), nelle produzioni cerealicole nazionali, attraverso un diffuso monitoraggio territoriale presso le aziende, i centri di stoccaggio e di trasformazione del prodotto;
2. individuare, per ciascuna specie e macroareale oggetto dell'indagine, una rete rappresentativa di ambienti, condizioni colturali e di conservazione del prodotto ai fini della prevenzione dello sviluppo di micotossine;
3. definire percorsi produttivi efficaci e corretti, dal campo alla prima utilizzazione, per l'ottenimento di produzioni di mais e di frumenti a ridotto rischio di contaminazione da micotossine, verificandone la sostenibilità tecnica, economica e ambientale;
4. creare e/o implementare, per ciascuno dei cereali considerati, la banca dati con tutti i risultati del progetto, di semplice e totale fruibilità da parte delle autorità nazionali e locali preposte alla gestione del rischio di contaminazione da micotossine, di tutti gli attori delle differenti filiere cerealicole e della comunità scientifica.

Inoltre, in considerazione della strutturazione del progetto, si è ritenuto opportuno affrontare alcune tematiche non prioritarie (es.: orzo), ma comunque rilevanti per l'importanza del settore produttivo.

RIASSUNTO

Attualmente l'attenzione dei consumatori è sempre più orientata sia verso gli aspetti nutrizionali-salutistici che verso quelli legati alla sicurezza d'uso degli alimenti. I cereali rappresentano una fonte privilegiata di nutrienti e la sicurezza d'uso della materia prima costituisce un elemento imprescindibile della qualità. Tra i principali contaminanti delle colture cerealicole rivestono un ruolo di particolare importanza le micotossine, prodotti tossici del metabolismo secondario di alcuni funghi fitopatogeni.

Gli obiettivi del progetto MICOCER hanno riguardato la rilevazione del grado di contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali come il deossinivalenolo per il frumento duro (*Triticum durum* Desf.) e per il frumento tenero (*Triticum aestivum* L.), lo zearalenone e le fumonisine per il mais (*Zea mays* L.), attraverso l'individuazione di una rete rappresentativa di ambienti, di condizioni colturali e di conservazione del prodotto, ai fini della prevenzione della contaminazione. Sono stati inoltre definiti percorsi produttivi efficaci e corretti, per l'ottenimento di produzioni di mais e di frumenti a ridotto rischio di contaminazione da micotossine. Sulla base dei risultati ottenuti è stata creata una banca dati da utilizzabile ai fini della gestione del rischio di contaminazione da micotossine per i cereali considerati nel progetto.

ABSTRACT

Actually the attention of consumers is more and more directed towards both nutritional-healthy aspects and food safety. Cereals represent a primary source of nutrients and the safety of raw material represents a pre-requisite of quality. Among the main contaminants of the cereal crops a very particular role belongs to the mycotoxins, toxic secondary compounds produced by some phytopathogen strains of moulds.

Main purpose of MICOCER project was the prevention of contamination by the detection of deoxynivalenol in durum wheat (*Triticum durum* Desf.), winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.), zearalenon and fumonisins in maize, in samples of national production regarding environments, growing conditions and storage conditions.

Moreover, with the aim to obtain maize and wheat crops at low risk of contamination by mycotoxins, effective and correct cultivation practices were defined and a database collecting the analytical data will be available in order to allow risk management of the mycotoxins considered in the project.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEGRI A., BUCCI V., PRADOLESI G. (2001): *Effetto di alcuni fungicidi nella difesa del frumento*, «L'Informatore Agrario», 33, pp. 43-45.
- ALMA A., BLANDINO M., LESSIO F. (2003): *Micotossine addio se la piralide è sconfitta*, «L'Informatore Zootecnico», 14, pp. 56-59.
- BATTILANI P., SCANDOLARA A., BARBANO C., PIETRI A., BERTUZZI T., MAROCCO A., BERRARDO N., VANNOZZI G.P., BALDINI M., MIELE S., SALERA E., MAGGIORE T. (2005):

- Monitoraggio della contaminazione da micotossine nel mais*, «L'Informatore Agrario», 6, pp. 47-49.
- BLANDINO M., LAZZARI A., REYNERI A., VANARA F. (2003): *Micotossine? Dipende dall'epoca di semina*, «L'Informatore Zootecnico», 8, pp. 70-75.
- LANCOVA K., HAJSOVA J., KOSTELANSKA M., KOHOUTKOVA J., NEDELNIK J., MORAVCOVA H. AND VANIVA M. (2008): *Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: Milling and baking*, «Food Additives and Contaminants», 25 (5), pp. 650-659.
- MATTHIES A., BUCHENAUER H. (2000): *Effect of tebuconazole (Folicur) and prochloraz (Sportak) treatments on Fusarium head scab development, yield, and deoxynivalenol (DON) content in grains of wheat following artificial inoculation with Fusarium culmorum*, «Journal of plant disease and protection», 107 (1), pp. 33-52.
- MENNITI A.M., PANCALDI D., MACCAFERRI M., CASALINI L. (2003): *Effect of fungicides on Fusarium head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain*, «European Journal of Plant Pathology», 109, pp. 109-115.
- MUNKVOLD G.P. (2003): *Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize*, «Annu. Rev. Phytopathol.», 41, pp. 99-116.
- PIETRI A., PIVA G. (2000): *Occurrence and control of mycotoxins in maize grown in Italy*, Proceeding of the 6th International Feed Production Conference, Piacenza 27-28 November.
- REYNERI A., CAVALLERO A., ACUTIS M., BERARDO P., FERRERO C., MINELLI L., TURLETTI A., SPANNA F., ALMA A., MATTA A., BERGESE S., LAZZARI A., BERSANI L. (2001): *Contenere le micotossine nella granella di mais*, «L'Informatore Agrario», 47, pp. 35-39.
- REYNERI A., BERSANI L., VANARA F. (2003): *Micotossine, questione di scelta varietale*, «L'Informatore Zootecnico», 9, pp. 84-89.
- REYNERI A., BLANDINO M., FERRERO C., BERSANI L. (2002): *Effetto delle operazioni di post-raccolta sulla contaminazione da micotossine nel mais*, «Tecnica Molitoria», 10, pp. 977-994.
- REYNERI A., BLANDINO M., VANARA F., MATTA A., LAZZARI A., ALMA A., LESSIO F., FERRERO C., MINELLI L., CAVALLERO A., TURLETTI A., SPANNA F., BERSANI L. (2004): *Impiego di tecniche agronomiche per contenere le micotossine nella granella di mais*, «L'Informatore Agrario», 6, pp. 45-50.
- RILEY R.T. AND NORRED W.P. (1999): *Mycotoxin prevention and decontamination – a case study on maize*, «Feed Nutr. Agric.», 23, pp. 25-32.
- VERDERIO A., DELLA PORTA G., VALOTI P., FUMAGALLI F., MAZZINELLI G., MARCHESINI P. (2005): *La diffusione delle micotossine nelle produzioni italiane di mais*, «L'Informatore Agrario», 61 (10), pp. 47-51.

CARLO BRERA*, FRANCESCA DEBEGNACH*, BARBARA DE SANTIS*,
ELENA PANNUNZI*, CLARA BERDINI*, ELISABETTA PRANTERA*,
MARINA MIRAGLIA*

Validazione di metodi immunoenzimatici per la determinazione delle micotossine in campioni di cereali

I. INTRODUZIONE

I composti chimici noti con il nome di micotossine sono sostanze ad azione tossica prodotte, in particolari condizioni ambientali, da numerose specie di funghi filamentosi microscopici (Krogh, 1987; Smith, 1998; CAST, 2003).

A causa dell'elevata diffusione e tossicità delle micotossine, del numero crescente di derrate alimentari riconosciuto passibile di contaminazione, dell'impatto sanitario, economico, commerciale ed etico di questi tossici, le Autorità competenti di molti paesi attualmente considerano il problema delle micotossine fra le priorità in tema di sicurezza alimentare.

Da un punto di vista normativo, i limiti massimi ammissibili per le principali micotossine nei prodotti alimentari sono riportati, a livello comunitario, nel Regolamento CE/1831/2003 e per le sole fusariotossine nel più recente Regolamento CE/1126/2007.

Per quanto riguarda la valutazione del livello di tossina nei prodotti alimentari, ciascuna fase della sequenza analitica è affetta da un errore sperimentale che non è equamente ripartito tra i diversi passaggi (campionamento, preparazione del campione e analisi quantitativa).

A causa della distribuzione della contaminazione delle micotossine fortemente eterogenea nelle derrate alimentari, il campionamento rappresenta una fonte di errore molto rilevante. Pertanto, la individuazione di piani di campionamento adeguati allo scopo rappresenta il punto di partenza per ottenere dati analitici affidabili (Miraglia, 2008; Whitaker, 2006).

La preparazione del campione rappresenta un passaggio a volte fortemente

* *Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità*

sottostimato nella valutazione dell'errore totale dell'analisi, e un non adeguato trattamento del campione può portare a scarsa ripetibilità ed esattezza nelle analisi. L'errore associato alla preparazione del campione è fortemente correlato alla granulometria del campione dopo la macinazione, che a sua volta dipende dal grado di omogeneità che si ottiene. Infatti, la varianza associata alla preparazione del campione è strettamente dipendente dalle dimensioni delle unità particellari costituenti il campione macinato. Pertanto, per ridurre la varianza o si diminuiscono quanto più possibile le dimensioni delle particelle nella fase di macinazione (granulometria fine), aumentando di conseguenza il numero di particelle per unità di massa, o si aumenta la grandezza del campione da destinare all'analisi.

L'analisi quantitativa delle micotossine, e di conseguenza la sua ottimizzazione, rappresenta a sua volta una fase cruciale dell'intero processo volto alla determinazione della contaminazione presente nei prodotti alimentari. La scelta del metodo più indicato per lo scopo prefissato (*fit for purpose*) costituisce il primo elemento da valutare per una corretta quantificazione. La disponibilità di metodi ufficiali cui fare riferimento, corredati di informazioni statistiche e parametri in grado di permettere la valutazione delle *performance* del metodo stesso, è di fondamentale importanza. I criteri di rendimento (*performance*) che un metodo deve avere per garantire la necessaria affidabilità sono indicati nel Regolamento CE/401/2006, insieme con i metodi di campionamento da adottare per il controllo ufficiale.

Il controllo sulla intera filiera produttiva impone l'analisi delle micotossine in punti diversi della lavorazione e spesso sono operatori privi di una adeguata formazione a dover eseguire analisi per la valutazione della merce. Diventa quindi molto importante affiancare metodologie robuste ma complesse, come la determinazione in HPLC, con metodi rapidi e di più semplice gestione (*user friendly*), che permettano anche il coinvolgimento di personale non altamente qualificato.

Attualmente, a livello comunitario, i metodi di riferimento validati disponibili sono quelli pubblicati sotto forma di norme o *standard* dal Comité Européen de Normalisation (CEN). Attualmente tutti i metodi CEN disponibili per la determinazione delle micotossine sono metodi di analisi in HPLC.

Manca la disponibilità, a livello comunitario, di studi di validazione su metodi immunoenzimatici quantitativi (kit ELISA) che possano rappresentare una valida alternativa alle metodiche tradizionali purché si dimostrino sufficientemente sensibili, precisi, accurati, selettivi e robusti.

Il progetto interregionale MICOCER (MICOtossine dei CEReali), Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni ce-

realicole nazionali, nasce con lo scopo, tra gli altri, di fornire un quadro complessivo del livello di contaminazione da micotossine nel mais e nei frumenti attraverso l'acquisizione di informazioni diffuse, comparabili e rappresentative delle diverse condizioni di coltivazione. Pertanto, al fine di garantire la affidabilità dei risultati provenienti dalle analisi dei laboratori coinvolti nello studio di monitoraggio, si è resa necessaria la condizione di valutare preventivamente l'efficienza del metodo e dei laboratori coinvolti, attraverso l'organizzazione di studi interlaboratorio di validazione. Dato l'elevato numero di campioni previsto dal progetto nello studio di monitoraggio è stato scelto di utilizzare per le analisi metodi di *screening* immunoenzimatici.

La validazione di un metodo è il processo utilizzato per confermare che la procedura analitica impiegata per uno specifico test risponda a requisiti di qualità in un campo di concentrazione precedentemente individuato, per un determinato analita e per talune matrici. I risultati ottenuti dal processo di validazione sono utilizzati per giudicare la qualità, l'attendibilità e la consistenza dei risultati analitici ottenuti (ISO 17025:2005).

Durante l'intero periodo di svolgimento delle attività del progetto sono stati organizzati tre studi di validazione interlaboratorio, uno per la determinazione delle fumonisine (FBs) in campioni di mais e due per la determinazione del deossinivalenolo (DON) in campioni di grano tenero.

2. STUDIO INTERLABORATORIO PER LA VALIDAZIONE DI UN METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DEL DEOSSINIVALENOLO (DON) IN CAMPIONI DI GRANO TENERO (2006/2007 E 2008/2009)

Nel corso del progetto MICOCER sono stati organizzati due studi di validazione per la determinazione del deossinivalenolo in campioni di grano tenero con lo scopo di valutare l'efficienza del metodo e dei laboratori direttamente coinvolti nelle analisi di monitoraggio previste in seno al progetto. Il primo studio collaborativo è stato organizzato nel periodo 2006/2007.

I laboratori che hanno partecipato al primo studio (in numero di 10) sono stati gli stessi partecipanti al progetto.

Il primo studio di validazione ha fornito risultati soddisfacenti in termini di *performance* anche se il basso numero di laboratori partecipanti non ha permesso di considerare lo studio conclusivo dal punto di vista della validazione. Allo scopo di verificare e sostanziare i risultati ottenuti durante il primo studio interlaboratorio è stato organizzato un secondo studio interlaboratorio in chiusura di progetto (2008/2009). Tale studio ha previsto anche il coinvolgimento di laboratori, pubblici e privati, esterni al progetto.

Nella intera progettazione e organizzazione degli studi si è fatto riferimento alle linee guida dell'AOAC (AOAC International, 2002).

2.1 *Laboratori partecipanti (2006/2007)*

Coordinatore: Dott. Carlo Brera – Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – Istituto Superiore di Sanità

- Dott.ssa Marzia Cattaneo
CRA-Unità di ricerca per la selezione dei cereali e la valorizzazione delle varietà vegetali (SCV), S. Angelo Lodigiano (LO)
- Dott. Roberto Comitti
R-Biopharm Italia S.r.l. – Cerro al Lambro (MI)
- Dott.ssa Maria Grazia D'Egidio
CRA-Unità di ricerca per la valorizzazione qualitativa dei cereali (QCE), Roma
- Dott.ssa Giulia Gallo
Stazione Consorziale sperimentale di granicoltura per la Sicilia – Caltagirone (CT)
- Prof. Amedeo Reyneri
Dip. di Agronomia Selvicoltura e Gestione del Territorio – AGROSELVITER dell'Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)
- Dott.ssa Valeria Terzi
CRA-Centro di ricerca per la genomica e la postgenomica animale e vegetale (GPC), Fiorenzuola d'Arda (PC)
- Dott. Alberto Verderio
CRA-Unità di ricerca per la maiscoltura (MAC), Bergamo
- Dott. Michelangelo Pascale
CNR-Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) – Bari
- Prof. Amedeo Pietri
Università Cattolica del Sacro Cuore – Piacenza

2.2 *Laboratori partecipanti (2008/2009)*

Coordinatore: Dott. Carlo Brera – Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – Istituto Superiore di Sanità

- Dott. Nicola Berardo
CRA-Unità di ricerca per la maiscoltura (MAC), Bergamo

- Dott.ssa Annamaria Colombo
Molini Valente Nova S.p.a. – Felizzano (AL)
- Dott.ssa Maria Grazia D'Egidio
CRA-Unità di ricerca per la valorizzazione qualitativa dei cereali (QCE),
Roma
- Dott.ssa Giulia Gallo
Stazione Consorziale sperimentale di granicoltura per la Sicilia – Caltagi-
rone (CT)
- Dott. Michelangelo Pascale
CNR-Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) – Bari
- Prof. Amedeo Pietri
Università Cattolica del Sacro Cuore – Piacenza
- Dott. Luca Plizzari
CRA-Unità di ricerca per la selezione dei cereali e la valorizzazione delle
varietà vegetali (SCV), S. Angelo Lodigiano (LO)
- Dott. Bernhard Reck
R-Biopharm AG – Darmstadt-Germany
- Prof. Amedeo Reyneri
Dip. di Agronomia Selvicoltura e Gestione del Territorio – AGROSELVI-
TER dell'Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)
- Dott.ssa Elisabetta Silvestrini
pH S.r.l. – Tavarnelle Val di Pesa (FI)
- Dott.ssa Valeria Terzi
CRA-Centro di ricerca per la genomica e la postgenomica animale e vege-
tale (GPC), Fiorenzuola d'Arda (PC)

2.3 *Materiali*

I livelli di contaminazione dei materiali sono stati opportunamente scelti sulla base della normativa comunitaria vigente (Regolamento CE/1226/2007) al fine sia di ottenere una informazione congrua con i livelli di contaminazione presumibilmente riscontrabili nelle produzioni cerealicole oggetto dello studio, sia di valutare l'efficienza dei laboratori in un intervallo di concentrazioni comprendente i limiti di legge.

Per la determinazione del DON, su ciascuno dei materiali da fornire ai laboratori, è stato utilizzato un metodo HPLC validato con rivelazione UV.

Al fine di imputare lo scostamento dal valore di riferimento dei risultati ottenuti dai laboratori partecipanti al solo errore di analisi e non alla disomogeneità del livello di contaminazione nei campioni, si è reso necessario con-

durre, preliminarmente all'invio dei campioni e per ciascun materiale, sia uno studio di omogeneità, che uno studio di stabilità dell'analita.

Studio di omogeneità. Per testare l'omogeneità di ciascun materiale sono state effettuate due serie di analisi da 10 campioni, prelevati in due differenti giornate. È stata valutata sia la omogeneità tra i campioni (*between samples*) formanti il *batch* da inviare ai partecipanti, che quella all'interno dei campioni contenuti in sacchetti (*within samples*). I risultati ottenuti sono stati valutati con il test ANOVA, secondo i criteri previsti dalle linee guida dell'AOAC.

I test di omogeneità per lo studio 2006/2007 sono stati condotti su 4 materiali; sul materiale non contaminato (Materiale 2) sono state effettuate solo le ripetizioni di analisi per verificare che la contaminazione fosse effettivamente minore del limite di quantificazione (LQ). In tabella 1 sono riportati i valori di contaminazione da DON nei 5 materiali utilizzati nello studio.

I test di omogeneità per lo studio 2008/2009 sono stati condotti su 6 materiali, di cui quattro naturalmente contaminati e due materiali di riferimento. In tabella 2 sono riportati i valori di contaminazione da DON nei 6 materiali utilizzati nello studio.

Studio di stabilità. Prima dell'invio ai partecipanti sono state poi analizzate due serie da 10 campioni prelevati a distanza di 2 mesi da ciascun materiale. Inoltre, dopo il ricevimento dei risultati da parte dei partecipanti è stata effettuata una terza serie di analisi sul materiale residuo di ogni livello di concen-

MATERIALE	LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DON ($\mu\text{g/kg}$)
Materiale 1	1820
Materiale 2	< LQ
Materiale 3	161
Materiale 4	813
Materiale 5	1514

Tab. 1 *Livelli di contaminazione da DON nei materiali utilizzati per lo studio interlaboratorio (2006/2007)*

MATERIALE	LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DON ($\mu\text{g/kg}$)
Materiale 1	< LQ
Materiale 2	191
Materiale 3	2934
Materiale 4	800
Materiale 5	1062
Materiale 6	1323

Tab. 2 *Livelli di contaminazione da DON nei materiali utilizzati per lo studio interlaboratorio (2008/2009)*

trazione per verificare la stabilità alla conclusione dello studio. Anche in questo caso il test ANOVA ha confermato la stabilità dei materiali utilizzati.

Per ogni materiale i partecipanti hanno condotto le analisi in doppio cieco (*blind duplicate*).

2.4 Principio del metodo

Oltre ai materiali ogni laboratorio partecipante ha ricevuto un protocollo di lavoro riportante le istruzioni da seguire scrupolosamente e senza deviazioni e le schede da compilare relative alla ricezione dei materiali e alla trascrizione dei risultati ottenuti. Il protocollo di analisi con il saggio immunoenzimatico quantitativo è stato fornito direttamente dalla R-Biopharm Rhône Ltd, che ha fornito anche i kit.

Come precedentemente indicato, il metodo da sottoporre a validazione è stato un metodo immunoenzimatico competitivo (RIDASCREEN® DON).

Il metodo allegato al kit, riportato nelle istruzioni inviate ai partecipanti, indica di estrarre con 25 mL di acqua 5.0 g di campione macinato agitando per 3 minuti. Il campione viene filtrato su filtro Whatman No. 1. Per ogni pozzetto si impiegano 50 µL di estratto.

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono coattati con anticorpi di cattura diretti contro anticorpi anti-deossinivalenolo. Vi si aggiungono gli standard o i campioni, il coniugato deossinivalenolo-enzima e gli anticorpi anti-deossinivalenolo. Il DON libero e quello coniugato competono per i siti di legame degli anticorpi (immunodosaggio enzimatico competitivo). Contemporaneamente gli anticorpi anti-DON vengono immobilizzati dagli anticorpi di cattura. L'enzima coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato/cromogeno nei pozzetti, l'enzima coniugato legato converte il cromogeno di colore rossastro in un pozzetto azzurro. L'aggiunta di un reagente-stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. L'assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di DON nel campione.

2.5 Risultati e discussioni

Prima dell'analisi statistica sui risultati ricevuti dai laboratori partecipanti sono stati individuati ed eliminati gli eventuali valori anomali o *outliers*. L'eliminazione degli *outliers* è un processo iterativo che si arresta, e la ripetibilità e riproducibilità vengono calcolate sui laboratori restanti, se vengono eliminati più di 2/9 dei partecipanti o se nessun partecipante viene eliminato. Sono

stati utilizzati due test per l'eliminazione degli *outliers*, il *test di Cochran* (misura della variabilità intra-laboratorio) e il *test di Grubbs* (misura della variabilità inter-laboratorio).

I parametri del metodo ottenuti per lo studio interlaboratorio 2006/2007 sono riportati nella tabella 3, quelli relativi allo studio 2008/2009 sono riportati in tabella 4.

Al fine di una più chiara lettura della tabella si fa presente che i valori riportati nelle caselle ombreggiate sono quelli che presentano un valore maggiore del valore limite indicato nel Regolamento CE/401/2006 e riportato a fianco delle tabelle.

Confrontando il valore di riferimento ottenuto in HPLC con il valore assegnato, ottenuto come mediana dei risultati dei partecipanti, si può notare che il metodo immunoenzimatico tende a sovrastimare il dato ottenuto in HPLC. Per una migliore visualizzazione di questa tendenza si riporta anche il grafico dell'andamento del kit contro il valore di riferimento (figg. 1 e 2).

PARAMETRI	DON (µg/kg)						
Materiale	1	2	3	4	5		
Valore assegnato	2243	< LQ	185	1008	1937		
Valore di riferimento	1820	< LQ	161	813	1514		
Anno del test interlaboratorio	2007						
Numero di laboratori	9	9	9	9	9		
Numero di laboratori dopo l'eliminazione degli <i>outliers</i>	7	7	7	7	7		
Numero di <i>outliers</i>	2	2	2	2	2		
Numero di risultati accettati	6	6	6	6	6		
Numero di repliche	2	2	2	2	2		
Media, µg/kg	2375	< LQ	183	981	2021		
Deviazione standard di ripetibilità (S _r), µg/kg	141	–	15	48	200	> 100–≤ 500	≥ 500
Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD _r), %	5.9	–	8.2	4.9	9.9	≤ 20	≤ 20
Limite di ripetibilità (r = 2,8*S _r), µg/kg	395	–	42	134	560		
Deviazione standard di riproducibilità (S _R), µg/kg	692	–	31	231	582		
Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSD _R), %	29.1	–	16.9	23.5	28.8	≤ 40	≤ 40
Limite di riproducibilità (R = 2,8*S _R), µg/kg	1938	–	87	647	1630		
Recupero, %	130	–	113	121	133	60-110	70-120

Tab. 3 Performance di precisione – Determinazione del DON in campioni di grano (2006/2007)

PARAMETRI	DON (µg/kg)					
Materiali	1	2	3	4	5	6
Valori assegnati	< LOQ	213	3299	1055	992	1572
Valori di riferimento	< LOQ	191	2934	800	1062	1323
Anno del test interlaboratorio	2008					
Numero di laboratori	10	10	10	10	10	10
Numero di laboratori dopo l'eliminazione degli outliers		10	10	10	10	10
Numero di outliers		0	0	0	0	0
Numero di risultati accettati		10	10	10	10	10
Numero di repliche		2	2	2	2	2
Media, µg/kg		211	3380	1013	998	1540
Deviazione standard di ripetibilità S _p , µg/kg		36	505	137	172	330
Deviazione standard relativa di ripetibilità RSD _p , %		17.3	15.0	13.6	17.3	21.4
Limite di ripetibilità r (r = 2,8*S _p), µg/kg		101	1414	384	482	924
Deviazione standard di riproducibilità S _R , µg/kg		67	524	239	185	363
Deviazione standard relativa di riproducibilità RSD _R , %		31.6	15.5	23.5	18.6	23.5
Limite di riproducibilità R (R = 2,8*S _R), µg/kg		188	1467	669	518	1016
Recupero, %		111	115	127	94	116

> 100-≤ 500	> 500
≤ 20	≤ 20
≤ 40	≤ 40
60-110	70-120

Tab. 4 *Performance di precisione – Determinazione del DON in campioni di grano (2008/2009)*

Nelle figure la linea continua rappresenta la retta a 45°, la linea tratteggiata l'andamento del kit ELISA verso il dato HPLC. La pendenza delle rette mette in evidenza una sovrastima del kit rispetto ai valori di riferimento determinati in HPLC in entrambi gli studi di validazione organizzati.

Per quanto attiene la ripetibilità e la riproducibilità del metodo, è stato ottenuto, per lo studio di validazione del 2006/2007, per tutti e cinque i livelli di contaminazione, un pieno accordo con i parametri di riferimento fissati dal Regolamento CE/401/2006.

Nel secondo studio organizzato nel 2008/2009, la ripetibilità e la riproducibilità del metodo si sono confermate aderenti ai criteri indicati nel Regolamento, eccedendo leggermente i valori di ripetibilità riportati in un solo caso.

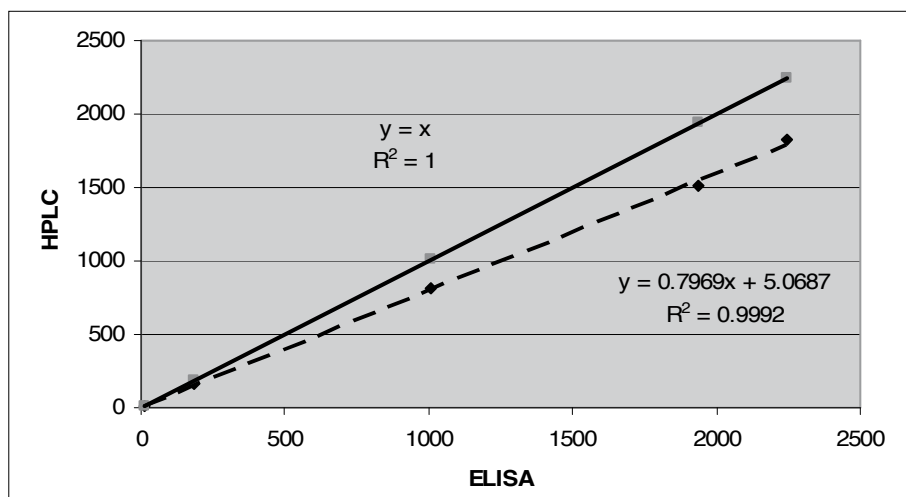


Fig. 1 Andamento del kit ELISA rispetto al valore di riferimento ottenuto dall'analisi in HPLC per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione del DON in campioni di grano tenero (2006/2007)

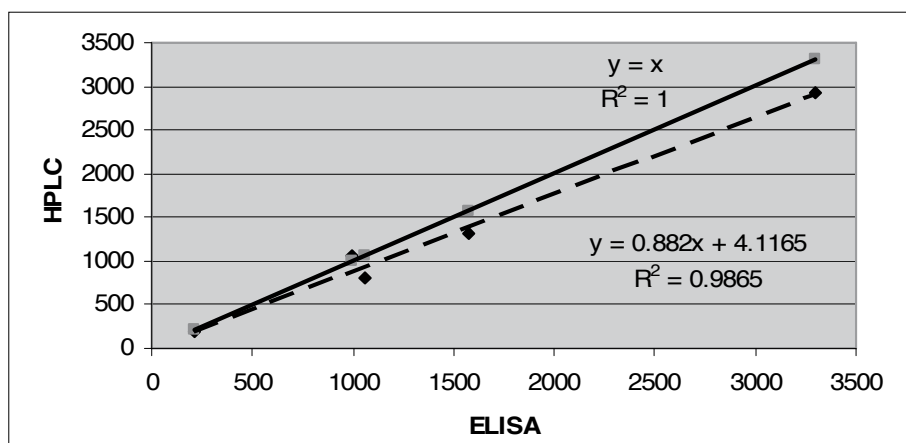


Fig. 2 Andamento del kit ELISA rispetto al valore di riferimento ottenuto dall'analisi in HPLC per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione del DON in campioni di grano tenero (2008/2009)

Infine, i valori di recupero ottenuti dai laboratori hanno messo in evidenza una leggera sovrastima per tutti i livelli di contaminazione oggetto dello studio. Tale sovrastima è risultata maggiore dei criteri di rendimento riportati nel Regolamento CE/401/2006 per tutti i livelli dello studio 2006/2007 e per due materiali nello studio 2008/2009.

2.6 Conclusioni

Durante la fase di progettazione del primo studio di validazione purtroppo non è stato possibile ampliare il numero dei laboratori partecipanti offrendo la possibilità a laboratori esterni al progetto di prendere parte allo studio. Il numero dei laboratori coinvolti pertanto è risultato essere basso ed eliminati gli *outliers* il numero dei partecipanti si è ridotto ulteriormente. Il numero dei risultati accettati è stato di sei, mentre il numero minimo dei laboratori indicato nelle linee guida dell'AOAC è di otto. Per questo motivo non è stato possibile riferirsi a questo studio collaborativo come a un vero e proprio studio di validazione, ciò nonostante i risultati ottenuti sono stati egualmente utilizzati per estrapolare informazioni utili al lavoro previsto nel progetto, in particolare si sono verificate le *performance* del metodo valutando l'affidabilità dei risultati forniti per il monitoraggio.

Al fine di poter verificare i buoni risultati ottenuti durante il primo studio interlaboratorio ne è stato organizzato un secondo ampliando il numero di partecipanti. L'analisi statistica dei dati ottenuti conferma le buone *performance* del metodo immunoenzimatico, che presenta, rispetto al dato di riferimento determinato in HPLC, solo una leggera sovrastima. È necessario comunque sottolineare che i parametri di riferimento del Regolamento CE/401/2006 si riferiscono a valori risultanti da studi interlaboratorio effettuati con metodi HPLC, che notoriamente presentano un più alto grado di precisione ed esattezza.

3. STUDIO INTERLABORATORIO PER LA VALIDAZIONE DI UN METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DELLE FUMONISINE B₁ E B₂ IN CAMPIONI DI MAIS (2007/2008)

Come il precedente studio sul DON, anche questo secondo studio interlaboratorio è stato finalizzato oltre che alla validazione di un metodo immunoenzimatico, anche alla valutazione della efficienza dei laboratori. Le indagini analitiche in questo caso hanno riguardato la determinazione delle fumonisine B₁ e B₂ in campioni di mais. Lo studio è stato organizzato nel periodo 2007/2008.

Tuttavia, poiché il numero di laboratori impiegati nello studio di monitoraggio per la determinazione del DON in campioni di grano tenero si è dimostrato inferiore a quello riportato nelle linee guida dell'AOAC, in questo secondo studio, si è ampliato il numero dei partecipanti a laboratori esterni rivolgendosi sia al pubblico che a quello privato, cercando così di coinvolgere diverse realtà coinvolte nella analisi delle micotossine. Il requisito richiesto è stato una pregressa esperienza nell'analisi delle micotossine nei prodotti ali-

mentari, in particolare attraverso l'impiego di analisi immunoenzimatiche (kit ELISA). Allo studio di validazione hanno infine preso parte 14 laboratori.

Al fine di determinare una correlazione tra *performance* dei laboratori e validità del kit immunoenzimatico, lo studio è stato eseguito mediante l'impiego di due kit immunoenzimatici (kit A e kit B) forniti da due differenti produttori (R-Biopharm Rhône Ltd e Tecna S.r.l.). L'analisi statistica è stata effettuata per fornire indicazioni sulla verifica della efficienza del metodo, in particolare della precisione, attraverso la valutazione della ripetibilità e della riproducibilità.

3.1 *Laboratori partecipanti*

Coordinatore: Dott. Carlo Brera – Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – Istituto Superiore di Sanità

- Dott. Enrico Battisti
Molino Favero – Padova
- Dott. Nicola Berardo
CRA-Unità di ricerca per la maiscoltura (MAC), Bergamo
- Dott.ssa Laura Bertotto
Molino F.lli Peila – Valperga (TO)
- Dott. Alberto Biancardi
IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna “Bruno Umbertini” – Brescia
- Dott. Giancarlo Biancotto
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)
- Dott. Brandolini
CRA-Unità di ricerca per la selezione dei cereali e la valorizzazione delle varietà vegetali (SCV), S. Angelo Lodigiano (LO)
- Dott.ssa Isabella Cavezzali
NDF-Gruma – Geggia (VE)
- Dott.ssa Maria Grazia D'Egidio
CRA-Unità di ricerca per la valorizzazione qualitativa dei cereali (QCE), Roma
- Dott.ssa Giulia Gallo
Stazione Consorziale sperimentale di granicoltura per la Sicilia – Caltagirone (CT)
- Dott. Maurizio Paleologo
Tecna S.r.l. – Trieste
- Dott. Michelangelo Pascale
CNR-Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) – Bari

- Prof. Amedeo Pietri
Università Cattolica del Sacro Cuore – Piacenza
- Dott. Bernhard Reck
R-Biopharm AG – Darmstadt-Germany
- Prof. Amedeo Reyneri
Dip. di Agronomia Selvicoltura e Gestione del Territorio – AGROSELVITER dell'Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)

3.2 Materiali

Sempre in accordo con quanto indicato nelle linee guida dell'AOAC sono stati preparati 5 materiali a diversi livelli di contaminazione. I materiali da 1 a 4 erano naturalmente contaminati, mentre il materiale 5 era un materiale di riferimento. Nella tabella 5 sono riportati i valori di contaminazione da fumonisine (FBs = $FB_1 + FB_2$) nei 5 materiali utilizzati nello studio.

Per ogni materiale le analisi sono state condotte, con entrambi i kit, in doppio cieco (*blind duplicate*); ogni partecipante ha quindi ricevuto 20 campioni/materiali per l'analisi delle fumonisine.

Studio di omogeneità. Per testare l'omogeneità di ogni materiale sono state analizzate due serie da 10 campioni prelevati in due differenti giornate. I risultati ottenuti sono stati valutati con il test ANOVA. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 4; essendo il valore dell' α calcolato per tutti i materiali

MATERIALE	LIVELLO DI CONTAMINAZIONE FBS ($\mu\text{g/kg}$)
Materiale 1	10558
Materiale 2	862
Materiale 3	27335
Materiale 4	2723
Materiale 5	3036

Tab. 5 Livelli di contaminazione da fumonisine (FBs = $FB_1 + FB_2$) nei materiali utilizzati per lo studio interlaboratorio (2007/2008)

MATERIALE	FBS ($\mu\text{g/kg}$)	α_{CRIT}	α_{CALC}
Materiale 1	10558	0.05	0.47
Materiale 2	862	0.05	0.49
Materiale 3	27335	0.05	0.92
Materiale 4	2723	0.05	0.31

Tab. 6 Risultati dello studio di omogeneità dei materiali impiegati nello studio interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

maggiore del valore dell' α critico, è stata rifiutata l'ipotesi di differenza tra le due serie di risultati, con conseguente conferma dell'omogeneità dei materiali. In tabella 6 sono indicati solo i risultati dei 4 materiali per i quali si è effettuato lo studio di omogeneità, omettendo, per ovvie ragioni, il materiale di riferimento. Per la determinazione delle fumonisine in ciascuno dei materiali da fornire ai laboratori, è stato utilizzato un metodo HPLC validato con rivelazione spettrofluorimetrica e derivatizzazione pre-colonna.

I livelli di riferimento dei materiali sono stati opportunamente scelti sulla base della normativa comunitaria vigente (Regolamento CE/1226/2007) al fine sia di ottenere una informazione congrua con i livelli di contaminazione presumibilmente riscontrabili nelle produzioni cerealicole oggetto dello studio sia di valutare l'efficienza dei laboratori in un intervallo di concentrazioni comprendente i limiti di legge.

Studio di stabilità. Prima dell'invio ai partecipanti, per ciascun materiale, sono state analizzate due serie da 10 campioni prelevati a distanza di 2 mesi. Inoltre, dopo il ricevimento dei risultati da parte dei partecipanti è stata effettuata una terza serie di analisi sui materiali residui per verificare la stabilità alla conclusione dello studio. Anche in questo caso il test ANOVA ha confermato la stabilità dei materiali utilizzati per lo studio.

3.3 Principio del metodo

Il metodo, come nel caso del DON, è un immunodosaggio enzimatico competitivo per entrambi i kit impiegati nello studio (RIDASCREEN® Fumonisine, R-Biopharm Rhône Ltd; Celer FUMO, Tecna S.r.l.). L'estrazione delle fumonisine dal campione è stata eseguita su 5.0 g di matrice; il solvente di estrazione impiegato è una soluzione metanolo/acqua 70/30 (v/v).

3.4 Risultati e discussioni

Prima dell'analisi statistica sui risultati sono stati individuati ed eliminati gli eventuali *outliers* mediante l'impiego dei test di *Cochran* (misura della variabilità intra-laboratorio) e di *Grubbs* (misura della variabilità inter-laboratorio).

I valori individuati come *outliers* sono ugualmente riportati nelle tabelle dei risultati (tabb. 7 e 8) ma sono stati opportunamente evidenziati.

Dall'analisi delle tabelle dei risultati si può notare che gli *outliers* nel loro insieme sono distribuiti su materiali diversi a conferma della omogeneità dei singoli materiali.

	MATERIALE 1 V.A. = 11854 V.R. = 10558		MATERIALE 2 V.A. = 796 V.R. = 862		MATERIALE 3 V.A. = 26898 V.R. = 27335		MATERIALE 4 V.A. = 3629 V.R. = 2723		MATERIALE 5 V.A. = 3478 V.R. = 3036	
lab	C	T	A	O	D	M	B	N	E	P
1	11420	9310	710	564	26700	24960	1940	2230	3880	2570
2	15580	13100	850	684	27260	25030	3760	3940	3880	3850
3	10285	13013	983	1313	32780*	36015*	3380	3640	3515	3985
4	16680	12460	420**	1670**	3710**	27400**	2380	4420	4080	2020
5	8960*	2910*	551	749	27030	21370	3110	3050	2710	2690
6	13220	10770	676	716	37740	35890	3820	4290	1780	1950
7	8416	15008	678	832	24384	31648	2144	3728	3648	2936
8	10780	11850	900	860	31240	32620	4150	4150	3760	3880
9	8610	16050	647	898	19910	16210	4080	6610	6720**	2790**
10	11213	10780	748	914	27200	29030	3765	3730	3590	3570
11	10460	10380	803	834	28100	27200	3310	3410	3470	3280
12	13170	12420	1970*	1340*	22150	24730	2410	1730	4500	3840
13	11820	16380	660	1020	32840	35780	5470	4250	2640	4040
14	12310	12630	710	710	27360	21150	4550	3890	3960	4500
* Risultati individuati come <i>outliers</i> dal test di Grubbs										
** Risultati individuati come <i>outliers</i> dal test di Cochran										

Tab. 7 Risultati ottenuti con il kit A ($\mu\text{g/kg}$) – Studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

	MATERIALE 1 V.A. = 11854 V.R. = 10558		MATERIALE 2 V.A. = 796 V.R. = 862		MATERIALE 3 V.A. = 26898 V.R. = 27335		MATERIALE 4 V.A. = 3629 V.R. = 2723		MATERIALE 5 V.A. = 3478 V.R. = 3036	
lab	L	U	H	R	G	S	F	Q	I	V
1	7850	9630	810	1130	26670	35130	2500	1580	2370	2120
2	13850	15190	375*	830	36310	41040	2710	3000	3390	4830
3	12760	15470	913	1450	32720	36155	2820	4210	4040	5450
4	10720	12840	910	1030	30520**	53760**	2350	3760	4450	3990
5	4510	7860	375*	375*	26430	35500	375*	375*	375*	860
6	17450	16360	1260	1260	43660	39710	3480	4160	4410	2030
7	2530**	11950**	1020	375*	30470	33140	2760	3440	2530	3860
8	13900	14370	910	1000	39360	38700	3380	3350	4370	4940
9	12410	11210	1220	1640	27920	19440	2660	2830	2240	3230
10	10750	11050	810	1010	25480	25980	3580	3910	3615	3720
11	12130	13070	1160	820	36100	34910	1990	2140	2850	4920
12	11070	10980	950	770	28040	26000	2170	2260	3570	3790
13	16520	14290	1300	1020	41390	37000	3400	4760	4320	5020
14	13970	11650	375	375	35200	31310	2620	1940	4210	2660
* I risultati <LQ sono stati numericamente riportati come LQ/2										
** Risultati individuati come <i>outliers</i> dal test di Cochran										

Tab. 8 Risultati ottenuti con il kit B ($\mu\text{g/kg}$) – Studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

Nei dati riportati dal laboratorio 12 si è notato che invertendo i risultati ottenuti per il materiale 2 con i due diversi kit il valore non risulta più essere un *outlier*. Non avendo però riscontrato nessuna evidenza che rafforzasse l'ipotesi di un errore nella compilazione dei risultati né da parte del partecipante, né da parte del laboratorio coordinatore, le successive considerazioni statistiche sono state fatte senza apportare nessuna variazione ai risultati riportati dal partecipante.

Per ogni materiale è stata calcolata la deviazione standard relativa in condizioni di ripetibilità (RSD_r) e riproducibilità (RSD_R); i valori ottenuti sono stati confrontati con i valori indicati nel Regolamento CE/401/2006 e riportati nella tabella 9.

Le *performance* dei due diversi kit sono riportate nelle tabelle 10 e 11.

Al fine di una più chiara lettura delle tabelle si fa presente che i valori riportati nelle caselle ombreggiate sono quelli che presentano un valore maggiore del valore limite indicato nel Regolamento CE/401/2006 e riportato a fianco delle tabelle.

Confrontando il valore di riferimento ottenuto in HPLC con il valore assegnato, calcolato come mediana dei risultati riportati dai partecipanti, si può notare che il metodo immunoenzimatico tende a sovrastimare il dato ottenuto in HPLC. Per una migliore visualizzazione di questa tendenza si riportano i grafici dell'andamento dei due kit contro il valore di riferimento (figg. 3 e 4). Per valutare, la concordanza dei risultati ottenuti con i due diversi kit si riporta anche l'andamento dei due kit (fig. 5).

Nella figura 3 la linea continua rappresenta la retta a 45° , la linea tratteggiata l'andamento del kit A. È possibile notare che le due rette sono praticamente sovrapponibili, mostrando una buona risposta del kit A.

Nella figura 4 la linea continua rappresenta la retta a 45° , la linea tratteggiata l'andamento del kit B. In questo caso la pendenza delle rette mette in evidenza una sovrastima del kit B rispetto ai valori di riferimento determinati in HPLC.

Nella figura 5 la linea continua rappresenta la retta a 45° , la linea tratteggiata l'andamento del kit A verso il kit B. Anche in questo caso le rette evidenziano una maggiore tendenza alla sovrastima del kit B sia rispetto ai valori dell'analisi in HPLC, sia rispetto ai valori del kit A.

LIVELLO ($\mu\text{g/kg}$)	FUMONISINA B ₁ O B ₂		
	$RSD_r \%$	$RSD_R \%$	RECUPERO%
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60-120
> 500	≤ 20	≤ 30	70-110

Tab. 9 Criteri di rendimento indicati nel Regolamento CE/401/2006

PARAMETRI	FUMONISINE (B ₁ + B ₂) µg/kg					
Materiali	1	2	3	4	5	
Valori assegnati	11854	796	26898	3629	3478	
Valori di riferimento	10558	862	27335	2723	3036	
Anno del test interlaboratorio	2008					
Numero di laboratori	14	14	14	14	14	
Numero di laboratori dopo l'eliminazione degli outliers	13	11	13	14	13	
Numero di outliers	1	3	1	0	1	
Numero di risultati accettati	13	11	13	14	13	
Numero di repliche	2	2	2	2	2	
Media, µg/kg	12235	760	27936	3619	3405	
Deviazione standard di ripetibilità (S _r), µg/kg	2507	124	2633	753	603	
Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD _r), %	20.5	16.3	9.4	20.8	17.7	≤ 20
Limite di ripetibilità (r = 2,8*S _r), µg/kg	7020	347	7372	2108	1688	
Deviazione standard di riproducibilità (S _R), µg/kg	2260	118	5566	1065	765	≤ 30
Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSD _R), %	18.5	15.6	19.9	29.4	22.5	
Limite di riproducibilità (R = 2,8*S _R), µg/kg	6328	330	15584	2982	2142	
Recupero, %	116	88	102	133	112	

Tab. 10 *Performance di precisione per il kit A – Determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)*

PARAMETRI	FUMONISINE (B ₁ + B ₂) µg/kg					
Materiali	1	2	3	4	5	
Valori assegnati	12205	963	33846	2955	3674	
Valori di riferimento	10558	862	27335	2723	3036	
Anno del test interlaboratorio	2008					
Numero di laboratori	14	14	14	14	14	
Numero di laboratori dopo l'eliminazione degli <i>outliers</i>	13	14	13	14	14	
Numero di <i>outliers</i>	1	0	1	0	0	
Numero di risultati accettati	13	14	13	14	14	
Numero di repliche	2	2	2	2	2	
Media, µg/kg	12379	910	33222	2804	3506	
Deviazione standard di ripetibilità (S _r), µg/kg	1274	230	3526	543	857	
Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD _r), %	10.3	25.3	10.6	19.4	24.4	≤ 20
Limite di ripetibilità (r = 2,8*S _r), µg/kg	3567	644	9873	1520	2400	
Deviazione standard di riproducibilità (S _R), µg/kg	2981	351	6125	1041	1264	≤ 30
Deviazione standard relativa di riproducibilità (RSD _R), %	24.1	38.6	18.4	37.1	36.1	
Limite di riproducibilità (R = 2,8*S _R), µg/kg	8347	983	17150	2915	3539	
Recupero, %	117	106	122	103	115	70-110

Tab. 11 *Performance di precisione per il kit B – Determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)*

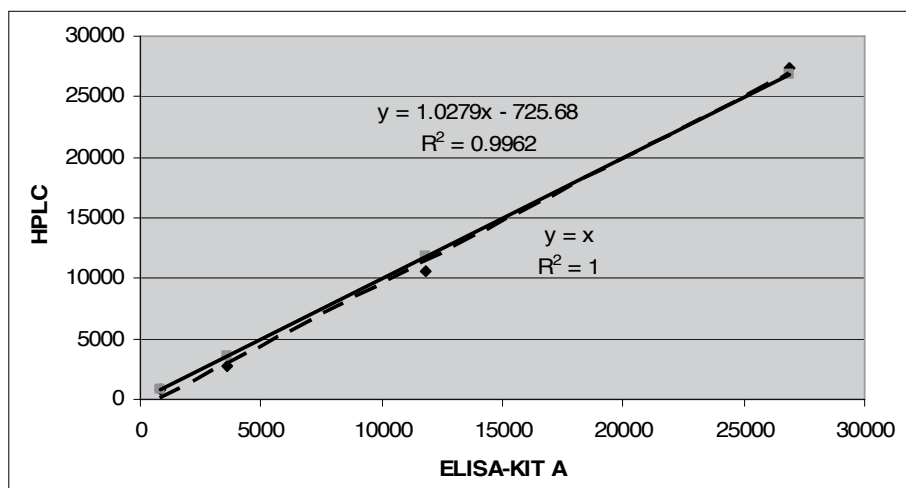


Fig. 3 Andamento del kit A rispetto al valore di riferimento ottenuto dall'analisi in HPLC per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

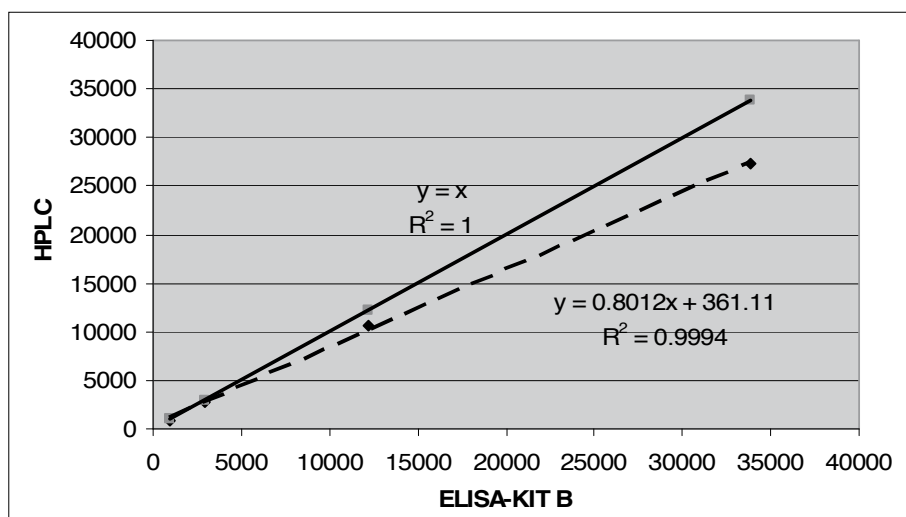


Fig. 4 Andamento del kit B rispetto al valore di riferimento ottenuto dall'analisi in HPLC per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

3.5 Conclusioni

Il metodo immunoenzimatico presenta una leggera sovrastima rispetto al dato ottenuto dall'analisi in HPLC.

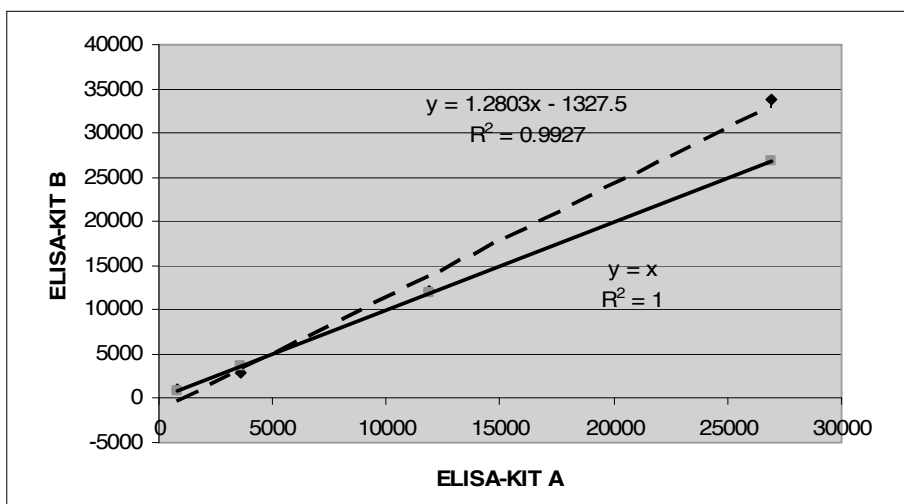


Fig. 5 Andamento del kit A rispetto al kit B per lo studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle fumonisine in campioni di mais (2007/2008)

Le *performance* dei laboratori coinvolti nel monitoraggio delle fumonisine in campioni di mais, sono risultate affidabili e adeguate allo scopo del progetto. Pertanto, i dati emersi dallo studio interlaboratorio hanno fornito una garanzia di attendibilità dei risultati forniti dai laboratori durante il lavoro di monitoraggio svolto nel corso del progetto.

Confrontando i risultati ottenuti nello studio interlaboratorio con i parametri riportati nel Regolamento CE/401/2006, per entrambi i kit, solo alcuni livelli di contaminazione possono essere considerati validati. Tuttavia i parametri di riferimento riportati nel Regolamento fanno riferimento a metodi di conferma, quindi per un metodo di *screening* come quello testato, i risultati ottenuti si possono ritenere più che soddisfacenti.

4. APPENDICE STATISTICA

Si riportano in questo paragrafo maggiori dettagli circa i test statistici impiegati per l'analisi dei risultati ottenuti negli studi interlaboratorio qui presentati.

4.1 *Modello Anova*

L'analisi della varianza (ANOVA) consente di confrontare due o più gruppi di dati confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi.

L'ipotesi alla base dell'analisi della varianza è che dati p gruppi, sia possibile scomporre la varianza interna ai gruppi (*within*) e varianza tra i gruppi (*between*).

Lo scopo dell'analisi è la convinzione che determinati fenomeni trovino spiegazione in caratteristiche proprie del gruppo di appartenenza. Il confronto si basa sull'idea che se la variabilità interna ai gruppi è relativamente elevata rispetto alla variabilità tra i gruppi, allora probabilmente la differenza tra questi gruppi è soltanto il risultato della variabilità interna.

La variabilità dei dati osservati può essere misurata mediante gli scostamenti dei dati dalla media. La devianza totale è definita nel modo seguente:

$$\sum_i \sum_j (Y_{ij} - \bar{Y})^2$$

La devianza totale può essere scomposta nel modo seguente:

$$\sum_i \sum_j (Y_{ij} - \bar{Y})^2 = n \sum_i (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2 + \sum_i \sum_j (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$$

Il test è basato sul confronto tra la varianza tra trattamenti e la varianza d'errore. Le varianze si ottengono dividendo le devianze per i gradi di libertà.

Avremo quindi:

varianza tra i gruppi $MS(a) = SS(a)/(p - 1)$

varianza d'errore $MS(e) = SS(e)/p(n - 1)$

Dove:

p = numerosità gruppi

n = numerosità campione

Per confrontare le due varianze si utilizza il rapporto: $\frac{MS(a)}{MS(e)}$

4.2 Test di Cochran (*intra-laboratorio*)

Il test di Cochran ha lo scopo di rimuovere i valori dei laboratori che mostrano una variabilità significativamente maggiore tra le analisi replicate fra tutti i laboratori per un dato materiale.

Nel test di Cochran si calcola la varianza all'interno dei laboratori per ciascun laboratorio e si divide la più grande di queste somme per tutte queste varianze. Il quoziente risultante è la "statistica di Cochran" che indica la presenza di un *outlier* che è possibile escludere se il quoziente eccede il valore critico tabulato (tavola di Cochran per $P = 2.5\%$ e L laboratori partecipanti).

4.3 Test di Grubbs (inter-laboratorio)

Il test di Grubbs ha lo scopo di rimuovere i laboratori con le medie estreme. Il test è costituito da due passaggi; si applica prima il test per valori singoli, se non vengono trovati *outlier* si applica il test per coppie di valori (i due valori più alti, i due valori più bassi, il valore più basso e il valore più alto).

Test Grubbs per un valore singolo: si calcola la media di ciascun laboratorio e quindi la deviazione standard delle L medie. Si calcolano la deviazioni standard del set di medie con la media più alta rimossa, si calcolano la deviazioni standard del set di medie con la media più bassa rimossa. Quindi si calcola la percentuale di diminuzione nella deviazione standard come segue:

$$100 * \left(1 - \frac{S_L}{S} \right) \text{ e } 100 * \left(1 - \frac{S_H}{S} \right)$$

La più alta di queste due percentuali di decrescita è la statistica di Grubbs singola, la quale segnala la presenza di un *outlier* se eccede il valore critico riportato nella tabella della statistica di Grubbs singola per $P = 2.5\%$, due code per L laboratori.

Test di Grubbs per coppie: si procede analogamente, eccetto il calcolo delle deviazioni standard S_{2L} , S_{2H} e S_{HL} , a seguito della rimozione delle due medie più basse, delle due medie più alte e della media più bassa e più alta, dal set originale delle medie.

Si prende la più piccola di queste 3 deviazioni standard e si calcola la corrispondente percentuale di decrescita della deviazione standard dalla originale.

Una coppia di *outlier* secondo Grubbs è presente se un valore selezionato per una percentuale decresce dalla deviazione standard originale calcolata tra le medie originale ed eccede il valore critico presente nella tabella di coppie di valori di Grubbs a $P = 2.5\%$, per L laboratori.

RIASSUNTO

Il progetto interregionale MICOCER (MICOtossine dei CEReali), Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali, nasce con lo scopo, tra gli altri, di fornire un quadro complessivo del livello di contaminazione da micotossine nel mais e nei frumenti, attraverso l'acquisizione di informazioni diffuse, comparabili e rappresentative delle diverse condizioni di coltivazione. Dato l'elevato numero di campioni previsto si è scelto di utilizzare per le analisi delle micotossine un metodo di *screening* immunoenzimatico. Al fine di poter valutare l'efficienza del metodo e dei laboratori coinvolti nello studio di monitoraggio sono stati organizzati degli studi interlaboratorio di validazione.

Durante l'intero periodo di svolgimento delle attività del progetto sono stati organizzati tre studi di validazione interlaboratorio, uno per la determinazione delle fumonisine (FBs) in campioni di mais e due per la determinazione del deossinivalenolo (DON) in campioni di grano tenero.

L'analisi statistica dei risultati ha evidenziato una tendenza del metodo immunoenzimatico a sovrastimare il dato ottenuto tramite l'analisi in HPLC e utilizzato come valore di riferimento. Tuttavia i metodi si sono dimostrati adeguati allo scopo (monitoraggio di numerosi campioni) e hanno anche mostrato una buona concordanza con i criteri di rendimento riportati nel Regolamento CE/401/2006.

ABSTRACT

Within the research project MICOCER, financed by Lombardy Region and coordinated by the Italian Agricultural Research Council (CRA), one of the objectives was to depict a scenario of the status of contamination by mycotoxins in Italian maize and wheat commodities, by the acquisition of harmonized and representative information derived from different agricultural practices. ISS Unit was charged to develop interlaboratory studies aimed at evaluating the performance of laboratories involved in the monitoring program and to validate different kits of ELISA test. The immunoenzymatic technique was chosen as screening method for all the analyses, due to the large amount of samples investigated under the study.

During the entire period covered by the project, three different collaborative trials were planned. The first collaborative trial was on deoxynivalenol (DON) determination in wheat samples (2006/2007), the second one was on fumonisins (FBs = FB₁ + FB₂) determination in maize samples (2007/2008), the third, was a new DON determination in wheat samples.

Up to now, the statistical analysis performed underlined an overestimation of the ELISA kits that were used in comparison with the ones obtained from HPLC analysis, considered as the reference value in these validation studies.

However, the applied immunoenzymatic methods well fit for the purpose of the project being able to give satisfactory quantification for the monitoring surveys programmed for the MICOCER project. Also the performance parameters calculated for the collaborative trials were in accordance with those reported in the Regulation CE/401/2006.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC INTERNATIONAL (2002): *Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*, "AOAC Official Methods of Analysis (2002)".
- CAST (2003): *Mycotoxins: risk in plant, animal and human system*, Task force report ISSN 0194; N. 139.
- ISO 17025:2005: *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*, UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005.
- KROGH P. (1987): *Mycotoxins in food. Food science and Technology*, Academic Press.

- MIRAGLIA M., DE SANTIS B., PANNUNZI E., DEBEGNACH F., BRERA C. (2008): *Mycotoxin Concentration Data Quality: The Role of Sampling*, "Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade", CABI Publishing, Trowbridge (UK).
- REGOLAMENTO CE/1126/2007: Regolamento (EC) N. 1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 255/14.
- REGOLAMENTO CE/1881/2006: Regolamento (EC) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 364/5.
- REGOLAMENTO CE/401/2006: Regolamento (EC) N. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 70/12.
- SMITH J.E., LACEY J., CUERO R., RAMAKRISHNA N., GQALENI N. (1998): *Storage product ecology and mycotoxin formation*, "Mycotoxins and phycotoxins. Developments in chemistry, toxicology and food safety", Alaken, Inc., Fort Collins, CO.
- USDA/GIPSA (2004): *Performance evaluation criteria for aflatoxin test kits*, U.S. Department of Agriculture, 2004.
- WHITAKER T.B. (2006): *Sampling foods for mycotoxins*, «Journal of Food Additives and Contaminants», vol. 23 (1).

MICHELANGELO PASCALE*, MIRIAM HAIDUKOWSKI*, ANGELO VISCONTI*,
GABRIELLA AURELI**, MARIA GRAZIA D'EGIDIO**, ERSILIO DESIDERIO**,
LUCA PLIZZARI***, MARIA CORBELLINI***

Confronto tra metodi ELISA e HPLC per la determinazione del deossinivalenolo (DON) in frumento tenero e duro

INTRODUZIONE

Il Regolamento CE n. 1881/2006 del 19 dicembre 2006 ha raggruppato e aggiornato tutte le disposizioni previste in precedenti regolamenti (almeno 18) che definivano i limiti massimi ammissibili per alcuni contaminanti (comprese le micotossine) nei prodotti alimentari. In particolare, il Regolamento ha fissato, tra l'altro, i livelli massimi ammissibili per il deossinivalenolo (DON), una micotossina prodotta da *Fusarium* spp., in cereali e prodotti derivati. Tali limiti per il frumento duro non trasformato sono stati fissati a 1750 ng/g e per altri cereali non trasformati, compreso il frumento tenero, a 1250 ng/g.

A seguito di tale normativa, la necessità da parte degli operatori del settore cerealicolo di migliorare la qualificazione delle partite in funzione della destinazione d'uso finale rende necessario lo sviluppo/validazione di metodi rapidi, e nello stesso sensibili e affidabili, per la determinazione del DON nelle partite.

I metodi analitici più comunemente utilizzati per la determinazione del DON sono metodi gas-cromatografici (GC) che prevedono l'utilizzo di rivelatori a cattura di elettroni (ECD) o a spettrometria di massa (MS) e metodi HPLC che utilizzano rivelatori UV o MS (Krska et al., 2001; Langseth & Rundberget, 1998). Sebbene tali metodi analitici siano accurati, precisi e sensibili, essi richiedono una fase preliminare di purificazione (*clean-up*) del-

* Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISPA-CNR)

** Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali (CRA-QCE)

*** Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Unità di Ricerca per la Selezione dei Cereali e la Valorizzazione delle Varietà Vegetali (CRA-SCV)

l'estratto, tempi lunghi di analisi, l'impiego di personale specializzato e generalmente sono costosi.

Attualmente non esistono metodi ufficiali per la determinazione del DON in cereali e prodotti derivati, ma recentemente è stato realizzato uno studio interlaboratorio per la validazione di un metodo HPLC/UV (Mac Donald et al., 2005) che prevede la purificazione del campione con colonnina a immunoaffinità. Tale metodo è stato sottoposto al CEN (European Committee for Standardization) per una eventuale adozione a livello europeo.

In letteratura sono riportati numerosi metodi rapidi basati su tecniche immunometriche per la determinazione di DON in cereali e prodotti derivati: saggi ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), metodi immunocromatografici-dipstick, immunosaggi basati sulla Polarizzazione di Fluorescenza e biosensori basati sulla Risonanza Plasmonica di Superficie (Kolossova et al., 2008; Lippolis et al., 2006; Schneider et al., 2004; Tüdös et al., 2003). Tra questi, i più utilizzati test di screening nei laboratori di analisi sono i saggi ELISA che utilizzano anticorpi monoclonali e consentono la determinazione simultanea di un numero elevato di campioni. Questi saggi sono di facile impiego e hanno costi contenuti, rispetto ai metodi strumentali. Tuttavia i saggi ELISA possono dare risultati falsi positivi e possono dare una sovrastima del reale contenuto di DON a causa dell'elevata cross-reattività dell'anticorpo verso gli analoghi strutturali del DON (3 acetil-DON e 15 acetil-DON).

Al fine di verificare l'efficienza del metodo ELISA, utilizzato per la determinazione del DON nel frumento nell'ambito delle attività previste dal progetto, è stato effettuato uno studio interlaboratorio (ring test) per la sua validazione. I risultati del "ring test" sono riportati in un altro capitolo di questo Quaderno (Brera et al., 2008). Il presente studio ha voluto invece valutare le prestazioni del metodo ELISA mediante la determinazione dei livelli di DON in campioni di frumento tenero e duro naturalmente contaminati e il confronto dei risultati con quelli ottenuti con metodo HPLC, metodo di riferimento sottoposto al CEN per una eventuale adozione a livello europeo.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati mediante HPLC (Pascale et al., 2002) un totale di 259 campioni di frumento tenero e 341 campioni di frumento duro raccolti nelle annate agrarie 2005-2006, 2006-2007 e 2007-2008. I campioni sono stati selezionati sulla base dei livelli di contaminazione da DON determinati mediante analisi ELISA (kit RIDASCREEN® DON, r-biopharm) di 1451 campioni di frumento tenero e 2730 di frumento duro.

Le analisi HPLC sono state effettuate presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari. Le analisi ELISA del frumento tenero sono state effettuate presso l'Unità di Ricerca per la Selezione dei Cereali e la Valorizzazione delle Varietà Vegetali del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-SCV), S. Angelo Lodigiano (LO) e quelle del frumento duro presso l'Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-QCE), Roma.

Analisi HPLC. Le analisi del DON sono state effettuate utilizzando il metodo di analisi riportato da Pascale et al., 2002 basato sulla purificazione degli estratti con minicolonne a immunoaffinità e determinazione della tossina mediante HPLC con rivelatore UV. Ciascun campione (25 g) di frumento macinato, dopo aggiunta di 5 g di polietilenglicole (PEG 8000) e 100 mL di acqua distillata, è stato omogeneizzato ad alta velocità per 2 minuti. Gli estratti sono stati filtrati con carta da filtro (Whatman N. 1) e poi con filtro a microfibre di vetro (Whatman GF/A) e 2 mL di estratto filtrato sono stati caricati su minicolonna a immunoaffinità DONtest HPLC (VICAM, Watertown, USA) ed eluiti lentamente a un flusso di 1 goccia/secondo. Successivamente, la minicolonna è stata lavata con 5 mL di acqua distillata a un flusso di 2 gocce/secondo e portata a secco. La tossina, trattenuta dagli anticorpi monoclonali, è stata eluita con 1,5 mL di metanolo (per HPLC) a un flusso di 1 goccia/secondo. L'estratto raccolto in una provetta è stato portato a secco con flusso di azoto, e ripreso in 500 mL di fase mobile. 100 mL di questa soluzione sono stati iniettati in HPLC. L'analisi è stata eseguita mediante HPLC con rivelatore UV a serie di diodi (DAD) impostato a 220 nm (Agilent Technology Series 1100) e colonna a fase inversa Synergi Hydro RP 80A, 3 × 15 cm, 4 µm (Phenomenex, USA). Come fase mobile è stata utilizzata una miscela isocratica acetonitrile-acqua (10/90, v/v) a un flusso di 1.0 mL/min.

La quantificazione della tossina è stata effettuata mediante confronto con la retta di calibrazione ottenuta con soluzioni standard di DON a diversa concentrazione. I campioni il cui contenuto di DON superava 3000 ng/g sono stati rianalizzati, previa opportuna diluizione dell'estratto con acqua distillata prima della purificazione su colonna a immunoaffinità.

I recuperi medi, ottenuti contaminando artificialmente con DON campioni di controllo a livelli di 100 - 500 - 1000 e 2000 ng/g (3 repliche), sono stati maggiori dell'85% con deviazioni standard relative (CV) minori del 10%. Il limite di rivelabilità del metodo è risultato pari a 20 ng/g (basato su un rapporto segnale-rumore 3:1). Il DON standard utilizzato per gli esperi-

menti di recupero e per le curve di calibrazione per l'analisi HPLC è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich (Milano).

Analisi ELISA. Le analisi del DON sono state effettuate utilizzando il protocollo r-biopharm allegato al kit. Ciascun campione (5 g) di frumento macinato, dopo aggiunta di 25 mL di acqua distillata, è stato omogeneizzato vigorosamente per 3 minuti. Gli estratti sono stati filtrati con carta da filtro (Whatman N. 1). A 50 µL di tali estratti, opportunamente trasferiti nei pozzetti della piastra, sono stati addizionati 50 µL di enzima-coniugato e 50 µL di soluzione contenente l'anticorpo. Dopo lenta agitazione, il tutto è stato incubato per 30 min a temperatura ambiente. Dopo rimozione completa delle soluzioni presenti nei pozzetti e ripetuti lavaggi (n=3) con soluzione PBS, sono stati aggiunti nei pozzetti 100 µL del substrato/cromogeno e la piastra è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo aggiunta della soluzione bloccante è stata effettuata la lettura spettrofotometrica (a 450 nm) entro 10 minuti dall'aggiunta.

La quantificazione della tossina è stata effettuata mediante confronto con la curva di calibrazione ottenuta con le soluzioni standard di DON a diversa concentrazione forniti con il kit. I campioni il cui contenuto di DON superava 500 ng/g sono stati rianalizzati, previa opportuna diluzione dell'estratto con acqua distillata.

I recuperi medi, ottenuti contaminando artificialmente con DON campioni di controllo a livelli di 100 - 500 - 2000 ng/g (3 repliche), sono stati maggiori dell'85% con deviazioni standard relative (CV) minori del 20%. Il limite di rivelabilità del metodo è risultato pari a 18,5 ng/g.

Le specifiche tecniche dei due metodi a confronto sono riportate in tabella 1.

	ELISA ^a	HPLC ^c
Specificità	NO ^b	SI
Accuratezza	85-110%	85-90%
Precisione (DSR)	15-20%	5-8%
Limite di rivelabilità (LOD)	18,5 ng/g	20 ng/g
Intervallo di linearità	18,5-500 ng/g	20-3000 ng/g
Tempo di analisi (<i>per 10 campioni</i>)	1 ora	3 ore
Costo per campione	20-30 euro	50-60 euro
^a RIDASCREEN® DON; ^b >100% cross-reattività con 3 Ac-DON e -19% con 15-Ac-DON; ^c clean-up dell'estratto con colonne a immunoaffinità DONtest™ HPLC. DSR = Deviazione Standard Relativa; LOD = Limit of Detection.		

Tab. 1 *Specifiche tecniche/performance dei due metodi messi a confronto (ELISA e HPLC) applicati al frumento*

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sia per il frumento duro che per il frumento tenero, quasi tutti i campioni risultati contaminati da DON con analisi ELISA sono risultati contaminati anche con analisi HPLC. La tecnica ELISA ha dato risultati “falsi positivi” solo nell’1,5% dei campioni analizzati di frumento tenero (4 campioni su 259) e nel 3,5% dei campioni di frumento duro (12 campioni su 341) e risultati “falsi negativi” rispettivamente nell’1,2% e 1,8% di campioni di frumento tenero e duro (tabb. 2 e 3). Tuttavia, queste discordanze sono state osservate solo a bassi livelli di contaminazione (<100 ng/g).

Il confronto tra i livelli di tossina determinati con le due tecniche analitiche (ELISA e HPLC) per la totalità dei campioni di frumento tenero (n=222) e frumento duro (n=256) contaminati da DON a livelli maggiori di 18,5 ng/g ha mostrato una buona linearità, con coefficienti di correlazione (r) rispettivamente di 0,9684 (intervallo di contaminazione 18,5-7150 ng/g) e 0,9888 (intervallo di contaminazione 18,5-13600 ng/g). Poiché la maggior parte dei campioni contaminati rientrava nell’intervallo 18,5-1500 ng/g per il

FRUMENTO TENERO		
	n. campioni/totale analizzati	%
Falsi positivi	4/259	1,5
Falsi negativi	3/259	1,2
$[\text{DON}]_{\text{ELISA}} < [\text{DON}]_{\text{HPLC}}^a$	21/222 ^b	9,5
$[\text{DON}]_{\text{ELISA}} > [\text{DON}]_{\text{HPLC}}^a$	196/222 ^b	90,5
$[\text{DON}]_{\text{ELISA}} > 1,5 [\text{DON}]_{\text{HPLC}}^a$	87/196	44,4
^a $[\text{DON}]_{\text{ELISA}}$ = concentrazione di DON determinata con ELISA; $[\text{DON}]_{\text{HPLC}}$ = concentrazione di DON determinata con HPLC; ^b campioni contaminati a livelli > LOD (18,5 ng/g).		

Tab. 2 Prestazioni del kit RIDASCREEN®DON per la determinazione di deossinivalenolo (DON) in frumento tenero

FRUMENTO DURO		
	n. campioni/totale analizzati	%
Falsi positivi	12/341	3,5
Falsi negativi	6/341	1,8
$[\text{DON}]_{\text{ELISA}} < [\text{DON}]_{\text{HPLC}}^a$	52/256 ^b	20,3
$[\text{DON}]_{\text{ELISA}} > [\text{DON}]_{\text{HPLC}}^a$	204/256 ^b	79,7
$[\text{DON}]_{\text{ELISA}} > 1,5 [\text{DON}]_{\text{HPLC}}^a$	60/204	29,4
^a $[\text{DON}]_{\text{ELISA}}$ = concentrazione di DON determinata con ELISA; $[\text{DON}]_{\text{HPLC}}$ = concentrazione di DON determinata con HPLC; ^b campioni contaminati a livelli > LOD (18,5 ng/g).		

Tab. 3 Prestazioni del kit RIDASCREEN®DON per la determinazione di deossinivalenolo (DON) in frumento duro

FRUMENTO TENERO			
DON (ng/g)	n. campioni	r	$y = ax \pm b$
18,5 - 7150	222	0,9684	$y = 0,841x - 36,336$
18,5 - 1500	199	0,8997	$y = 0,815x - 16,175$
18,5 - 300	78	0,6075	$y = 0,701x + 1,891$
300 - 1500	121	0,8509	$y = 0,806x - 7,812$

Tab. 4 Parametri di correlazione lineare ELISA vs HPLC per il frumento tenero

FRUMENTO DURO			
DON (ng/g)	n. campioni	r	$y = ax \pm b$
18,5 - 13600	256	0,9888	$y = 1,016x - 68,017$
18,5 - 2000	217	0,9581	$y = 0,901x - 1,567$
18,5 - 300	101	0,8287	$y = 0,937x - 12,829$
300 - 2000	116	0,9304	$y = 0,883x - 16,974$

Tab. 5 Parametri di correlazione lineare ELISA vs HPLC per il frumento duro

frumento tenero (199 campioni su 222) e 18,5-2000 ng/g (217 campioni su 256) per il frumento duro, si è ritenuto opportuno valutare la correlazione dei risultati ottenuti con i due metodi in questo intervallo di concentrazione. Anche in questo caso è stata osservata una buona correlazione: $r=0,8997$ per il frumento tenero e $r=0,9581$ per il frumento duro (tabb. 4 e 5; figg. 1 e 2).

Va sottolineato che i livelli di DON determinati con metodo ELISA sono risultati meno accurati a bassi livelli di contaminazione (<300 ng/g), soprattutto per il frumento tenero per cui è stato osservato un coefficiente di correlazione (r) di 0,6075 tra i risultati ottenuti con il metodo ELISA e quelli ottenuti con il metodo HPLC (tab. 4), mentre il coefficiente di correlazione per il frumento duro, pari a $r=0,8287$, risulta ancora elevato (tab. 5).

Dall'analisi HPLC sono risultati positivi alla contaminazione da DON 222 campioni di frumento tenero e 256 campioni di frumento duro dei quali, rispettivamente, il 9,5% e il 20,3% con valori ELISA inferiori a quelli HPLC, il 90,5% e il 79,7% con valori superiori. Inoltre nell'ambito di questi ultimi due gruppi (concentrazione di DON determinata con ELISA superiore a quella determinata con HPLC) il contenuto di tossina è risultato sovrastimato di almeno 1,5 volte nel 44,4% dei campioni di frumento tenero e nel 29,4% dei campioni di frumento duro (tabb. 2 e 3). Dal confronto fra i dati HPLC ed ELISA emerge, quindi, la tendenza di quest'ultimo metodo a sovrastimare le concentrazioni di DON rispetto alla determinazione cromatografica. Questo dato può in parte trovare spiegazione nel fatto che l'anticorpo utilizzato nel test ELISA, oltre al DON, ha affinità per altri metaboliti del

DON, in particolare i precursori acetilati, anche essi tossici. Considerando il valore medio dei livelli di DON determinati con le due tecniche analitiche nei

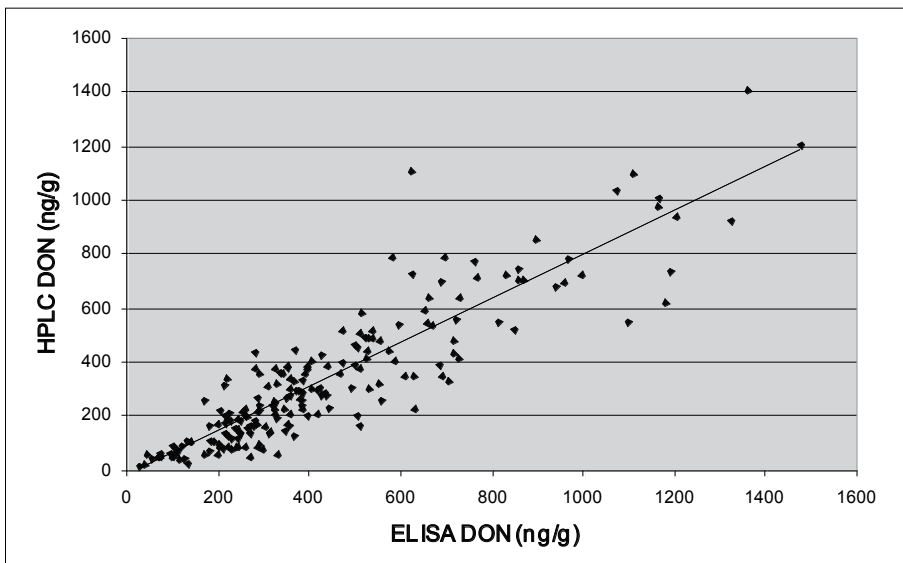


Fig. 1 *Frumento tenero* - Regressione lineare ELISA vs HPLC ($r = 0,8997$, $n = 199$, intervallo di contaminazione DON = 18,5 - 1500 ng/g)

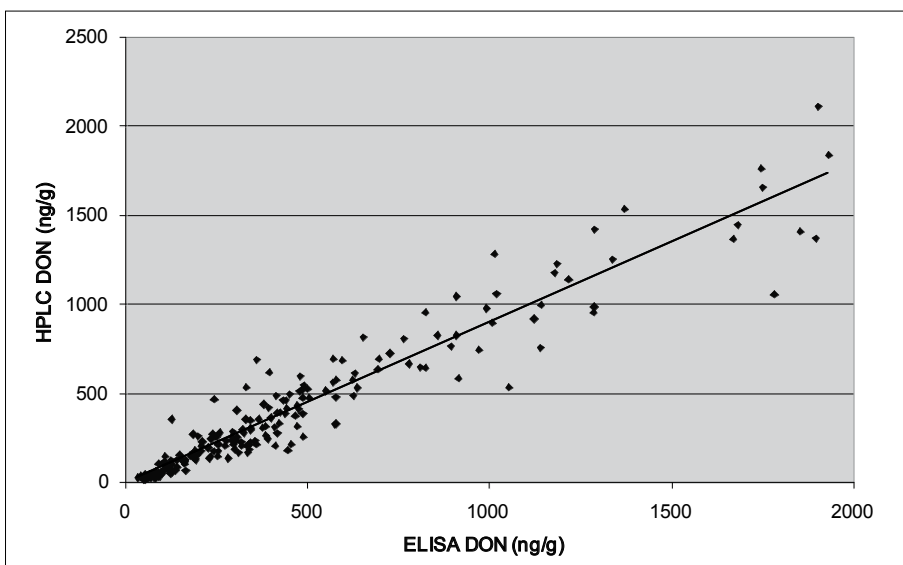


Fig. 2 *Frumento duro* - Regressione lineare ELISA vs HPLC ($r = 0,9581$, $n = 217$, intervallo di contaminazione DON 18,5 - 2000 ng/g)

FRUMENTO TENERO			
DON (ng/g)	n. campioni	Valor medio ELISA (ng/g)	Valor medio HPLC (ng/g)
18,5 - 7150	222	686	571
18,5 - 1500	199	430	334
18,5 - 300	78	197	140
300 - 1500	121	579	459

Tab. 6 *Confronto dei risultati (valor medio) ottenuti con metodo ELISA e HPLC per il frumento tenero*

FRUMENTO DURO			
DON (ng/g)	n. campioni	Valor medio ELISA (ng/g)	Valor medio HPLC (ng/g)
18,5 - 13600	256	993	941
18,5 - 2000	217	427	383
18,5 - 300	101	145	123
300 - 2000	116	701	636

Tab. 7 *Confronto dei risultati (valor medio) ottenuti con metodo ELISA e HPLC per il frumento duro*

campioni analizzati, l'entità della sovrastima risulta comunque limitata, in particolar modo per il frumento duro (tabb. 6 e 7).

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio, insieme a quelli ottenuti dallo studio interlaboratorio (ring test) per la validazione del metodo ELISA per la determinazione di DON in frumento che hanno mostrato una buona concordanza con i criteri di rendimento riportati nel Regolamento CE n. 401/2006 (Brera et al., 2008, in questo Quaderno), garantiscono l'affidabilità dei risultati ottenuti con la tecnica ELISA dai due laboratori (CRA-SCV, S. Angelo Lodigiano e CRA-QCE, Roma) coinvolti nelle analisi di monitoraggio previste dal progetto.

Pertanto, i risultati di questo studio mettono in evidenza che la tecnica ELISA può essere utilizzata quale tecnica di screening per la determinazione dei livelli di DON in frumento tenero e frumento duro nelle fasi immediatamente successive alla raccolta per permettere la separazione delle partite in base al contenuto di tossina. Bisogna tuttavia tener presente che la tecnica ELISA utilizzata in questo studio (kit RIDASCREEN® DON, r-Biopharm) può produrre risultati falsi positivi e/o falsi negativi, sebbene a bassi livelli di

contaminazione (<100 ng/g), e che i risultati sono meno attendibili a bassi livelli di contaminazione da DON (<300 ng/g), in particolare per il frumento tenero. Inoltre, in generale, è stata osservata una sovrastima, più marcata nel tenero, del reale contenuto di micotossina determinato con metodo HPLC. Pertanto è consigliabile la conferma dei risultati ottenuti con ELISA mediante metodi HPLC, soprattutto in prossimità dei valori limite previsti dall'attuale legislazione.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i sigg. G. Panzarini e V. Antonacci (ISPA-CNR) per il supporto tecnico nelle analisi HPLC del DON e la dott.ssa M. Cattaneo (CRA-SCV) per il coordinamento delle attività relative alle analisi ELISA del frumento tenero.

RIASSUNTO

È stata valutata l'affidabilità di un metodo ELISA (RIDASCREEN® DON, r-Biopharm) nell'analisi del deossinivalenolo (DON) in campioni di frumento tenero e duro. I risultati delle analisi di 259 campioni di frumento tenero e 341 campioni di frumento duro, raccolti nelle annate agrarie 2006-2008, sono stati confrontati con quelli ottenuti con un metodo di riferimento HPLC basato sulla purificazione degli estratti con minicolonne a immunoaffinità. È stata osservata una bassa percentuale di risultati falsi positivi (1,5% per il frumento tenero e 3,5% per il frumento duro) e falsi negativi (1,2% per il frumento tenero e 1,8% per il frumento duro) a livelli di contaminazione <100 ng/g. L'analisi comparativa dei risultati ottenuti con le due metodiche analitiche ha evidenziato, nella totalità dei campioni contaminati da DON, una buona correlazione sia per il frumento tenero ($r=0,9684$, $n=222$, intervallo di contaminazione 18,5-7150 ng/g), sia per il frumento duro ($r=0,9888$, $n=256$, intervallo di contaminazione 18,5-13600 ng/g), sebbene, in generale, l'ELISA ha sovrastimato il contenuto di DON rispetto all'HPLC. Le analisi di DON con metodo ELISA sono risultate meno accurate a livelli di contaminazione <300 ng/g, soprattutto per il frumento tenero. L'ELISA potrebbe essere utilizzato come metodo di screening per la determinazione di DON in frumento tenero e duro sebbene una conferma dei risultati con un metodo più affidabile, come per esempio l'HPLC, è necessaria soprattutto in prossimità dei valori limite previsti dall'attuale legislazione.

ABSTRACT

Comparison between ELISA and HPLC methods for the determination of deoxynivalenol (DON) in common and durum wheat. The reliability of an ELISA method (RIDASCREEN® DON, r-Biopharm) in the analysis of deoxynivalenol (DON) in common and durum

wheat has been evaluated. 259 common wheat samples and 341 durum wheat samples harvested in 2006-2008 growing seasons were analyzed and the results compared with those obtained with a reference method based on immunoaffinity columns clean-up and HPLC analysis. A low percentage of false positives (1.5% for soft wheat and 3.5% for durum wheat) and false negatives results (1.2% for soft wheat and 1.8% for durum wheat) has been observed at levels of contamination <100 ng/g. A good correlation was observed for all positives samples of both common wheat ($r=0.9684$, $n=222$, range of contamination 18.5-7150 ng/g) and durum wheat ($r=0.9888$, $n=256$, range of contamination 18.5-13600 ng/g). DON levels determined by ELISA were less accurate at levels lower than 300 ng/g, especially for common wheat. In general, the ELISA method overestimated DON content as compared to the HPLC one. ELISA could be used as a screening method for the determination of DON in common and durum wheat, although confirmatory analyses by more robust methods, such as HPLC, are required for contamination levels that approach the legal limits.

BIBLIOGRAFIA

- KOLOSOVA A.Y., SIBANDA L., DUMOULIN F., LEWIS J., DUVEILLER E., VAN PETEGHEM C., DE SAEGER S. (2008): *Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges*, «Analytica Chimica Acta», 616, pp. 235-244.
- KRSKA R., BAUMGARTNER S., JOSEPHS R. (2001): *The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals*, «Fresenius Journal Analytical Chemistry», 371 (3), pp. 285-299.
- LANGSETH W., RUNDBERGET T. (1998): *Instrumental methods for determination of non-macrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures*, «Journal of Chromatography A», 815, pp. 103-121.
- LIPPOLIS V., PASCALE M., VISCONTI A. (2006): *Optimization of a fluorescence polarization immunoassay for rapid quantification of deoxynivalenol in durum wheat based products*, «Journal of Food Protection», 69, pp. 2712-2719.
- MACDONALD S.J., CHAN D., BRERETON P., DAMANT A., WOOD R. (2005): *Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study*, «Journal of AOAC International», 88, pp. 1197-1204.
- PASCALE M., BOTTALICO A., PANCALDI D., PERRONE G., VISCONTI A. (2002): *Occurrence of deoxynivalenol in cereals from experimental fields in various Italian regions*, «Petria», 12, pp. 123-129.
- SCHNEIDER E., CURTUI V., SEIDLER C., DIETRICH R., USLEBER E., MÄRTLBAUER E. (2004): *Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes*, «Toxicology Letters», 153, pp. 113-121.
- TÜDÖS A.J., LUCAS-VAN DEN BOS E.R., STIGTER E.C. (2003): *Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 51, pp. 5843-5848.

GABRIELLA AURELI*, MARIA GRAZIA D'EGIDIO*,
ANDREINA BELOCCHI*, ERSILIO DESIDERIO*

Monitoraggio delle produzioni nazionali di frumento duro per la presenza di deossinivalenolo (DON)

INTRODUZIONE

La coltivazione del frumento duro, che a livello mondiale è meno diffusa rispetto a quella del frumento tenero, in Italia riveste un ruolo di primario interesse in quanto fornisce la materia prima all'industria di trasformazione per la produzione della pasta. L'area di coltivazione del grano duro è tradizionalmente diffusa in particolare nel Meridione, soprattutto Puglia e Sicilia, in aree agricole caratterizzate da carenza idrica e nelle quali spesso non sussistono alternative colturali. Tale coltivazione si è estesa negli ultimi anni anche in alcune zone del Centro-Nord dove le condizioni agro-climatiche consentono il raggiungimento di elevati livelli produttivi. Inoltre, a partire dagli ultimi decenni del XX secolo, si è sviluppato un grande interesse da parte dei *breeders* verso la realizzazione di varietà con caratteristiche innovative, rispetto a quelle tradizionalmente coltivate, sempre più rispondenti alle esigenze dell'industria di trasformazione.

Gli aspetti qualitativi del frumento duro continuano a essere oggetto di ricerca e sperimentazione soprattutto riguardo ad alcuni obiettivi fra i quali il miglioramento delle caratteristiche merceologiche della materia prima, particolarmente in relazione ad alcuni aspetti fondamentali come il contenuto e la composizione in proteine e, non meno importante, lo studio dei problemi fitopatologici del frumento nelle varie fasi di coltivazione da cui dipendono in larga misura le caratteristiche igienico-sanitarie del prodotto. Riguardo a quest'ultimo punto assumono una particolare importanza i fenomeni di attacchi fungini, fra i quali i più diffusi in questo tipo di coltura sono quelli legati alla fusariosi della spiga (*Fusarium* Head Blight – FHB), una malattia della quale sono responsabili numerose specie fungine (Klix et al., 2007; Lemmens

* CRA-QCE, Unità di Ricerca per la Valorizzazione qualitativa dei Cereali, Roma

et al., 2005; Rocha et al. 2005; Parry et al., 1995) fra le quali le più frequenti nel frumento sono *F. culmorum*, *F. poae* e *F. graminearum*, quest'ultima ritenuta la specie più virulenta (Miller, 2008). La complessità eziologica della malattia ne giustifica, fra l'altro, sia l'ampia diffusione geografica che la variabilità stagionale (Rossi, 2006). In Italia la fusariosi risulta diffusa in varie aree cerealicole, particolarmente in alcuni microareali del Centro-Nord, dove è in grado di svilupparsi in concomitanza di eventi climatici primaverili eccezionalmente piovosi. Infatti, le condizioni climatiche caldo-umide coincidenti con le fasi fenologiche comprese fra la spigatura e la maturazione latteo-cerosa possono favorire lo sviluppo della malattia verso la quale il frumento duro risulta essere, fra i cereali a paglia, la specie che mostra maggiore sensibilità (Balmas, 2006; Moretti et al., 2002).

All'infezione del frumento da parte delle specie di *Fusarium* produttrici di deossinivalenolo (DON) può seguire l'accumulo di tale micotossina nel seme nel quale la medesima può permanere fino alle fasi successive al raccolto e cioè durante la conservazione e la trasformazione della materia prima fino al prodotto finito. A tale proposito è importante considerare due aspetti che sono in relazione alla valutazione e alla gestione del rischio igienico-sanitario: la distribuzione della micotossina nell'ambito della struttura della cariosside e la stabilità della stessa durante i processi di trasformazione della materia prima. Riguardo al primo aspetto, la concentrazione di DON nel frumento non ha una distribuzione omogenea all'interno della cariosside dato che è più alta nei tegumenti esterni che dopo la molitura vanno a costituire i cosiddetti prodotti di scarto (soprattutto crusca), rispetto alle zone interne della cariosside stessa dalle quali ha origine, nel frumento duro, la semola (Aureli et al., 2007; Trigo-Stockli et al., 1996); il DON, inoltre, tende a concentrarsi nelle frazioni con granulometria più piccola le quali, se eliminate, permettono un significativo abbattimento della tossina (Avantaggiato et al., 2002). Nella valutazione del rischio, pertanto, è importante anche considerare l'aspetto tecnologico e la destinazione d'uso degli sfarinati. In particolare, il processo di molitura comporta un abbattimento di DON, pari al 63% nella semola di grano duro e al 74% nella farina di grano tenero, fatto 100 il valore relativo al frumento non pulito (Campagna et al., 2005); a causa delle caratteristiche di idrosolubilità della molecola si ha inoltre una ulteriore perdita della tossina nell'acqua di cottura della pasta che comporta una riduzione complessiva dell'80% rispetto al livello iniziale.

Considerata la generale stabilità delle micotossine (tra le quali il DON) e la conseguente resistenza delle stesse a trattamenti fisici, chimici e biologici di detossificazione, il mezzo più efficace per gestire il rischio sanitario della materia prima lungo le varie fasi della filiera che portano al prodotto finito è

rappresentato dalle azioni di prevenzione della contaminazione e della diffusione della malattia fungina in campo.

METODI DI CAMPIONAMENTO E DI ANALISI

L'attività di monitoraggio per la determinazione del deossinivalenolo nel frumento duro nazionale, che si è svolta nell'arco di un triennio (2006-2008) nell'ambito del Progetto "MICOCER", ha previsto un programma di campionamento rappresentativo di tre diversi aspetti della realtà produttiva nazionale e, precisamente: aziende agricole, campi sperimentali e centri di stoccaggio e di trasformazione. In particolare, il prelievo di campioni direttamente presso le aziende agricole ha fornito un quadro aderente alla realtà agricola nazionale, mentre il campionamento presso i campi sperimentali appartenenti alla Rete di confronto varietale frumento duro ha permesso di effettuare un confronto dei dati, a parità di condizioni agronomiche applicate, sulla base delle tre principali variabili: condizione pedoclimatica, località di coltivazione e varietà. Inoltre, il prelievo di campioni presso i centri di stoccaggio ha fornito informazioni sulla fase immediatamente successiva al raccolto e precedente la trasformazione della materia prima.

La preparazione dei campioni di grano duro rappresentativi della zona di coltivazione e destinati all'analisi per la determinazione del deossinivalenolo, è stata eseguita secondo lo schema descritto nel Regolamento 401/2006 e ha interessato, complessivamente, le seguenti regioni: Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzo, Molise, Campania, Puglia, Basilicata, Calabria, Sardegna e Sicilia.

Il piano di campionamento e lo svolgimento delle indagini analitiche per la determinazione del DON, previsti nel progetto MICOCER per il biennio 2006-2007, sono proseguiti anche per il raccolto dell'anno 2008. Il prelievo di campioni relativi al monitoraggio aziendale e ai centri di stoccaggio, sono stati effettuati con la collaborazione di enti e aziende specificati nella tabella 1.

Nel complesso, l'insieme dei campioni di frumento duro, oggetto dell'indagine condotta nelle tre annate agrarie considerate, ha riguardato i seguenti gruppi:

- 1087 campioni provenienti dalle aziende agricole di produzione e prelevati in campo nella fase di post-raccolta (trebbiatura) oppure all'arrivo degli stessi nei centri di stoccaggio;
- 1643 campioni provenienti dai campi sperimentali della Rete nazionale di confronto varietale del frumento duro, coordinata da Ersilio Desiderio del

ELENCO COLLABORATORI
Agriservice Sementi, Lacedonia (AV)
ARSIA - Toscana, Rispescia (GR)
ARSIAL - Azienda sperimentale dimostrativa di Tarquinia (VT)
ARSSA - Abruzzo, Avezzano (AQ)
ASSAM - Marche, Ancona
Coop. ACOF, Rosciano di Fano (PU)
Coop. Agricola Apricena s.c.ar.l., Apricena (FG)
Coop. Agricola La Pineta, Cerignola (FG)
Coop. Federico II, Altamura (BA)
Coop. Terremerse, Bagnocavallo (RA)
Coop. Tuscania, Tuscania (VT)
Coop. Unità Contadina, Lavello (PZ)
CRA-ACM (ex Ist. Sper. Cerealicoltura), Acireale (CT)
CRA-CER (ex Ist. Sper. Cerealicoltura), Foggia
ERSAM Molise, Campobasso
Jolly Sgambaro s.r.l., Cerignola (FG)
Lotito Flavio, Potenza
Molini Popolari Riuniti, Umbertide (PG)
S.I.S. - Società Italiana Sementi, San Lazzaro di Savena (BO)
Solimando Michele, Puglia

Tab. 1 *Monitoraggio frumento duro (triennio 2006-2008): elenco dei collaboratori per il monitoraggio aziendale e presso i centri di stoccaggio*

CRA-QCE; è stato considerato un gruppo di sei varietà (Ciccio, Simeto, Duilio, Iride, Claudio e Cresco), sempre presenti nel triennio in tutti gli areali della Rete, scelte per diffusione e per epoca di fioritura che è progressivamente più tardiva procedendo dalla varietà Ciccio alla varietà Cresco; nel biennio 2006-2007, oltre alle sei varietà, nei principali ambienti rappresentativi delle aree della durogranicoltura, sono state analizzate anche tutte le varietà presenti nella Rete (30 in totale).

Nella figura 1 viene riportato, nel dettaglio, il numero di campioni prelevato in ciascuna regione partecipante al progetto; in rapporto, invece, alla suddivisione del territorio nazionale nei tre principali areali geografici i campioni totali risultano così suddivisi: 285 nel Nord, 1063 nel Centro e 1382 nel Sud-isole.

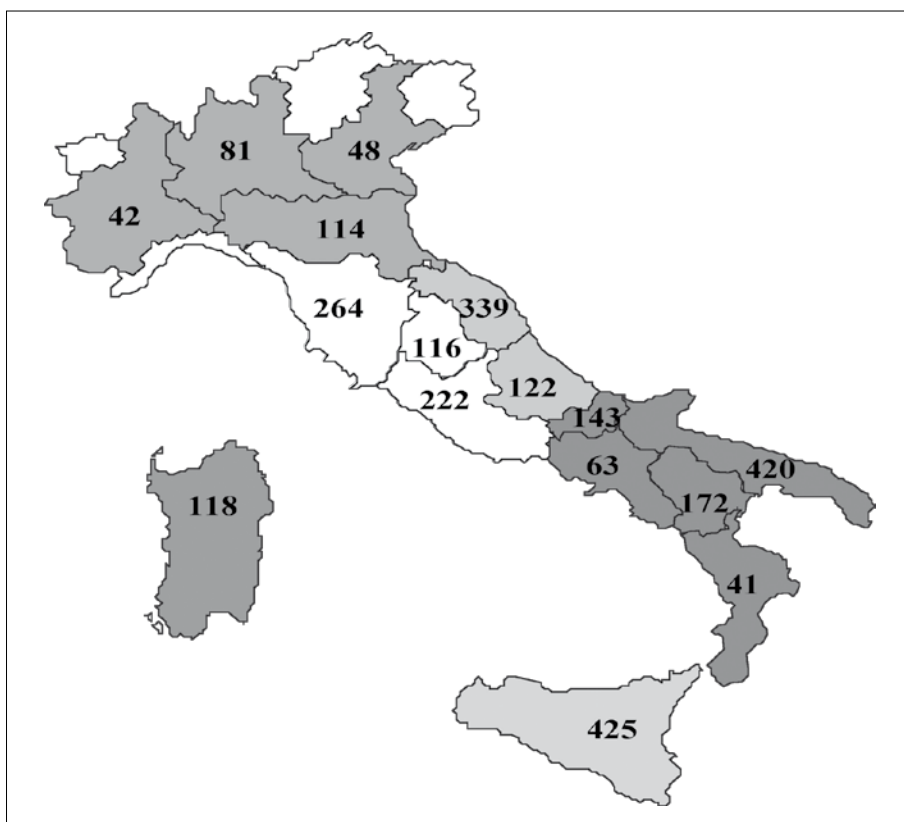


Fig. 1 *Dislocazione geografica dei campioni di frumento duro*

L'analisi di *screening* del deossinivalenolo è stata eseguita presso il CRA-QCE di Roma utilizzando un test immunoenzimatico ELISA (kit Ridascreen®-DON, R-Biopharm), con un limite di sensibilità di 18,5 ppb e un recupero di tossina nei cereali compreso fra l'85 e il 110%. Sul 12% dei campioni totali è stata effettuata la determinazione del DON con metodo cromatografico (HPLC) a cura dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Bari.

La scelta del metodo analitico di tipo immunoenzimatico è stata effettuata considerando principalmente due aspetti:

- l'analisi permette di effettuare, in tempi relativamente brevi, una prima indagine di *screening* riguardante un grande numero di campioni;
- la caratteristica di cross-reattività del sistema immunoenzimatico, che permette di "riconoscere", oltre alla tossina principale, anche composti a essa

correlati e comunque tossici (es.: precursori acetilati, nivalenolo, fusarenone, ecc.), è utile al fine di individuare i campioni positivi non solo per la presenza della micotossina stessa ma anche dei suddetti composti.

L'affidabilità del test ELISA per il DON utilizzato nell'analisi di screening è stata verificata preliminarmente in uno studio interlaboratorio, svolto nell'ambito dello stesso progetto MICOCER, e successivamente confermata dal *ring test* ai fini della procedura di validazione del metodo analitico (Brera et al., 2008).

RISULTATI

Per una corretta interpretazione dei risultati di seguito riportati è opportuno ricordare che in base alla normativa europea, e sulla base della valutazione del rischio per la popolazione, i limiti massimi ammissibili di DON nella granello di frumento duro sono di 1750 ppb (Reg. CE n. 1881/2006).

Nella tabella 2 sono riportati i dati relativi al DON nei campioni di frumento duro (in totale 1087) provenienti dal monitoraggio aziendale e presso i centri di stoccaggio, relativi alle zone di coltivazione del Centro (436) e del Sud-Isole (651) nei tre anni considerati. Al riguardo, risulta evidente il maggiore grado di contaminazione rilevato nelle aree centrali rispetto a quelle meridionali, in particolare per quanto riguarda i valori medi della concentrazione di DON nei campioni positivi (valori più elevati: 477 ppb contro 54 ppb) ed i livelli più alti di contaminazione (13561 ppb contro 906 ppb). Anche l'andamento climatico nelle tre diverse annate ha avuto una ricaduta evidente sulla presenza di DON, con i valori medi e massimi più alti nel 2008 nelle regioni centrali, mentre in quelle meridionali i valori medi dei campioni positivi sono pressoché irrilevanti in quanto inferiori a 100 ppb. Nell'Italia centrale l'annata 2008 ha fatto registrare anche il maggior numero di campioni positivi rispetto agli altri due anni.

I dati sulla rilevazione del DON nei campioni (in totale 1643) provenienti dai campi della Rete nazionale frumento duro (tab. 3) mostrano un forte grado di contaminazione nelle zone del Nord rispetto ai restanti areali, sia per quanto riguarda i valori medi di concentrazione in tutti e tre gli anni, e in particolare nel 2008 (2211 ppb), sia per i valori massimi raggiunti (1280 ppb nel 2006 e 6764 ppb nel 2008). Nel Centro il livello massimo è risultato pari a 4613 ppb nel 2008 a fronte del minor numero (81) di campioni positivi rispetto agli altri due anni. Nelle regioni meridionali e insulari, inoltre, la contaminazione media si mantiene sempre su valori inferiori a 100 ppb e con

ANNI	CENTRO					SUD-ISOLE				
	n. totale	n. neg.	n. pos.	media pos. (ppb)	massimo (ppb)	n. totale	n. neg.	n. pos.	media pos. (ppb)	massimo (ppb)
2006	150	90	60	84	449	299	225	74	54	906
2007	152	66	86	286	4351	254	165	89	48	422
2008	134	20	114	477	13561	98	70	28	45	329
Totale	436	176	260	—	—	651	460	191	—	—

Tab. 2 Monitoraggio frumento duro a livello aziendale e presso i centri di stoccaggio: contaminazione da DON

ANNI	NORD					CENTRO					SUD-ISOLE				
	n. totale	n. neg.	n. pos.	media pos. (ppb)	massimo (ppb)	n. totale	n. neg.	n. pos.	media pos. (ppb)	massimo (ppb)	n. totale	n. neg.	n. pos.	media pos. (ppb)	massimo (ppb)
2006	84	29	55	291	1280	258	129	129	225	791	297	251	46	62	219
2007	135	4	131	174	502	264	75	189	155	1285	305	132	173	88	459
2008	66	0	66	2211	6764	102	21	81	480	4613	132	88	44	57	233
Totale	285	33	252	—	—	624	225	399	—	—	734	471	263	—	—

Tab. 3 Rete nazionale frumento duro: contaminazione da DON

valori massimi che non superano i 500 ppb in ciascuno dei tre anni. Nel complesso, i livelli di concentrazione di deossinivalenolo tendono a decrescere progressivamente procedendo dalle regioni del Nord verso il Meridione dove si raggiungono i valori minimi.

Nella tabella 4, relativa alla percentuale dei campioni positivi sul totale di quelli esaminati (incidenza %), è interessante osservare la sostanziale similitudine per il Centro e del Sud-Isole tra i risultati relativi al monitoraggio aziendale (61% e 30% rispettivamente) e alla Rete nazionale (67% e 35% rispettivamente). È particolarmente evidente l'influenza delle condizioni climatiche annuali, soprattutto per quanto riguarda il progressivo aumento di incidenza del DON dal 2006 al 2008 nelle aree del Nord e del Centro ma non in quelle meridionali e insulari nelle quali, a eccezione del dato relativo alla Rete nel 2007, il livello massimo non supera mai il 35%. Le zone più colpite dalla presenza di DON sono risultate comunque quelle appartenenti all'areale Nord, nel quale è stata rilevata la percentuale di incidenza più elevata in ciascuno dei tre anni che ha raggiunto il livello massimo (100%) nel 2008.

Il campionamento relativo alla Rete nazionale di frumento duro ha reso possibile il confronto fra le varietà in prova in condizioni sperimentali con-

ANNI	MONITORAGGIO AZIENDALE			RETE NAZIONALE			
	Centro	Sud-Isole	Media	Nord	Centro	Sud-Isole	Media
2006	40	25	33	65	50	15	43
2007	57	35	46	97	72	57	75
2008	85	29	57	100	79	33	71
Media	61	30	–	87	67	35	–

Tab. 4 Incidenza % (n. positivi sul totale dei campioni) nel triennio

PRECOCI → TARDIVE	VARIETÀ	2006		2007		2008	
		valore medio	valore massimo	valore medio	valore massimo	valore medio	valore massimo
	<i>Ciccio</i>	209	782	124	436	1010	6383
	<i>Simeto</i>	187	735	161	1285	1164	6764
	<i>Duilio</i>	230	740	141	1051	1120	4804
	<i>Iride</i>	132	476	133	453	838	4008
	<i>Claudio</i>	104	341	101	301	799	3875
	<i>Creso</i>	189	905	112	913	902	5207

Tab. 5. Rete nazionale – valori (ppb) medi e massimi della contaminazione da DON nei campioni positivi

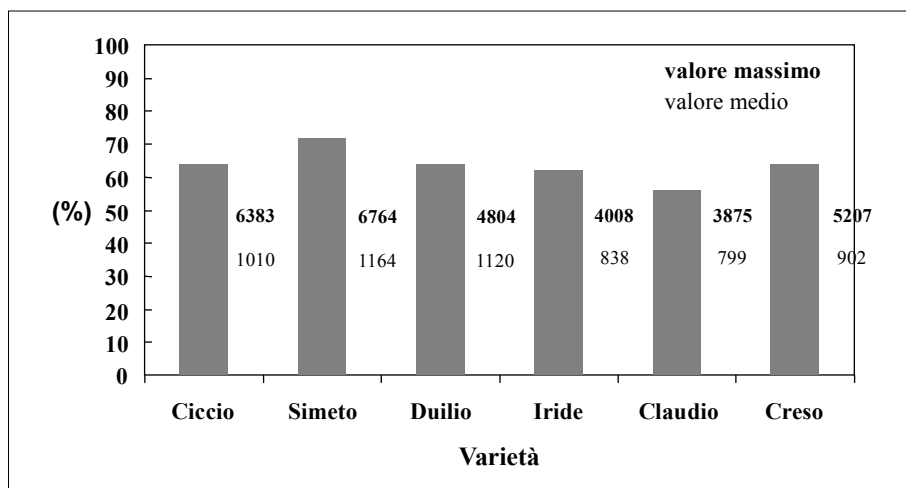


Fig. 2 Rete nazionale (anno 2008): incidenza % (n. positivi sul totale dei campioni), valori (ppb) medi e massimi di DON

trollate in tutti i campi. Nella tabella 5, nella quale sono riportati i valori medi e massimi di DON nei campioni positivi riscontrati nelle sei varietà, si può osservare che il livello di contaminazione nei tre anni è piuttosto uniforme, e non marcatamente differenziato, soprattutto per quanto riguarda i valori medi. Tale andamento è evidente sia negli anni con basso grado di contaminazione da DON (2006 e 2007) sia nel 2008 durante il quale l'accumulo di micotossina è stato di gran lunga più consistente a causa delle condizioni climatiche che hanno favorito la diffusione della fusariosi specialmente nelle regioni del Nord.

In figura 2 sono riportati i dati relativi alla percentuale di incidenza dei campioni positivi, alla contaminazione media e ai livelli massimi di concentrazione del DON delle sei varietà considerate nel 2008. Al riguardo si può osservare che non si evidenziano sostanziali differenze fra le varietà, soprattutto in rapporto all'epoca di fioritura.

CONCLUSIONI

Il sistema di monitoraggio della contaminazione da DON, adottato nell'ambito del triennio del Progetto MICOCER ha fornito, nell'insieme, un quadro piuttosto ampio di informazioni sul diverso grado di diffusione e sull'entità della presenza di questa micotossina nei campioni esaminati, sia in

relazione alla posizione geografica delle località che in funzione delle condizioni climatiche delle singole annate. L'adozione del metodo immunoenzimatico (ELISA) per l'analisi di *screening* ha permesso di ottenere, in tempi relativamente brevi, dati analitici su un grande numero di campioni di frumento duro rappresentativi di numerose aree di coltivazione del territorio nazionale.

Sulla base dei risultati ottenuti è possibile evidenziare la forte influenza soprattutto dell'ambiente di coltivazione e dell'andamento climatico. Al riguardo è importante comunque precisare che sebbene vi sia, in senso generale, un diverso andamento nel grado di incidenza e di entità di accumulo di DON procedendo dalle zone del Nord verso quelle del Sud, la valutazione del rischio di contaminazione deve tener conto soprattutto dell'ambiente inteso come microareale, cioè delle caratteristiche pedo-climatiche proprie delle singole zone di coltivazione. Tale considerazione vale soprattutto per il Centro-Nord dato che, come dimostrano i dati relativi ai campioni di frumento duro provenienti dai campi dislocati nel Sud-isole, i valori di DON in quest'ultimo areale sono pressoché trascurabili. È inoltre interessante osservare come l'effetto delle caratteristiche climatiche dell'annata agraria sul grado di incidenza e i valori massimi di concentrazione di DON siano molto più pronunciati nelle zone di coltivazione del Centro-Nord rispetto a quelle dislocate nel Meridione; in queste ultime, infatti, il clima svolge un ruolo determinante durante il ciclo colturale del frumento duro nel contrastare in modo efficiente la diffusione della fusariosi e l'accumulo di DON, a conferma quindi della tradizionale vocazionalità di questi territori.

Nonostante non si siano evidenziate differenze sostanziali nel grado di suscettibilità alla contaminazione da DON nelle sei cultivar sempre presenti nel triennio, la scelta varietale, in funzione non solo delle caratteristiche agronomiche ma anche dell'adattabilità all'ambiente di coltivazione, rimane comunque uno degli aspetti più importanti di cui tener conto al fine di ottenere una materia prima con caratteristiche di elevata qualità di cui l'aspetto igienico-sanitario rappresenta il requisito fondamentale. Da ricordare, infine, che gran parte delle varietà di frumento duro sono state selezionate in ambienti meridionali, dove gli attacchi di fusariosi della spiga sono generalmente trascurabili e che solo da alcuni anni è stata avviata una selezione di varietà meno suscettibili alla fusariosi della spiga, particolarmente negli ambienti del Centro-Nord.

RIASSUNTO

Le caratteristiche igienico-sanitarie dei cereali sono alla base della valutazione qualitativa della materia prima e dei prodotti da essa derivati, con particolare attenzione all'assenza di sostanze tossiche come le micotossine. Con riferimento a queste ultime è stata svolta

una indagine per la determinazione dei livelli di contaminazione da deossinivalenolo (DON) nel frumento duro nazionale nel triennio 2006-2008. L'analisi del DON con test ELISA è stata effettuata su un totale di 2730 campioni dei quali 1087 provenienti da aziende agricole e da centri di stoccaggio e 1643 campioni provenienti da campi sperimentali. I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'ambiente e l'andamento climatico sono fattori che condizionano fortemente il grado di contaminazione. In particolare è stata rilevata una certa variabilità annuale nei livelli medi di DON nelle aree del Centro-Nord, mentre nelle zone meridionali tali livelli sono sempre pressoché trascurabili in tutto il periodo considerato. La scelta varietale, in funzione dell'ambiente di coltivazione, costituisce uno degli aspetti più importanti di cui tener conto per una gestione ottimale della coltura anche se, nello studio effettuato, non sono state rilevate differenze sostanziali tra le cultivar nel grado di suscettibilità alla contaminazione da DON.

ABSTRACT

The sanitary characteristics of cereals constitute the basis of the quality of raw material and of final products with particular attention to the absence of toxic compounds like mycotoxins. With the aim to point out the level of contamination of deoxynivalenol (DON) in durum wheat at national level, an investigation during triennial crop seasons 2006-2008 was carried out. The analysis of DON by ELISA test was made on 2730 samples, whose 1087 coming from farming crops and storage sites and 1643 samples from experimental fields. The results showed that the environment and the climatic conditions are the main factors strongly influencing the contamination degree. Particularly, some variability about mean values of DON in Central-Northern areas was detected, while in the Southern ones the DON values were negligible in all the three years. The variety choice represents one of the most important aspects related to the crop management and to the better adaptability to the growing environment though substantial differences among cultivars regarding the susceptibility to DON were not clearly shown.

BIBLIOGRAFIA

- AURELI G., D'EGIDIO M.G. (2007): *Riduzione del deossinivalenolo (DON) nel duro: efficacia della decorticazione nei processi di trasformazione del frumento*, «Tecnica Molitoria», 7, pp. 1-5.
- AVANTAGGIATO G., DE GIROLAMO A., FANELLI C., RICELLI A. (2002): *Funghi tossigeni e micotossine: metodi di decontaminazione delle derrate*, «Informatore fitopatologico», 12, pp. 43-49.
- BALMAS V. (2006): *Contro la fusariosi serve la lotta integrata*, «L'Informatore Agrario», 12 (Suppl.), pp. 24-25.
- BRERA C., DEBEGNACH F., DE SANTIS B., PANNUNZI E., BERDINI C., PRANTERA E., MIRAGLIA M. (2008): *Validazione di metodi immunoenzimatici per la determinazione delle micotossine in campioni di cereali*, «I Georgofili. Quaderni», IV.
- CAMPAGNA C., HAIDUKOWSKI M., PANCALDI D., PASCALE M., RAVAGLIA S., SILVESTRI M., VISCONTI A. (2005): *Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento*, «L'Informatore Agrario», 1, pp. 39-47.

- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (2006): Regolamento (EC) n. 401/2006, 23.02.2006, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L. 70/12.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (2006): Regolamento (EC) n. 1881/2006, 19.12.2006, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L. 364/5.
- KLIX M.B., BEYER M. AND VEREET J.A. (2008): *Effects of cultivar, agronomic practices, geographic location, and meteorological conditions on the composition of selected Fusarium species on wheat heads*, «Can. J. Plant Pathol.», 30, pp. 46-57.
- LEMMENS M., SCHOLZ U., BERTHILLER F., DALL'ASTA C., KOUTNIK A., SCHUMACHER R., ADAM G., BUERSTMAYR H., MESTERHÁZY A., KRŠKA R. AND RUCKENBAUER P. (2005): *The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for Fusarium head blight resistance in wheat*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 12, pp. 1318-1324.
- MILLER J.D. (2008): *Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges*, «Food Additives and Contaminants», 25 (2), pp. 219-230.
- MORETTI A., CORAZZA L., BALMAS V., SANTORI A., RITIENI A. (2002): *Funghi tossigeni e micotossine: filiera cerealicola*, «Informatore fitopatologico», 12, pp. 17-33.
- PARRY D.W., JENKINSON P., MCLEOD L. (1995): *Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals: a review*, «Plant Pathol.», 44, pp. 207-238.
- ROCHA O., ANSARI K. AND DOOHAN F.M. (2005): *Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review*, «Food Additives and Contaminants», 22 (4), pp. 369-378.
- ROSSI V. (2006): *Fusariosi della spiga, malattia a molte facce*, «L'Informatore Agrario», 12, (Suppl.), pp. 19-23.
- TRIGO-STOCKLI D.M., DEYOE C.W., SATUMBAGA R.F. AND PEDERSEN J.R. (1996): *Distribution of deoxynivalenol and zearalenone in milled fractions of wheat*, «Mycotoxins», 73 (3), pp. 388-391.

Monitoraggio della presenza di deossinivalenolo (DON) nella granella di frumento tenero

INTRODUZIONE

Alcune specie fungine appartenenti al genere *Fusarium* producono, nei tessuti vegetali infetti, sostanze tossiche chiamate micotossine, tra le quali prevalenti sono fumonisine e tricoteceni (e.g. deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina, T2 e HT2) (Plizzari et al., 2008). La contaminazione da micotossine può essere un problema molto grave, come testimoniato da passate epidemie. Per ridurre i possibili danni alla salute umana e agli animali in produzione zootecnica (Piva et al., 2008), molte nazioni hanno perciò emanato leggi che fissano i livelli della loro presenza nelle colture e nei prodotti trasformati. I limiti massimi ammessi per deossinivalenolo e zearalenone nel frumento tenero sono rispettivamente di 1250 ppb (parti per miliardo o ng/g) e 100 ppb (regolamento Ce 856/2005); il limite massimo per l'ocratossina è di 5 ppb (regolamenti Ce n. 472/02 e 123/05) mentre quelli relativi a T2 e HT2 sono in corso di definizione da parte dell'UE.

Allo scopo di monitorare e, eventualmente, contenere la contaminazione da micotossine nei cereali, è stato avviato un apposito progetto di ricerca di durata triennale (2005-2008) denominato "Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali – MICO-CER", coordinato dal CRA – QCE di Roma.

Nell'ambito di tale Progetto, nel biennio 2006-2007 è stata allestita una rete di monitoraggio della produzione di frumento tenero nel Centro-Nord Italia per la presenza di deossinivalenolo (tab. 1) che ha consentito di analizzare, con metodica immunoenzimatica (test ELISA), numerosi campioni di fru-

* *Cra-Scv, S. Angelo Lodigiano (Lodi)*

** *CRA-QCE, Roma*

PROGETTO	UNITÀ OPERATIVE E STRUTTURE COINVOLTE
MICOCER Periodo: 2006-2007	<ul style="list-style-type: none"> – CRA-SCV (ex ISPECER) di S. Angelo Lodigiano (LO) – Centro Ricerche Produzioni Vegetali (CRPV) – Az. Sper.le Stuard (Parma) – Coop. Terremerse di Bagnacavallo (RA) – Consorzio Agrario di Piacenza – Consorzio Agrario di Reggio Emilia – Consorzio Agrario di Bologna e Modena – Consorzio Agrario di Forlì-Cesena-Rimini – Consorzio Agrario di Ferrara – Consorzio Agrario di Ravenna – O.P. Grandi Coltive, Ferrara – O.P. Progeo, Granarolo (BO) – Unione Seminativi – Molini Popolari Riuniti di Umbertide (PG) – Aproceve (Mestre, VE) – Consorzio Agrario di Pesaro-Urbino – Agroselviter, Università di Torino

Tab. 1 *Unità Operative e Strutture coinvolte nel progetto MICOCER*

mento tenero provenienti da aziende e centri sperimentali ubicati nelle principali aree cerealicole di Piemonte, Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto, Toscana, Umbria e Marche. Ultimate le analisi con il metodo immunoenzimatico, il 10-15% dei campioni monitorati è stato inviato al laboratorio dell'ISPA-CNR di Bari per la determinazione del DON con metodica HPLC.

In seguito all'andamento climatico della primavera 2008, classificata tra le più piovose degli ultimi due secoli, sulla base dei dati dell'Istituto di Scienze dell'Atmosfera e del Clima del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Isac-Cnr), è stato ritenuto opportuno effettuare anche per l'annata agraria 2007-08 un certo numero di analisi inizialmente non previste all'interno del progetto. Le abbondanti precipitazioni che hanno caratterizzato soprattutto l'areale del Nord Italia nel periodo di fioritura, uno degli stadi di crescita delle piante più vulnerabili nei confronti dell'attacco da parte dei patogeni, hanno portato, in seguito a una smisurata crescita del micelio fungino, a un massiccio attacco delle spighe di quasi la totalità dei cereali a paglia coltivati, con un conseguente contenuto in micotossine, almeno per quanto riguarda il deossinivalenolo, decisamente insolito e di molto superiore alla media degli altri due anni di sperimentazione.

PIANO DI CAMPIONAMENTO

Nel biennio 2006-07, il monitoraggio predisposto dal CRA-SCV di S. Ange-

lo Lodigiano, in collaborazione con il CRPV, ha permesso l'analisi con test ELISA di 1267 campioni (657 nel 2006 e 610 nel 2007), così suddivisi:

- 388 campioni, prelevati al momento della trebbiatura presso aziende di 6 regioni del Centro-Nord e riferiti a 38 varietà di frumento tenero;
- 532 campioni derivati dalla rete “on farm” delle Regioni Lombardia e Piemonte, riguardanti 22 varietà;
- 347 campioni provenienti da prove parcellari della Rete nazionale di confronto tra varietà di frumento tenero, dislocate in 13 Regioni, e riferiti a 6 varietà (Bilancia, Basco, Bolero, Bologna, Isengrain e Mieti).

Nel 2008 i campioni di frumento tenero monitorati per la presenza di deossinivalenolo sono stati in totale 196, così suddivisi:

- 96 campioni denominati “aziendali” prelevati in campo al momento della trebbiatura oppure all'arrivo nei centri di stoccaggio;
- 100 campioni derivati dalla rete “on farm” della regione Lombardia.

RISULTATI

Premettendo che come negativi sono stati considerati campioni che hanno mostrato un contenuto di deossinivalenolo inferiore a 18.5 ppb (parti per miliardo) che rappresenta il limite di rilevabilità del metodo rapido immunoenzimatico ELISA (mentre il limite di rilevabilità del metodo HPLC è pari a 20 ppb), i risultati del monitoraggio effettuato sulla granella prodotta nel 2005-06 (tabb. 2, 3 e 4) mostrano una limitata incidenza di contaminazione da DON, pari al 34% dei campioni analizzati (48% dei campioni del Nord, 6% del Centro), e un livello medio di contaminazione dei campioni positivi pari a 133 ppb per il monitoraggio della rete nazionale, a 185 ppb per il monitoraggio aziendale e a 301 ppb per la sperimentazione “on farm”, valori largamente inferiori al limite massimo di 1250 ppb fissato dall'UE. Da rilevare, comunque, che sono stati riscontrati, pur se in un limitatissimo numero di microareali e per alcune varietà, poco diffuse, valori di DON superiori al suddetto limite di 1250 ppb. In particolare, nessuna delle sei varietà della Rete nazionale ha mostrato valori superiori al limite massimo di 1250 ppb, mentre solo due varietà, una del monitoraggio aziendale (non precisata) e PR22R58 della sperimentazione “on farm” hanno superato tale limite.

I risultati relativi alla stagione 2006-07 (tabb. 5, 6 e 7) evidenziano un quadro simile o lievemente più critico di quello rilevato nella stagione prece-

REGIONI	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Piemonte	20	6	14	70	151	608
Lombardia	46	16	30	65	157	621
Veneto	30	26	4	13	337	1605
Emilia Romagna	72	31	41	57	84	503
Marche/Umbria	35	1	34	97	50	50
Totale	203	80	123	61	–	–
Varietà						
Aubusson	16	3	13	81	268	367
Blasco	23	8	15	65	147	718
Bolero	8	0	8	100	–	–
Bologna	29	6	23	79	68	180
Guadalupe	8	4	4	50	283	415
Isengrain	22	14	8	36	132	608
Mieti	24	13	11	46	58	196
Totale 7 cv	130	48	82	63	–	–
Altre 30 cv	73	32	41	56	271	1605
Totale	203	80	123	61	–	–

Tab. 2 *Monitoraggio aziendale frumento tenero 2005-06. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

VARIETÀ	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Africa	27	7	20	74	117	353
Agadir	14	1	13	93	418	418
Artico	26	10	16	62	147	319
Aubusson	27	11	16	59	175	628
Avorio	27	15	12	44	278	1178
Blasco	27	10	17	63	154	483
Bologna	14	3	11	79	109	147
Bramante	14	3	11	79	81	169
Guarni	27	8	19	70	114	213
Isengrain	9	5	4	44	338	890
Nomade	27	6	21	78	120	296
PR22R58	26	11	15	58	573	1848
Altre varietà	3	1	2	67	83	83
Totale	268	91	177	66	–	–

Tab. 3 *Monitoraggio sperimentazione “on farm” frumento tenero 2005-06. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

VARIETÀ	LOCALITÀ	CAMPIONI NORD		CAMPIONI CENTRO		CAMPIONI SUD		CAMPIONI POSITIVI	
		TOTALI	POSITIVI	TOTALI	POSITIVI	TOTALI	POSITIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Bilancia	31	16	10	10	1	5	0	146	521
Blasco	31	16	9	10	1	5	0	144	337
Bolero	31	16	8	10	2	5	0	134	307
Bologna	31	16	6	10	0	5	0	61	107
Isengrain	31	16	7	10	1	5	0	174	429
Mieti	31	16	7	10	0	5	0	109	300
AREALE	CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI				
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX			
Nord	96	47	49	51	143	521			
Centro	60	5	55	92	34	46			
Sud	30	0	30	100	—	—			

Tab. 4 Progetto "MICOCER" - Monitoraggio rete nazionale frumento tenero 2005-06. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON

REGIONI	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Piemonte	20	10	10	50	393	1794
Lombardia	39	26	13	33	253	4358
Veneto	30	15	15	50	127	326
Emilia Romagna	75	20	55	73	439	6896
Marche/Umbria	21	1	20	95	537	537
Totale	185	72	113	61	—	—
Varietà						
Aubusson	15	10	5	33	689	4358
Blasco	15	4	11	73	72	125
Bolero	9	1	8	89	537	537
Bologna	22	6	16	73	36	92
Guadalupe	12	2	10	83	50	53
Isengrain	19	16	3	16	216	938
Mieti	23	4	19	83	1123	4356
Totale 7 cv	115	43	72	63	—	—
Altre 31 cv	70	27	41	59	—	6896
Totale	185	72	113	61	—	—

Tab. 5 Monitoraggio aziendale frumento tenero 2006-07. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON

dente, con un'incidenza di contaminazione da DON mediamente pari al 44% dei campioni analizzati (52% al Nord, 11% al Centro), con un livello medio di contaminazione dei campioni positivi pari a 187 ppb per il moni-

VARIETÀ	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
A416	8	6	2	25	548	2175
Abate	26	14	12	46	113	436
Africa	18	13	5	28	147	425
Anapo	7	6	1	14	110	207
Apache	25	14	11	44	67	263
Aubusson	16	10	6	38	121	527
Avorio	26	14	12	46	147	715
Blasco	10	10	0	0	122	246
Bokaro	26	12	14	54	172	438
Bologna	25	11	14	56	75	186
Bramante	10	6	4	40	77	146
Isengrain	5	3	2	40	249	625
Kalango	26	16	10	39	155	490
Altre varietà	36	30	6	17	239	724
Totale	264	165	99	38	–	–

Tab. 6 *Monitoraggio sperimentazione “on farm” frumento tenero 2006-07. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

VARIETÀ	LOCALITÀ	CAMPIONI NORD		CAMPIONI CENTRO		CAMPIONI SUD		CAMPIONI POSITIVI	
		TOTALI	POSITIVI	TOTALI	POSITIVI	TOTALI	POSITIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Bilancia	27	10	3	12	1	5	0	114	222
Blasco	27	10	6	12	3	5	0	92	549
Bologna	27	10	1	12	1	5	1	192	499
Isengrain	27	10	4	12	2	4	0	352	1705
Mieti	27	10	2	12	0	5	0	165	284
PR22R58	27	10	3	12	2	5	0	229	761
AREALE	CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI				
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX			
Nord	60	19	41	68	249	1705			
Centro	72	9	63	88	78	168			
Sud	29	1	28	97	20	20			

Tab. 7 *Progetto “MICOCER” Monitoraggio aziendale frumento tenero 2006-07. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

REGIONI	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Piemonte	4	4	0	0	1922	4627
Lombardia	23	23	0	0	970	3458
Veneto	15	15	0	0	690	1869
Emilia Romagna	42	40	2	5	722	17659
Marche/Umbria	12	4	8	67	53	161
Totale	96	86	10	10	–	–

Tab. 8 *Monitoraggio aziendale frumento tenero 2007-08. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

toraggio della rete nazionale, 302 ppb per il monitoraggio aziendale e 315 ppb per la sperimentazione “on farm”. Anche nel secondo anno alcuni campioni hanno presentato un livello di contaminazione da DON superiore al limite di 1250 ppb fissato dall’UE per la granello di frumento tenero. In particolare, un solo campione (Isengrain) nell’ambito delle sei varietà della Rete nazionale ha mostrato un valore superiore al limite di 1250 ppb al Nord; una varietà (A416) ha superato il limite comunitario nella sperimentazione “on farm” condotta in Lombardia; tre varietà del monitoraggio aziendale (una non individuata, Aubusson in Piemonte e Mieti in Emilia Romagna) hanno mostrato livelli di DON superiori a quelli fissati dalla UE (Plizzari et al., 2008).

Relativamente al terzo anno di monitoraggio (2007-2008), dei 96 campioni di frumento tenero prelevati direttamente dal campo al momento della trebbiatura solo il 10% è risultato negativo, cioè con un contenuto di Don inferiore a 18.5 ppb (tab. 8). I valori medi di contaminazione riflettono un quadro abbastanza preoccupante in particolare per quanto riguarda il Piemonte (forse a causa dell’esiguo numero di campioni analizzati), ma anche, nei valori massimi, per alcuni areali della Lombardia, del Veneto e, con un valore particolarmente elevato, dell’Emilia Romagna.

Le cause di una contaminazione così marcata di tutti i campioni sono molteplici: la scelta varietale, il ringrano, la semina dopo mais, eventualmente senza l’ulteriore interrimento dei residui colturali (Blandino et al., 2008) e le condizioni meteorologiche sembrerebbero essere le cause principali di sviluppo del patogeno. Le rotazioni colturali con specie appartenenti a famiglie tassonomiche diverse sembrerebbero avere un effetto contrario a parità di trattamenti o altro; fattore principale rimangono in ogni caso le condizioni atmosferiche della specifica annata agraria, che per il 2007-08 si sono rivelate sfavorevoli per la qualità igienico-sanitaria delle coltivazioni di frumento tenero

VARIETÀ	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Aubusson	10	10	0	0	1761	4021
Azzorre	10	10	0	0	848	2253
Blasco	10	10	0	0	918	1933
Bologna	10	10	0	0	683	2071
Botticelli	10	10	0	0	805	2096
Copernico	10	10	0	0	1249	3123
Egizio	10	10	0	0	1601	3198
Exotic	10	10	0	0	1193	3199
Profeta	10	10	0	0	1887	3632
PR22R59	10	10	0	0	2706	6634
Totale	100	100	0	0	–	–

Tab. 9 *Monitoraggio sperimentazione “on farm” Lombardia frumento tenero 2007-08. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

nel nord Italia. In queste condizioni climatiche sfavorevoli può risultare necessario intervenire con trattamenti fusaricidi anche ripetuti, con evidenti aggravii di costi di produzione e con risvolti non sempre positivi in annate così piovose.

Nella sperimentazione “on farm” della regione Lombardia sono state messe a confronto dieci varietà di frumento tenero in dieci località della Lombardia: Albairate (MI), Cuggiono (MI), Gazzo Bigarello (MN), Montichiari (BS), Orzivecchi (BS), S. Angelo Lodigiano (LO), S. Rocco al porto (LO), Samarate (VA), Silvano Pietra (PV), Vigevano (PV). I dati delle analisi con test ELISA sui 100 campioni delle 10 varietà testate (tab. 9) hanno evidenziato che il 100% dei campioni sono positivi e che tutte le varietà analizzate presentano valori massimi di contaminazione di gran lunga superiori al limite di 1250 ppb.

Nonostante la tecnica colturale adottata non sia risultata omogenea tra le diverse località (anche se in ogni caso è stata eseguita l’aratura del terreno e sulle colture non sono stati effettuati trattamenti fungicidi), la media della contaminazione per varietà può fornire un’indicazione sulla tolleranza alla malattia; le varietà meno suscettibili sembrerebbero essere Bologna e Blasco, mentre PR22R58 risulterebbe molto sensibile a *Fusarium*, a conferma anche dei risultati dei due anni precedenti di sperimentazione.

I risultati delle analisi ripetute su circa il 10-15% dei campioni con metodica HPLC presso il laboratorio ISPA-CNR di Bari hanno evidenziato l’ottima rispondenza del metodo immunoenzimatico (test ELISA) come test di screening rapido, con valori del coefficiente di correlazione tra i due metodi

altamente significativi nel 2005-06 ($r=0,87$), nel 2006-07 ($r=0,96$) e nel 2007-08 ($r=0,98$).

CONCLUSIONI

La commissione Europea ha stilato una raccomandazione (Raccomandazione 2006/583/CE, del 17 Agosto 2006, pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L234 del 29 agosto 2006) a tutti gli attori della filiera dei cereali affinché adottino tutte quelle misure in grado di contenere il livello di infezione da *Fusarium* spp. nei cereali e la conseguente contaminazione delle derrate prodotte; misure peraltro ben note come, tra le altre, l'avvicendamento delle colture, la scelta di varietà meno sensibili, densità di investimento non troppo elevate e soprattutto la scelta di colture maggiormente adatte alle caratteristiche climatiche dei singoli areali. Infatti la problematica delle micotossine nel frumento è decisamente più sviluppata in quelle aree in cui le piante risultano meno adattate alle condizioni climatiche medie dell'areale stesso (per il frumento ad esempio il nord Europa), ma anche in quegli areali in cui si verificano insoliti e deleteri andamenti climatici, come è accaduto durante la primavera del 2008 al nord Italia. Osservazione avvalorata dal fatto che il contenuto di micotossine in campioni di frumento sia tenero che duro (quest'ultimo molto più sensibile all'attacco di patogeni come *Fusarium* in quanto adattato a climi più caldi e secchi) provenienti dagli areali del centro e del sud Italia è risultato pressoché trascurabile.

In conclusione, è possibile affermare che nel biennio 2005-2007 l'incidenza della contaminazione da DON è stata generalmente bassa, con valori quasi sempre al di sotto dei limiti legislativi citati in precedenza. Ben più grave è invece risultata la situazione dell'annata agraria 2007-08 con livelli medi di contaminazione prossimi o uguali al 100% e valori massimi di DON sempre superiori al limite di 1250 ppb negli areali del Nord, anche se mai superiori a tale limite negli areali dell'Italia centrale.

Infine, sembra opportuno segnalare che nel 2006 è stato effettuato un "ring test" per la validazione del metodo immunoenzimatico (test ELISA) che, anche se non validato per l'esiguità dei laboratori coinvolti, ha comunque fornito risultati validi per il laboratorio del CRA-SCV che ha effettuato le analisi con test ELISA sul frumento tenero, presentate in questo lavoro. Un secondo "ring test" effettuato nel 2008 con la partecipazione di un congruo numero di laboratori ha pienamente validato il metodo immunoenzimatico, con bassi valori di deviazione standard e di limite di detezione (Brera et al., 2008).

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Dott.ssa Cattaneo M. (CRA-SCV) per il coordinamento delle attività relative alle analisi ELISA del frumento tenero.

RIASSUNTO

Il monitoraggio della presenza della micotossina deossinivalenolo in campioni di farina integrale di frumento tenero previsto dal progetto MICOCER ha consentito negli anni 2006, 2007 e 2008 l'analisi di circa 1500 campioni, principalmente originari dell'Italia centro-settentrionale. Il 33% di questi campioni provenivano da prelievi durante la trebbiatura, il 43,2% dalla rete "On farm" e il 23,7% dalla "Rete nazionale". La contaminazione è risultata trascurabile in tutti i campioni durante i primi due anni di sperimentazione, mentre durante l'annata agraria 2007-2008 le avverse condizioni meteorologiche hanno provocato un deciso incremento della diffusione delle Fusariosi, con un significativo aumento della concentrazione della micotossina soprattutto nei campioni provenienti dal nord Italia.

ABSTRACT

The monitoring of the mycotoxin deoxynivalenole in wheat wholemeal flour during the MICOCER project, performed in the 2006, 2007 and 2008 years, allowed the analysis of about 1500 samples, mostly from northern Italy. The samples came from: collection at harvest (33%), "On farm" network (43.2%) and "National network" (23.7%). Mycotoxins contamination was negligible during the first two years of testing, while the difficult meteorological conditions of the 2007-2008 led to a strong head blight increase and, of consequence, to a significant raise of mycotoxin concentration, particularly in the northern Italy samples.

BIBLIOGRAFIA

- BLANDINO M., REYNERI A., CORBELLINI M., HAIDUKOWKI M., MAZZIERI G., SCUDELLARI D., DESIDERIO E. (2008): *La giusta tecnica colturale per il controllo della fusariosi*, «L'Informatore Agrario», 32, pp. 46-50.
- BRERA C., DEBEGNACH F., DE SANTIS B., PANNUNZI E., BERDINI C., PRANTERA E., MIRAGLIA M. (2008): *Validazione di metodi immunoenzimatici per la determinazione delle micotossine in campioni di cereali*, «I Georgofili. Quaderni», II.
- PIVA G., PIETRI A., GALLO A. (2008): *Micotossine: fattore limitante nelle produzioni animali*, «I Georgofili. Quaderni», II.
- PLIZZARI L., D. SCUDELLARI, M. CATTANEO, A. BRANDOLINI, M. PASCALE, E. DESIDERIO (2008): *Tenero, bassi livelli di micotossine ma la guardia resta alta*, «L'Informatore Agrario», 32, pp. 42-44.

ALBERTO VERDERIO*, NICOLA BERARDO*, ALDA FERRARI*, PAOLO LAGANÀ*,
CHIARA LANZANOVA*, AMEDEO PIETRI**

Le micotossine nelle produzioni italiane di mais

LA MAISCOLTURA ITALIANA

Il mais, grazie ai continui aumenti di resa ottenuti dal dopoguerra a oggi, si è affermato come il cereale più importante nel sistema di produzione agricola del nostro Paese. L'Italia è il secondo produttore e il primo consumatore di mais in Europa: alla coltura vengono destinati oltre un milione di ettari per la produzione di granella e 250-300 mila ettari per la produzione di trinciato integrale.

I volumi prodotti pari a 10-11 milioni di tonnellate di granella e 4-5 miliardi di unità foraggiere sono superiori a quelli degli altri cereali insieme considerati: le rese per ettaro sono cresciute con una percentuale media intorno al 2% per anno e la produzione nazionale a partire dagli anni 1996-1997 è riuscita a soddisfare la domanda interna per gli impieghi zootecnici (84% dei consumi), per gli impieghi industriali (12%) e per gli usi alimentari (4%).

La coltura è fortemente connessa con le attività zootecniche ed è territorialmente concentrata nella Pianura del Po (91% dell'ettarato totale), nelle regioni del Nord-Ovest (Piemonte e Lombardia con 180.000 e 250.000 ha), del Nord-Est (Veneto e Friuli Venezia Giulia con 320.000 e 80.000 ha) e nei comprensori dell'Emilia Romagna a sud del Po (con 80.000 ha). L'area di coltivazione del silomais coincide con l'area di produzione del latte e del grana padano ed è dislocata prevalentemente in Lombardia (130.000 ha) e quindi in Veneto e Piemonte.

L'aspetto qualitativo delle produzioni è stato oggetto di attenzione e di ricerca alla fine degli anni '90 quando, raggiunto un buon livello di auto ap-

* C.R.A-MAC, Bergamo

** Istituto di Scienze degli alimenti e della nutrizione-UCSC, Piacenza

provvigionamento, maturarono nuove esigenze in ordine alla “difesa” della produzione nazionale e nuove opportunità per la valorizzazione della granella di mais ricomposta in partite “supercommodity” o “identity preserved” con utilità per i diversi utilizzatori e con valore aggiunto per i produttori.

Specifiche per le partite “supercommodity” o “V.E.C.” a valori aggiunto furono in un primo tempo individuati alcuni caratteri fondamentali di natura fisico-meccanico della granella quali integrità, omogeneità, tessitura della cariosside, umidità-conservabilità; quindi furono considerate caratteristiche nutrizionali e funzionali legate alla composizione chimica (gritzi, amido separabile, proteine, acidi grassi) in grado di dare maggiore “resa” o “utilità” al primo trasformatore.

Tuttavia in corrispondenza del progredire delle conoscenze scientifiche circa funghi tossigeni, micotossine e loro effetti tossicologici sull'uomo e gli animali e in corrispondenza dell'introduzione da parte della “governante” di limiti cogenti o limiti di “attenzione” per la concentrazione delle varie tossine in cibi e mangimi, le caratteristiche nutrizionali-antinutrizionali e la sicurezza d'uso di cibi e mangimi sono diventati tratti qualitativi di maggiore “urgenza”.

I FUNGHI DEL MAIS E LE MICOTOSSINE

Il mais è la specie più studiata per gli aspetti di interazione con i funghi micotossigeni e la più monitorata per la concentrazione delle varie classi di tossine presenti nelle diverse aree di coltivazione del cereale, estese dal sub-tropico alle zone temperate fredde delle alte latitudini.

Le più importanti classi di micotossine trovate in mais comprendono le aflatossine, prodotte da funghi del genere *Aspergillus*; gli zearalenoni e i tricoteceni (*Deossinivalenolo*) prodotti da specie di *Fusarium* della Sezione *Discolor* (Nelson et al., 1983); le fumonisine prodotte da specie di *Fusarium* della Sezione *Liseola* (Nelson et al., 1983); le ocratossine prodotte da funghi del genere *Penicillium* e *Aspergillus*.

Diverse indagini condotte nelle principali aree maidicole mondiali indicano come i funghi del genere *Aspergillus*, responsabili della produzione di Aflatossine, siano specialmente diffusi nelle aree più calde di coltivazione comprese tra i 26 e i 35 gradi di latitudine (Klich et al., 1992), ma possano causare infezioni di campo significative anche a latitudini elevate in corrispondenza con andamenti stagionali eccezionalmente caldi e asciutti (CAST, 2003).

Relativamente al genere *Fusarium*, di gran lunga il più frequente nella vasta area temperata di coltivazione, le specie *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, agenti del “Marciume rosa della spiga” e responsabili della produzione di fu-

monisine, hanno un maggior adattamento nei climi più caldi e siccitosi nella fase di riempimento della granella; le specie *F. graminearum* e *F. culmorum* agenti del “marciume rosso della spiga” e responsabili della produzione di DON e Zearalenone sono frequenti nei climi più freschi e piovosi nella fase riproduttiva del mais.

Alcuni recenti lavori indicano una stretta relazione tra la latitudine e la frequenza dei marciumi rossi e rosato della spiga: *F. verticillioides* è di gran lunga prevalente nelle aree subtropicali e negli stati del Sud e del Sud-Est del Corn Belt americano (Leslie, 1995); procedendo verso Nord l'incidenza di *F. verticillioides* diminuisce in corrispondenza dell'affermazione di *F. graminearum* che diventa prevalente a partire dall'area nord dell'Illinois. Una zona di transizione è stata osservata in Iowa (Munkvold, 2003) dove isolati da coltivazioni delle contee centrali e meridionali hanno rilevato la predominanza di *F. verticillioides*, mentre nelle contee settentrionali è stato ritrovato principalmente *F. subglutinans* e quindi *F. graminearum*.

Distribuzioni simili per effetto della latitudine sono state osservate anche nelle aree di coltivazione europee (Bottalico, 1998); le indicazioni sono state confermate da una indagine condotta da Syngenta Seeds (Tanzi, 2005) nella quale sono state rilevate concentrazioni di fumonisine superiori alla media europea nelle aree di coltivazione meridionali (Spagna, Portogallo, Italia, Grecia, Francia meridionale, Paesi Balcanici) e, di contro, una prevalenza di DON e Zearalenone nelle aree settentrionali (Francia, Germania, Austria, Ungheria, Polonia, Slovacchia).

La diffusione dei diversi generi-razze fungine e la sintesi di micotossine sono quindi fondamentalmente influenzati dai determinanti climatici e agro-ambientali delle macroaree di coltivazione e in special modo dalle temperature e dall'umidità; la conoscenza tuttavia, delle caratteristiche fisiologiche degli agenti patogeni e del loro modo di agire nelle fasi critiche dell'interazione ospite-parassita permette di indirizzare, sulla base degli andamenti stagionali in corso e delle situazioni agronomiche, modelli di previsione e/o procedure di controllo delle micotossine.

Da alcuni Autori sono state proposte classificazioni in tal senso degli agenti patogeni.

Una prima suddivisione dei patogeni tra “funghi da campo” e “funghi da stoccaggio” si basa sulla diversa capacità di attaccare la pianta in vegetazione causando malattie “sistemiche” unitamente alle note sindromi dei marciumi della spiga: *Gibberella zeae*, forma sessuata di *F. graminearum*, e *F. verticillioides* sono tra i principali agenti del marciume dello stocco e delle radici (stalk rot) e della “morte prematura” della pianta (Compendium of corn diseases, 2000). Di contro, *Aspergillus* e *Penicillium* si collocano, in questa suddivisio-

ne, tra i funghi da stoccaggio per la loro limitata capacità di attacco in campo e per l'adattamento alla crescita su granella a bassa umidità durante le fasi di raccolta e post-raccolta. La capacità di crescere su substrati con umidità inferiore o uguale al 18% è spesso citata come criterio di separazione tra le due categorie di patogeni (Smith and White, 1988).

Questa suddivisione, senz'altro utile ai fini orientativi, non è in grado di separare completamente le due categorie (Munkvold, 2003): alcune specie di *Aspergillus* e *Penicillium* (e in particolare *A. flavus*) presentano, nelle macroaree calde o nelle stagioni favorevoli, evidenti fenomeni di crescita sulle spighe in maturazione: di contro, alcune specie di *Fusarium* possono crescere in fase di post-raccolta se l'umidità della granella non è adeguatamente controllata.

Miller (1995) propone una diversa classificazione dei funghi fondata sul tipo di interazione fungo-pianta nelle diverse fasi di crescita: egli distingue tra funghi patogeni "aggressivi" come *F. graminearum* che provoca malattie sistemiche della pianta; patogeni "opportunisti" come *F. verticillioides* e *A. flavus* i quali crescono e producono tossine su piante stressate (insetti e siccità) e piante senescenti; funghi come *A. flavus* che sviluppano inizialmente sulla pianta e predispongono una più estesa contaminazione dopo la raccolta; funghi come *P. verrucosum* e *A. ochraceus* presenti nel suolo e su tessuti morti in grado di moltiplicarsi in situazioni di stoccaggio permissive.

La zona di coltivazione del mais in Italia può essere a buon diritto considerata come una sorta di "terra di frontiera" per i diversi generi e specie di funghi, nella quale i confini delle aree di adattamento variano in ogni stagione di crescita in relazione della distanza dalle montagne (temperature, GDD), della frequenza degli stress evapotraspirativi (Nord-Ovest con irrigazione gravitazionale turnata vs Nord-Est con irrigazione di soccorso), dell'epoca di maturazione-raccolta (da agosto a ottobre) dell'incidenza della piramide (gradiente Ovest-Est e Nord-Sud) dell'andamento agronomico (colture in 1°, 2° e 3° semina).

IL MONITORAGGIO DELLE MICOTOSSINE

La ricerca è iniziata nel 1999 con fondi assegnati dalla Regione Lombardia al progetto di ricerca "Cerealom". Gli scopi diretti erano quelli di conoscere i reali livelli di contaminazione delle scorte di mais nazionali immesse sul mercato e nel medio periodo, di ottenere alcune "associazioni" della concentrazione di micotossine riscontrati con l'andamento stagionale, con il posizionamento nella stagione delle fasi fenologiche della coltura, con la macroarea di coltivazione, con i processi di post-raccolta e stoccaggio.

Le azioni di monitoraggio sono continuate negli anni successivi con finanziamenti assegnati dalla stessa Regione ai Progetti di ricerca SIC-Mais (2003) e Pro.Cla.Ma. (2004-2005); negli anni successivi le ricerche sono state inquadrare nel Progetto Interregionale MICOCER e focalizzate sulla contaminazione da fumonisine.

IL CAMPIONAMENTO

Al fine di ottenere risultati il più possibile aderenti alla realtà della produzione maidicola italiana si è scelto preliminarmente di utilizzare gli impianti di essiccazione-stoccaggio quale sorgente dei campioni da sottoporre ad analisi.

È stata individuata, quindi, una rete di 50-70 impianti scelti sulla base

- i) della distribuzione geografica, per ottenere una distribuzione omogenea dei bacini di raccolta entro gli areali di produzione di Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli, Emilia Romagna;
- ii) dimensione, per includere nell'indagine impianti con diversa capacità di essiccazione giornaliera e di stoccaggio finale;
- iii) caratteristiche tecniche degli equipaggiamenti di ricevimento, condizionamento, movimentazione, screening e conservazione.

Le quantità di prodotto complessivamente stoccato nella rete degli impianti è variato negli anni da 800 a 900.000 tonnellate pari a circa l'8-9% della produzione nazionale.

Il prodotto stoccato in ogni impianto è stato ripartito in lotti che generalmente coincidevano con le unità di contenimento (silos e platee) e, in aggiunta, con partite variamente differenziabili attraverso i flussi di consegna (raccolte di inizio-fine stagione, rilocalizzazione da altre strutture), con prodotti volontariamente segregati per caratteristiche "native" o con prodotti o destinazione predefinita.

Dai lotti così individuati sono stati ricavati i campioni per le analisi utilizzando il campionamento dinamico da prodotto in movimento: durante le operazioni di carico degli autotreni in uscita o in occasione delle movimentazioni interne (dall'essiccatoio ai silos, dai silos alle platee, ecc.) è stato ricavato un primo campione di 18-20 kg ricondotto poi a 1-2 kg per il laboratorio di analisi.

Da ciascun centro di raccolta sono stati prelevati mediamente 8-12 campioni contrassegnati con un codice identificativo anche dell'anno e della zona agraria di origine.

L'ANALISI DELLE TOSSINE

La serie completa di campioni (700-800) relativi a ciascuna annata di valutazione sono stati analizzati presso il laboratorio del CRA MAC di Bergamo con metodo ELISA opportunamente messo a punto con ring-test tra vari laboratori collaboratori del progetto Micocer. Una quota (10%) dei campioni di ogni serie è stato sottoposto ad analisi di controllo con metodi HPLC effettuato presso il laboratorio dell'Università di Piacenza.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La diffusione delle fumonisine nelle produzioni italiane

A differenza di aflatossine B1, deossinivalenolo – zearalenone e ocratossine che nelle condizioni italiane presentano una quota rilevante sia pure variabile nei vari anni, di campioni negativi o con concentrazioni molto basse (Verderio et al., 2005) le fumonisine, prodotte da *F. verticillioides* appaiono come la classe di tossine costantemente ed endemicamente diffusa nella nostra zona di coltivazione.

Pochissime partite commerciali tra le oltre 1400 testate nel 2006 e 2007 (fig. 1) sono risultate negative all'analisi delle fumonisine: nei due anni dell'indagine meno del 15% delle partite presentava concentrazioni al di sotto dei 2000 µg/kg limite generalmente richiesto dagli utilizzatori più esigenti di mais

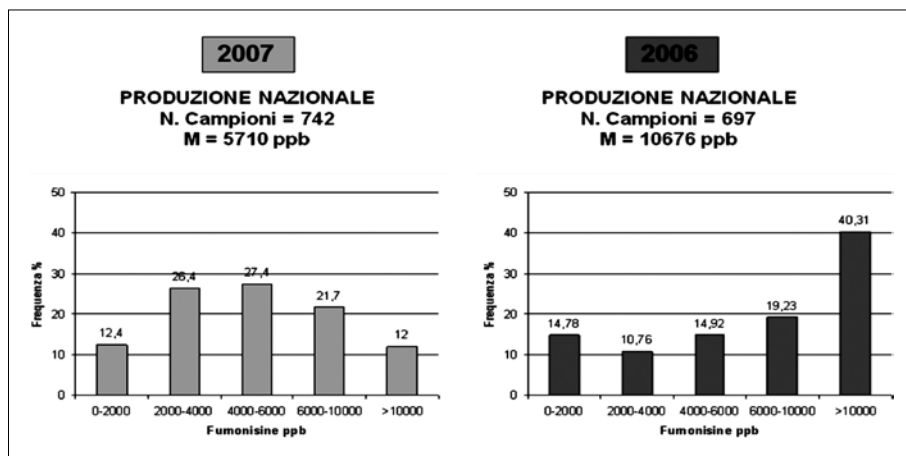


Fig. 1 Distribuzione di frequenza dei campioni prelevati negli areali di produzione di Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli, Emilia Romagna

alimentare d'Oltralpe e solo il 35% dei campioni conteneva concentrazione al di sotto delle 4000 parti per bilione, attuale limite cogente del mais granella destinato all'industria alimentare.

Sempre considerando i dati medi dei due anni appare che il 75% delle produzioni è comunque "liberamente" (al di sotto dei 10.000 ppb) gestibile per l'alimentazione zootecnica (la quale costituisce l'84% dell'utilizzo del mais).

La quota di prodotto oltre i 10.000 ppb presenta forti variazioni nei due anni di monitoraggio: nel 2006, stagione eccezionalmente favorevole al proliferare dei funghi del "marciume rosa" della spiga costituisce il 40% della produzione totale; il 2007 le partite fortemente offerte costituiscono il 12% del totale, valore più vicino a quanto riscontrato in precedenti monitoraggi condotti dal 1999 al 2005 utilizzando la stessa rete di campionamento (Verderio et al., 2005).

L'andamento della temperatura la quale presiede alla velocità di sviluppo della coltura e al posizionamento nella stagione delle fasi fenologiche e che, nel nostro ambiente di coltivazione irriguo (con sistemi gravitazionali o per aspersione, turnati o di soccorso), determina il quarto di stress evapotraspirativo sopportato dalla pianta, oppure il maggior determinante delle variazioni della concentrazione della tossina nelle diverse annate agrarie e nelle diverse regioni-areali di coltivazione.

In figura 2 viene rappresentato l'andamento delle temperature espresse i GDD (gradi di calore utili per giorno) registrati nel 2006 e nel 2007 a confronto con la media cinquantennale.

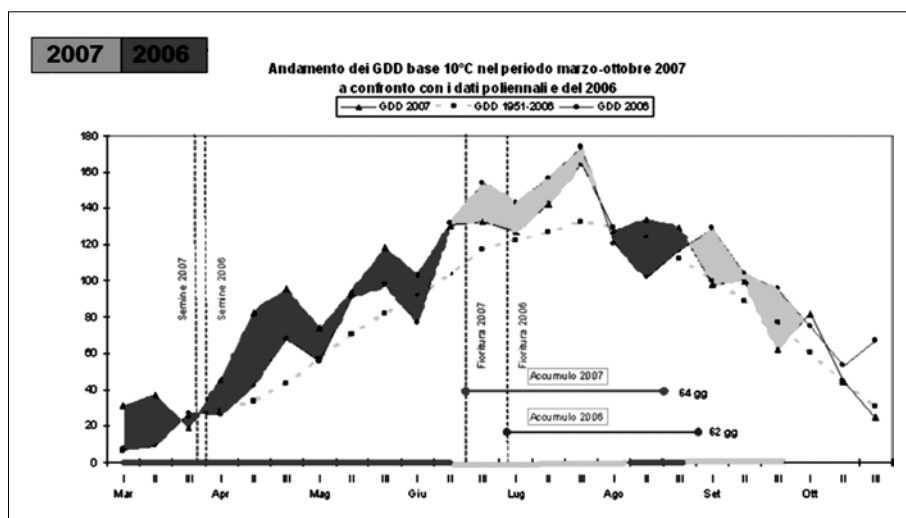


Fig. 2 Andamento GDD nel 2006 e nel 2007 a confronto con la media cinquantennale

Nel 2007 si sono avute temperature più alte e sufficiente piovosità nella fase vegetativa che hanno permesso la fecondazione in epoca molto anticipata (18-20 giugno vs 5-7 luglio) seguite da temperature più basse durante il periodo riproduttivo (critico per lo sviluppo del fungo e la sintesi di fumonisine) sia nella fase di formazione delle cariossidi e accumulo lineare (luglio-prima decade di agosto) e sia nella fase di maturazione agronomica (settembre).

Le temperature moderate e la fioritura anticipata del 2007 associate a un minore grado di stress evapotraspirativo e a una minore incidenza dell'attacco della piralide (minore sopravvivenza delle larve per ovideposizione su piante con spiga già sviluppata) sono state meno favorevoli alla colonizzazione di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* classificati, come riportato precedentemente, come funghi "da caldo" e come funghi "opportunisti" più aggressivi verso piante stressate o senescenti.

La distribuzione delle fumonisine nelle diverse Regioni e aree maidicole

Gli impianti di essiccazione-stoccaggio sources delle partite commerciali campionate erano distribuiti in tutte le regioni maidicole della Valle del Po; una riconsiderazione dei risultati del monitoraggio fatta su base regionale può essere utile in termini di gestione delle riserve di mais (indirizzamento delle partite a utilizzatori finali con diverse esigenze in termini di presenza delle varie classi di micotossine) e in termini di previsione-prevenzione attraverso lo studio delle associazioni tra i livelli di contaminazione e differenze climatico-ambientali o agronomico-gestionali riscontrabili in modo stabile o strutturale nelle diverse aree maidicole del nostro paese.

Nelle figure sottostanti vengono riportate la media e la distribuzione di frequenza per la concentrazione di fumonisine nelle partite commerciali prodotte in Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli ed Emilia Romagna nella campagna 2007 considerata come meglio rispecchiante le condizioni medie (attese) per la nostra area di coltivazione.

L'area Piemonte (fig. 3), monitorata con il prelievo di 116 campioni, registra valori più bassi di contaminazione con un valore medio di 4600 ppb, un valore modale di distribuzione di frequenza in corrispondenza dell'intervallo 2000-4000 ppm e una bassa frequenza di campioni con valori superiori a 10.000 µg/kg.

L'area Lombardia (fig. 4) presenta valori medi non dissimili (4800 ppb) con un minor numero di campioni "puliti" (con concentrazione 0-2000 ppb) e una maggiore frequenza di campioni con concentrazioni intermedie tra 4000 e 10.000 ppb.

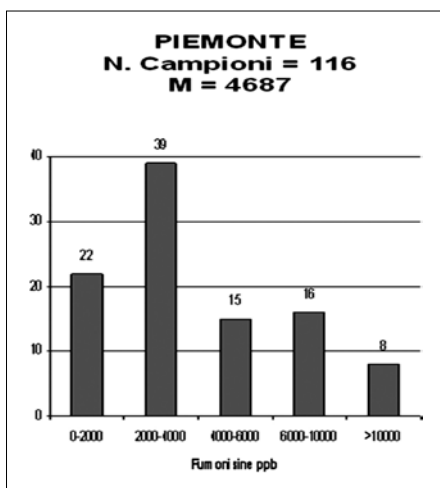


Fig. 3 Frequenza distribuzione fumonisine in Piemonte, anno 2007

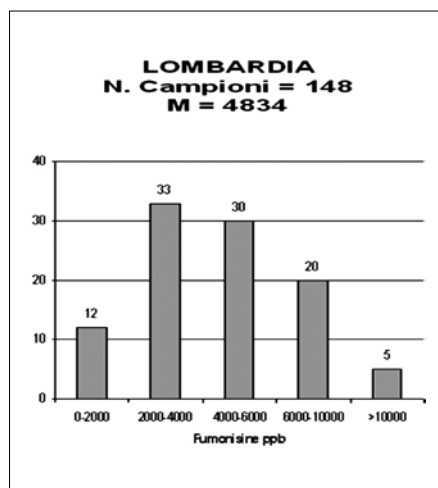


Fig. 4 Frequenza distribuzione fumonisine in Lombardia, anno 2007

La situazione appare decisamente critica in Veneto (fig. 5) sia in termini di media (oltre 10.000 ppb) sia in termini di frequenza delle diverse “classi” di contaminazione: solo il 13% delle partite aveva i requisiti per essere impiegata nell’industria alimentare (valori < 4000 ppb), il 50% delle partite presentava valori tra 4000 e 10.000 ppb e ben il 35% valori critici oltre i 10.000 ppb tali da richiedere processi di “segregazione” per un uso “mirato” in campo mangimistico.

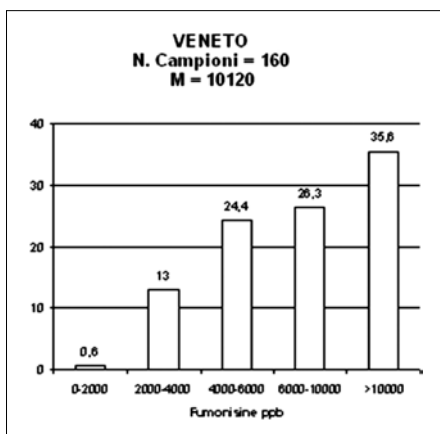


Fig. 5 Frequenza distribuzione fumonisine in Veneto, anno 2007

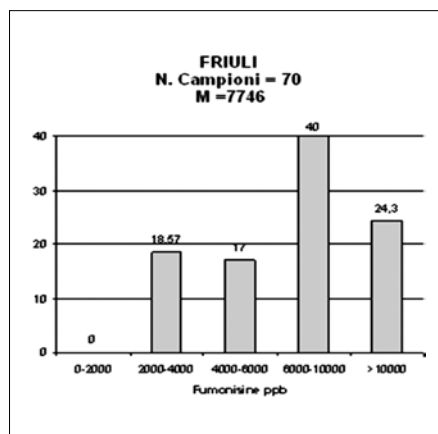


Fig. 6 Frequenza distribuzione fumonisine in Friuli, anno 2007

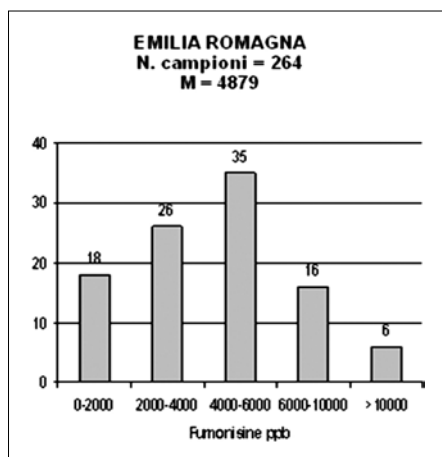


Fig. 7 *Frequenza distribuzione fumonisine in Emilia Romagna, anno 2007*

La distribuzione di frequenza delle concentrazioni di fumonisine Friulane (fig. 6) appare più simile a quella Veneta (fig. 5) che a quella Lombardo-Piemontese (figg. 4-5): il valore della media è intorno ai 7500 ppb, la frequenza modale è spostata sui livelli di contaminazione tra 6000 e 10.000 ppb trovata nel 40% dei campioni esaminati.

In Emilia Romagna (fig. 7) i risultati dell'analisi di 264 campioni indicano una frequenza bassa per le concentrazioni medio-alte (oltre i 6000 ppb) una quota pari al 44% del totale di partite inferiori a 4000 ppb (limite

per l'uso food) e un valore modale (35% delle osservazioni) per i campioni con concentrazioni tra 4000 e 6000 ppb.

Le curve di distribuzione regionali mantengono una loro identificabilità e caratterizzazione negli andamenti stagionali delle diverse annate di crescita.

In figura 8 viene proposto un confronto tra l'annata 2007 e la più favorevole annata 2006; le stesse differenziazioni tra Nord-Ovest, Nord-Est e Sud-Po sono state osservate nei precedenti anni di monitoraggio con l'eccezione dello

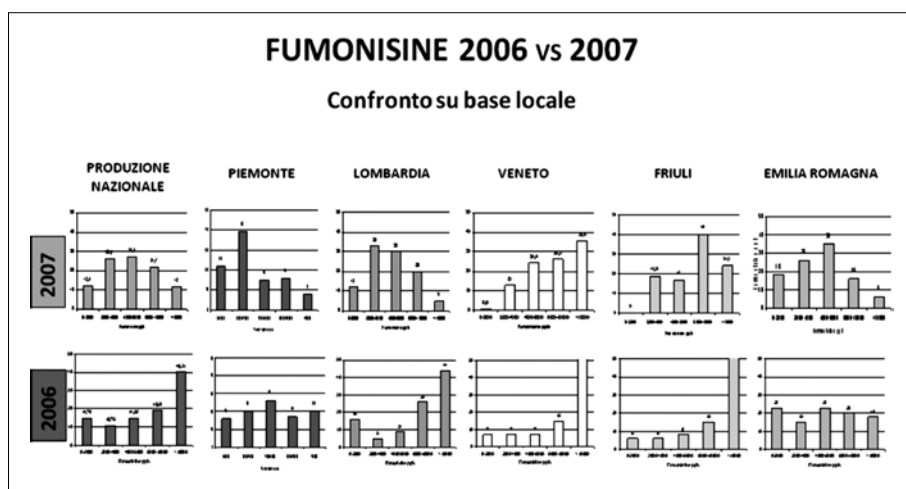


Fig. 8 *Confronto tra 2006 e 2007 delle concentrazioni fumonisine nelle partite commerciali prodotte in Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli ed Emilia Romagna*

“stoico” 2003 durante i quali il lungo persistere dell’anticiclone africano annullò qualsiasi differenza climatica (temperatura, umidità relativa, piovosità) tra le diverse regioni e aree produttive italiane.

Il livello delle temperature e la quantità (durata-intensità, distribuzione) di stress evapotraspirativo che è legato alle temperature ma anche alla disponibilità di acqua irrigua e ai sistemi colturali, appaiono essere i maggiori determinanti per spiegare le differenze strutturali tra le nostre aree di coltivazione.

Appare esistere un rischio crescente di contaminazione da fumonisine procedendo da Ovest verso Est e da sistemi di irrigazione gravitazionale turnata in terreni leggeri o di medio impasto (a ovest dell’alluvione del Mincio) a sistemi di irrigazione per aspersione “alla domanda” dei terreni argillosi (a Est dell’alluvione del Mincio). E inoltre, disaggregando ulteriormente i dati regionali, è identificabile anche un secondo gradiente seguendo il quale la probabilità di aumento delle contaminazioni aumenta in ragione della distanza del luogo di coltivazione dallo spartiacque alpino. Questi criteri di classificazione delle aree maidicole per il rischio fumonisine sono ragionevolmente adottabili per tutta la pianura in sinistro Po (80% della superficie a mais italiana) ma meno esplicativi della contaminazioni delle partite prodotte in Emilia Romagna.

In questa Regione una quota molto importante della produzione è condotta lungo la fascia adriatica in condizioni generalmente non irrigue o di apporto limitato attraverso la regolazione dell’altezza di falda. A queste condizioni appaiono più adattati i funghi del genere *Aspergillus* produttrici di aflatossine.

CONCLUSIONI

F. verticillioides e *F. proliferatum* sono endemicamente presenti nella Pianura Padana e hanno sviluppato un andamento specifico alle condizioni ambientali, climatiche e agronomiche esistenti. Le fumonisine costituiscono una sfida per la maiscoltura italiana alla quale il mondo agricolo può rispondere solo facendo sistema dei suoi ambiti amministrativi, scientifici e produttivi. Nel breve periodo la definizione di limiti diversificati in relazione ai differenti usi (food, mangimi per suini, polli, bovini, industria, energia) e l’attuazione di procedure “identity preserved” per canalizzare le produzioni verso i diversi utilizzatori sembrano costituire la strada più praticabile.

L’azione di monitoraggio, condotta attraverso una rete di campionamento stabile negli anni, costituisce uno strumento essenziale per la gestione delle scorte nazionali. L’organizzazione dei risultati in un database complessivo permette di evidenziare le “associazioni” tra le variazioni in contenuto di micotos-

sine, le variazioni dell'andamento stagionale, le differenze "strutturali" tra le diverse aree di coltivazione, l'uso delle diverse tecniche di gestione delle coltivazioni.

Le informazioni così raccolte permettono di tracciare le fondamentali mappe di rischio e di elaborare criteri di previsione che procedono con l'andamento stagionale e lo sviluppo delle coltivazioni.

Tutto questo costituisce l'indispensabile background conoscitivo per la messa a punto di sistemi di controllo-prevenzione in campo già applicati con successo per le produzioni "identity preserved" destinate all'industria alimentare.

RIASSUNTO

Il mais è la specie più studiata per gli aspetti di interazione con i funghi micotossigeni e la più monitorata per la concentrazione delle varie classi di tossine presenti nelle diverse aree di coltivazione del cereale, estese dal sub-tropico alle zone temperate fredde delle alte latitudini.

Gli scopi diretti della ricerca, iniziata nel 1999, erano quelli di conoscere i reali livelli di contaminazione delle scorte di mais nazionali immesse sul mercato e nel medio periodo e di ottenere alcune "associazioni" della concentrazione di micotossine riscontrati con l'andamento stagionale, con il posizionamento nella stagione delle fasi fenologiche della coltura, con la macroarea di coltivazione, con i processi di post-raccolta e stoccaggio.

Al fine di ottenere risultati il più possibile aderenti alla realtà della produzione maidicola italiana si è scelto preliminarmente di utilizzare una rete omogenea di 50-70 impianti di essiccazione-stoccaggio entro gli areali di produzione di Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli, Emilia Romagna, quale sorgente dei campioni da sottoporre ad analisi.

A differenza di aflatossine B1, deossinivalenolo – zearalenone e ocratossine che nelle condizioni italiane presentano una quota rilevante sia pure variabile nei vari anni, di campioni negativi o con concentrazioni molto basse (Verderio et al., 2005) le fumonisine, prodotte da *F. verticillioides* appaiono come la classe di tossine costantemente ed endemicamente diffusa nella nostra zona di coltivazione.

Pochissime partite commerciali tra le oltre 1400 testate nel 2006 e 2007 sono risultate negative all'analisi delle fumonisine: nei due anni dell'indagine meno del 15% delle partite presentava concentrazioni al di sotto dei 2000 µg/kg limite generalmente richiesto dagli utilizzatori più esigenti di mais alimentare d'Oltralpe e solo il 35% dei campioni conteneva concentrazione al di sotto delle 4000 parti per bilione, attuale limite cogente del mais granella destinato all'industria alimentare.

L'azione di monitoraggio, condotta attraverso una rete di campionamento stabile negli anni, costituisce uno strumento essenziale per la gestione delle scorte nazionali. L'organizzazione dei risultati in un database complessivo permette di evidenziare le "associazioni" tra le variazioni in contenuto di micotossine, le variazioni dell'andamento stagionale, le differenze "strutturali" tra le diverse aree di coltivazione, l'uso delle diverse tecniche di gestione delle coltivazioni.

ABSTRACT

Maize is one of the most widely investigated crop for its interaction with mycotoxigen fungi. This crop is also largely monitored for evaluating the concentration of various classes of mycotoxins distributed in different areas of cultivation, ranging from sub-tropical to high latitude cultivation regions.

The objectives of this research was to i) survey the levels of kernel contaminations by mycotoxins in the Italian grain production commercialised in the market, ii) detect possible correlations between concentration level of mycotoxins with environmental factors, phenological stages of plant growth and development, post-harvesting processes and storage conditions.

To reach this scope we had evaluated samples of kernel production from a homologous network of 50 to 70 drying and storage plants distributed in the most relevant areas of cultivation of maize located in: Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli, Emilia-Romagna, as a source of samples to subject to analyses.

The results showed that the network sampling represent an essential tool for the management of the Italian yield related to mycotoxins. The organization of the information collected in a database allowed to figure out association among the content of mycotoxin levels, seasonal variation in environmental factors, differences among the various cultivation areas, the utilization of different management techniques in cultivation.

The difference in aflatoxin B1 deoxynivalenol – zearealone and ochratoxins – in the Italian growing conditions showed a relevant levels, although varying in the different areas, of negative samples or with low level of contamination (Verderio et al., 2005); the fumonisin produced by *F. verticillioides* were the family of toxins constantly and endemically more diffuse in the Italian cultivation.

Only a few commercial samples, out of those assayed in 2006 and 2007, were negative after analyses of fumonisins in the two years of the investigation: less than 15% of the samples showed a concentration below 2000 µg/kg, a value currently required by the final users of maize for food products, only 35% of the samples had a concentration below 4000 µg/kg, a crucial legal level for the use of maize for food products.

BIBLIOGRAFIA

- BOTTALICO A. (1998): *Fusarium diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe*, «Journal of Plant pathology», 80 (2), pp. 85-103.
- CAST (COUNC. AGRIC. SCI. TECHNOL.) (2003): *Mycotoxins: Risks in Plant and Animal Systems*, «Task Force Rep.», No 38, Ames, IA: CAST.
- COMPENDIUM OF CORN DISEASES (2000): Disease Compendium Series, University of Illinois at Urbana-Champaign Dept. of Crop Sciences, Donald G. White.
- KLICH M., TIFFANY L.H., KNAPHUS G. (1992): *Ecology of the aspergilli of soils and litter*, in Bennett J.W., Klich M.A. eds., *Aspergillus: biology and industrial applications*, Boston, Butterworth Heineman, pp. 329-354.
- LESLIE J.F. (1995): *Gibberella fujikuroi: Available populations and variable traits*, «Can J. Bot.», 73, S282-S291.

- MILLER J.D. (1995): *Fungi and mycotoxins in grain: implication for stored product research*, «Journal of Stored Products Research», 31, pp. 1-16.
- MUNKVOLD GARY P. (2003): *Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize*, «Annu. Rev. Phytopathol.», 41, pp. 99-116.
- NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., MARASAS W.F.O. (1983): *Fusarium species: An illustrated manual for identification*, Pennsylvania State University Press, University Park e Londra, PA, 193 pp.
- SMITH D.R. AND D.G. WHITE (1988): *Diseases of corn*, in G.F. Sprague and J.W. Dudley (ed.), *Corn and corn improvement*, ASA, Madison WI, pp. 687-766.
- TANZI F. (2005): *Funghi e micotossine su mais – Indagine Europea di Syngenta Seeds*, Atti della “Giornata del mais 2005”, Bergamo, Italia.
- VERDERIO A. ET AL. (2005): *La diffusione delle micotossine nelle produzioni italiane di mais*, «L'Informatore Agrario», 61 (10), pp. 47-51.

ERSILIO DESIDERIO*, GABRIELLA AURELI*, DARIO CONTI**,
GIULIANO MAZZIERI***, MICHELANGELO PASCALE****,
ANDREINA BELOCCHI*, MAURO FORNARA*

Percorsi produttivi per la prevenzione della contaminazione da deossinivalenolo (DON) nel frumento duro

INTRODUZIONE

La fusariosi della spiga (*Fusarium* Head Blight - FHB), una fitopatia diffusa nel mondo su vari tipi di cereali, fra i quali il frumento duro (Klix et al., 2008; Parry et al., 1995), comporta ricadute negative sulla produzione, sulle caratteristiche igienico-sanitarie e sulla qualità della materia prima e dei prodotti derivati. Gli effetti della malattia, della quale sono responsabili numerose specie di funghi, in primo luogo quelli appartenenti al genere *Fusarium*, sono riconducibili non solo alle conseguenze dirette dell'attacco fungino sulla pianta di frumento ma anche alla possibilità, da parte delle specie tossigene, di produrre metaboliti tossici (micotossine). Il deossinivalenolo (DON) è la micotossina predominante nei cereali con granella piccola coltivati in Europa (Terzi et al., 2007). In Italia i fenomeni di fusariosi nelle coltivazioni di frumento duro si rilevano con maggiore frequenza negli ambienti del Centro-Nord, tradizionalmente meno vocati per questo tipo di coltura.

La contaminazione da micotossine avviene principalmente in campo, durante le fasi di coltivazione, ma può proseguire nelle fasi successive al raccolto (conservazione in magazzino, stoccaggio, trasformazione, ecc.) non solo a causa della generale stabilità che caratterizza tali composti ma anche per la possibilità che i funghi produttori possano permanere nella materia prima.

La normativa vigente (Reg. CE n. 1881/2006) vieta sia la detossificazione

* C.R.A.-QCE, Roma

** ARSIA Toscana, Marciano della Chiana (AR)

*** ASSAM Marche, Jesi (AN)

**** CNR-ISPA, Bari

dei prodotti alimentari contenenti micotossine mediante trattamenti chimici sia la miscelazione degli stessi con prodotti alimentari conformi ai tenori massimi consentiti. La problematica “fusariosi della spiga,” e conseguentemente “micotossine”, va inserita quindi in un programma di prevenzione da attuare lungo tutte le fasi della filiera cerealicola a cominciare dall'adozione di una corretta tecnica colturale. L'avvicendamento, la precessione e le lavorazioni del terreno sono interventi che possono rivelarsi fondamentali per una efficace limitazione del rischio di contaminazione da micotossine attraverso la riduzione della quantità d'inoculo fungino naturalmente presente nel terreno; un adeguato livello di concimazione e la giusta densità di semina contribuiscono inoltre a migliorare le condizioni di crescita delle piante.

L'avvicendamento costituisce una scelta agronomica da preferire all'omosuccessione, influenzando sia sulla composizione e sulla quantità dei residui lasciati sul terreno sia sul tipo e sull'intensità delle lavorazioni. Il tipo di precessione colturale contribuisce notevolmente al rischio di contaminazione da DON; il mais e il sorgo sono substrati sui quali meglio si sviluppano e si mantengono le specie tossiche di *Fusarium* rispetto ad altri tipi di residui (Campagna et al., 2005).

L'influenza delle lavorazioni del terreno sul rischio di fusariosi del frumento è legata strettamente alla possibilità di eliminare, o almeno ridurre, la presenza dei residui infetti della coltura precedente attraverso l'interramento degli stessi tramite l'aratura. Secondo alcuni Autori la semina su sodo o la minima lavorazione costituirebbero un fattore di moltiplicazione pari a 5 volte i livelli di contaminazione da DON rispetto all'aratura (Campagna et al., 2005).

Tuttavia non c'è accordo nella definizione del grado di influenza delle tecniche colturali sul rischio di fusariosi e/o accumulo di metaboliti tossici; infatti, se da un lato alcuni Autori riconoscono sia il miglioramento genetico sia l'impiego di tecniche agronomiche come elementi fondamentali per il contenimento della contaminazione da micotossine nei cereali (Munkvold, 2003; Avantaggiato, 2003; Moretti et al., 2002) altri, pur sostenendo l'importanza della scelta varietale in rapporto all'incidenza di *F. graminearum* nel frumento, sottolineano anche il modesto impatto che le pratiche agronomiche avrebbero, in condizioni epidemiche, sull'evoluzione della malattia (Miller, 2008; Koch, 2006).

Nell'ambito del Progetto “MICOCER” è stata realizzata una ricerca per valutare l'influenza di differenti percorsi colturali sul controllo della contaminazione da DON della granella di frumento duro. Di seguito vengono presentati i risultati ottenuti in alcune località dell'Italia centrale nel triennio 2006-2008.

TRATTAMENTI A CONFRONTO

La ricerca è stata condotta nelle stagioni colturali 2005-06, 2006-07 e 2007-08 in tre località: Roma, presso l'Azienda Inviolatella del CRA-QCE; Marciano della Chiana (AR), presso l'Azienda regionale di Cesa dell'ARSIA; Jesi (AN), presso l'Azienda agricola dell'ASSAM.

Le tesi sperimentali comuni hanno riguardato:

- 2 varietà di differente precocità (Duilio e Cresco a Roma; Duilio e Orobel a Marciano della Chiana; Simeto e San Carlo a Jesi);
- 2 trattamenti fungicidi e 1 controllo non trattato:
 T1 = testimone non trattato;
 T2 = trattamento con miscela fusaricida ad ampio spettro: Procloraz (Spor-tak® EW)+ Epossiconazolo (Opus®);
 T3 = trattamento con fungicida triazolico: Metconazolo (Caramba Star®).

Nelle singole prove, altre tesi sono state aggiunte a quelle comuni; nella tabella 1 è presentato il quadro complessivo delle tesi sperimentali considerate nelle tre località nei tre anni, insieme ad alcune informazioni sulle modalità di conduzione delle prove.

La sperimentazione è stata effettuata in assenza di inoculazione artificiale e i prodotti fusaricidi, forniti dalla BASF, sono stati distribuiti a inizio fioritura di ciascun genotipo.

Le prove sono state realizzate sempre in successione a cereale. Nel biennio 2006-2007 a Roma e a Marciano della Chiana la precessione colturale (mais e frumento duro) ha rappresentato una tesi sperimentale. A Jesi è stata inserita come tesi agronomica la modalità di lavorazione del terreno (minima lavorazione vs aratura) nei tre anni di prova, mentre a Marciano della Chiana la stessa tesi è stata limitata al biennio 2007-2008. A Roma dalla stagione 2006-07 è stata introdotta anche la concimazione azotata (dose e modalità di frazionamento) e, nel 2007-08, anche una doppia modalità di lavorazione (rippatura e rippatura + aratura).

Nel 2005-06, all'avvio delle attività del Progetto, le frequenti e abbondanti precipitazioni autunno-invernali in prossimità dell'epoca normale di semina del frumento hanno determinato un marcato differimento della data di impianto delle prove, avvenuto tra la terza decade di dicembre (Marciano della Chiana) e la prima decade di febbraio (Roma). Le fasi vegetative e riproduttive della coltura sono state influenzate dal ritardo di semina, con ripercussioni nella data di spigatura e di raccolta.

Per tutte le prove è stato adottato uno schema sperimentale "split-plot" con 3 o 4 ripetizioni. La superficie delle parcelle elementari è variata da un minimo

	ROMA			MARCIANO DELLA CHIANA (AR)			JESI (AN)		
	2005-06	2006-07	2007-08	2005-06	2006-07	2007-08	2005-06	2006-07	2007-08
Tessitura terreno	medio-impasto			franco argilloso			franco argilloso		
PreceSSIONE culturale	frumento duro mais			frumento duro mais			mais		
Lavorazione terreno	aratura		frumento duro	aratura	aratura minima lavorazione	aratura minima lavorazione	frumento duro	frumento duro	frumento duro
Data di semina	01/02/06	07/11/06	20/11/07	28/12/05	21/11/06	08/11/07	17/01/06	28/11/06	14/12/07
Varietà impiegate	Duilio Cresco			Duilio Orobol			Simeto San Carlo		
Concimazione azotata (kg/ha)	140	0+110 0+150 40+110		145	145	113	132	123	123
Trattamento fungicida	testimone non trattato procloraz + epossiconazolo metconazolo			testimone non trattato procloraz + epossiconazolo metconazolo			testimone non trattato procloraz + epossiconazolo metconazolo		
Data trattamento	10/5/06 18/5/06	13/04/07 27/04/07	24/04/08 05/05/08	08/05/06 15/05/06	28/04/07 06/05/07	30/04/08 07/05/08	18/05/06 22/05/06	02/05/07 10/05/07	05/05/08 12/05/08
Data raccolta	10/7/06	22/06/07	30/07/08	06/07/06	28/06/07	09/07/08	17/07/06	22/06/07	01/07/08

Tab. 1 Progetto "Micocer". Percorsi produttivi frumento duro 2006-2008. Trattamenti a confronto e scheda agronomica delle prove. Le tesi a confronto per singola località e anno sono evidenziate in grigio

di 10-12 m² a un massimo di 50 m². L'incidenza della fusariosi della spiga è stata valutata allo stadio di maturazione lattea o cerosa utilizzando la scala proposta da Parry et al. (1995) e, dopo la raccolta, sono stati acquisiti i dati relativi alla produzione di granella e ai principali caratteri merceologici e qualitativi.

CAMPIONAMENTO E ANALISI PER IL DON

Presso i laboratori del CRA-QCE di Roma è stata effettuata l'analisi immunoenzimatica per il DON sui campioni di granella prelevati da ciascuna parcella utilizzando il test ELISA (kit Ridascree[®] DON, R-Biopharm), con un limite di sensibilità di 18,5 ppb e un recupero di tossina nei cereali compreso fra l'85 e il 110%. Su circa il 10-15% di campioni è stata ripetuta l'analisi con metodo cromatografico (HPLC) presso il Laboratorio dell'ISPA-CNR di Bari.

RISULTATI

Dai risultati ottenuti nel corso del triennio di prove risulta evidente che la risposta dei trattamenti a confronto ha assunto rilievo solo in presenza di rilevabili manifestazioni della malattia e/o di contaminazioni da micotossine del-

TESI A CONFRONTO	INCIDENZA FUSARIOSI %	PRODUZIONE GRANELLA t/ha	DON	
			ELISA ppb	HPLC (**) ppb
Mais	10,0 a	5,79 a	272 a	220
Frumento duro	0,5 b	5,45 a	18 b	< 20
Minima lavorazione	8,2 a	5,53 a	208 a	210
Aratura	2,3 b	5,71 a	82 b	78
Duilio	7,0 a	5,89 a	209 a	205
Orobel	3,5 b	5,35 b	81 b	75
T 1 (*)	5,7 a	5,50 a	141 a	143
T 2	4,7 a	5,67 a	160 a	127
T 3	5,3 a	5,69 a	134 a	123
Entro fattore, le medie con la stessa lettera non sono statisticamente differenti per $P \leq 0,05$, secondo il test di Duncan. (*) T1 = testimone non trattato; T2 = Procloraz + Epossiconazolo; T3 = Metconazolo. (**) Analisi di laboratorio effettuate sui campioni di una sola ripetizione.				

Tab. 2 *Marciano della Chiana (AR), 2006-07. Effetto delle tecniche agronomiche sull'incidenza della fusariosi della spiga e sul contenuto in DON nella granella di frumento duro*

la granella. Nelle tabelle 2, 3 e 4 sono riportati i dati relativi alle località e alle annate agrarie in cui sono state registrate significative manifestazioni di fusariosi.

A Marciano della Chiana (tab. 2) nell'annata 2005-06 non è stata riscontrata alcuna manifestazione di fusariosi della spiga ed è stata rilevata la presenza di un solo campione positivo con un livello di contaminazione da DON del tutto trascurabile (19 ppb), al limite della soglia di sensibilità del metodo.

Nel secondo anno di prove (2006-07) le manifestazioni visibili di fusariosi della spiga sono risultate di lieve entità, mediamente 5,2%. La presenza di DON è stata rilevata nel 76% dei campioni, con un valore medio di contaminazione pari a 145 ppb. La precessione mais è risultata più critica rispetto al frumento, con differenze significative in termini di incidenza della malattia, livello medio di contaminazione da DON (272 ppb contro 18 ppb) e valore massimo di DON (891 ppb contro 76 ppb).

La varietà più precoce Duilio ha mostrato, rispetto a quella più tardiva Orobel, un significativo aumento sia del valore di DON sia della suscettibilità alla fusariosi. Quest'ultima si è manifestata comunque in modo limitato e di conseguenza i trattamenti fungicidi non hanno influito significativamente né sull'incidenza della fitopatia né sul livello di contaminazione. Anche in queste condizioni l'aratura ha permesso di ridurre significativamente l'incidenza della malattia e il valore medio di DON rispetto alla minima lavorazione del terreno.

Nella stagione culturale 2007-08, la presenza di DON è risultata alquanto contenuta e rilevabile su pochissimi campioni, con valori medi leggermente superiori riscontrati per la cultivar più tardiva Orobel (39 ppb) rispetto alla più precoce Duilio (13 ppb).

A Roma (tab. 3) le manifestazioni di fusariosi della spiga sono state rilevate in tutti e tre gli anni di prova. Nel 2005-06, in un ambito di scarse manifestazioni della fitopatia, la presenza di DON è stata riscontrata nell'81% dei campioni analizzati con il test ELISA, con un livello medio di contaminazione pari a 105 ppb e un valore massimo di 414 ppb. In queste condizioni i trattamenti di difesa fungicida non hanno influito significativamente sull'incidenza della fusariosi, sulla produzione di granella e sul livello di contaminazione da DON. Al contrario, differenze statisticamente significative sono emerse per le altre tesi a confronto; in particolare, la precessione mais ha fatto registrare una maggiore incidenza della malattia, un livello superiore di contaminazione da DON e una resa di granella più bassa rispetto alla omosuccessione (ringrano). Da sottolineare che in questa località le modalità di lavorazione del terreno sono state sempre le stesse per le due precessioni a confronto (aratura a 20-25 cm seguita da erpicatura). Anche tra le due varietà in prova è emersa una dif-

TESI A CONFRONTO	2005-06			2006-07			2007-08 (DOPO FRUMENTO)		
	INCI-DENZA FUSARIOSI %	PROD. t/ha	DON	INCI-DENZA FUSARIOSI %	PROD. t/ha	DON	INCI-DENZA FUSARIOSI %	PROD. t/ha	DON
			ELISA ppb			ELISA ppb			ELISA ppb
Mais	8,5 a	2,85 b	158 a	15,2 a	4,52 a	392 a			
Frumento duro	2,2 b	3,04 a	52 b	4,5 b	3,17 b	108 b			
Duilio	7,3 a	2,76 b	161 a	11,7 a	3,91 a	287 a	18,5 a	2,10 a	461 a
Creso	3,4 b	3,14 a	48 b	8,0 b	3,79 a	213 b	6,5 b	1,95 a	249 b
T 1 (*)	5,9 a	2,73 a	101 a	12,5 a	3,78 a	340 a	17,5 a	1,32 b	442 a
T 2	4,4 a	2,98 a	87 a	7,0 c	3,83 a	163 c	11,7 b	2,31 a	358 b
T 3	5,3 a	3,15 a	126 a	10,3 b	3,94 a	247 b	8,3 b	2,45 a	268 c
N 1 = 0+100				8,5 b	4,02 a	206 b	11,1 b	2,17 a	348 b
N 2 = 0+150				10,0 a	3,96 a	237 b	11,3 b	1,95 a	313 b
N 3 = 40+110				11,3 a	3,57 b	308 a	15,1 a	1,96 a	408 a
Ripp. + aratura							7,2 b	2,53 a	295 b
Rippatura							17,8 a	1,48 b	415 a
Entro fattore, le medie con la stessa lettera non sono statisticamente differenti per $P \leq 0,05$, secondo il test di Duncan. (*) T1 = testimone non trattato; T2 = Procloraz + Epossiconazolo; T3 = Metconazolo.									

Tab. 3 Roma, 2005-06, 2006-07 e 2007-08. Effetto delle tecniche agronomiche sull'incidenza della fusariosi della spiga e sul contenuto in DON nella granella di frumento duro

ferenza significativa per tutti i caratteri considerati; la cultivar più precoce Duilio ha evidenziato valori più critici in termini di incidenza della malattia, livello medio di contaminazione da DON e resa in granella.

Nel secondo anno di prova (2006-07) sono state riscontrate lievi manifestazioni visibili di fusariosi della spiga con incidenza media pari al 9,8%. La contaminazione da DON è stata rilevata nel 100% dei campioni analizzati, con un valore medio pari a 250 ppb. Tra le tesi a confronto la precessione mais è risultata sempre più critica rispetto alla precessione a frumento, con differenze significative in termini di incidenza della malattia, livello medio di contaminazione (392 ppb contro 108 ppb) e valore massimo di DON (917 ppb contro 295 ppb). Anche in questa annata, la varietà più precoce ha mostrato una maggiore suscettibilità alla fitopatia e una più alta concentrazione di micotossina. Per quanto riguarda i trattamenti fungicidi è stato registrato un effetto positivo e significativo sia sull'incidenza della malattia che sulla contaminazione da DON, rispetto al testimone non trattato. Meno evidenti sono

state le risposte alle differenti dosi e modalità di somministrazione dell'azoto; le dosi crescenti di fertilizzante hanno evidenziato una influenza tendenzialmente negativa sull'incidenza della malattia mentre la tesi che prevedeva una quota dell'elemento distribuito alla semina ha fatto registrare un livello di DON più elevato.

Nell'annata 2007-08 la contaminazione da DON è stata riscontrata sul 100% dei campioni, con valore medio pari a 356 ppb. Come nel biennio precedente, la varietà più precoce ha fatto registrare un grado di incidenza di fusariosi più elevato rispetto a quella più tardiva (18,5% e 6,5%, rispettivamente); molto marcate sono risultate anche le differenze riscontrate nella concentrazione media e massima di micotossina (461 ppb e 1015 ppb per Duilio, 249 ppb e 554 per Cresco). Per quanto riguarda gli effetti della lavorazione del terreno, con la rippatura è stato riscontrato un valore medio di contaminazione da DON pari a 415 ppb e un'incidenza della fusariosi del 17,8% mentre con le lavorazioni più profonde sono stati registrati valori più bassi di DON, pari a 295 ppb, con un'incidenza della malattia del 7,2%. Analogamente al 2007, la tesi di concimazione che prevedeva la dose più elevata di azoto con somministrazione di una quota di fertilizzante alla semina è risultata più contaminata e con un'incidenza di fusariosi superiore rispetto alle altre due tesi. In un contesto di scarsa contaminazione gli effetti dei trattamenti fungicidi sono risultati comunque significativi ai fini della riduzione sia dell'incidenza della malattia che del contenuto di micotossina.

A Jesi (tab. 4), nel 2005-06, in successione a mais e in presenza di diffuse e marcate manifestazioni di fusariosi della spiga, la presenza di DON è stata riscontrata nel 100% dei campioni analizzati, con un livello medio di contaminazione pari a 973 ppb e valori massimi superiori a 4000 ppb. Un così elevato livello di contaminazione da DON, senz'altro inconsueto seppur di grande utilità sperimentale per la valutazione dei trattamenti a confronto, è anche conseguenza dell'eccessivo ritardo della raccolta causato dalle frequenti precipitazioni nell'ultima fase del ciclo. L'alto livello di contaminazione riscontrato con test ELISA in questa prova è stato confermato con analisi HPLC.

I trattamenti a confronto hanno mostrato differenze significative per tutti i caratteri considerati, a eccezione della resa in granella. L'aratura del terreno rispetto alla minima lavorazione ha fatto registrare una significativa riduzione dell'incidenza della fusariosi e più marcatamente del livello di contaminazione da DON, sceso da 1571 ppb a 375 ppb. Differenze significative in termini di incidenza della fitopatia e di livello di contaminazione hanno mostrato le varietà e i trattamenti fungicidi a confronto, con valori medi nettamente superiori a carico della varietà più precoce Simeto (1331 ppb), rispetto a San Car-

lo (615 ppb), e per il testimone non trattato (2025 ppb), rispetto ai due trattamenti con fungicidi (mediamente 447 ppb).

Con riferimento alle interazioni tra trattamenti (dati non riportati in tabella) è da sottolineare il marcato effetto positivo dell'aratura che, rispetto alla minima lavorazione, è stata in grado di abbattere, in assenza di trattamenti fungicidi, il livello di DON da 4789 ppb a 701 ppb nel caso della varietà risultata più suscettibile (Simeto). Sulla stessa cultivar, con la minima lavorazione del terreno l'effetto dei trattamenti fungicidi è risultato rilevante (4789 ppb per il testimone non trattato contro una media di 1035 ppb per T2 e T3); meno evidente, se pur significativo, l'effetto medio dei fungicidi nel caso di interrimento dei residui di mais con l'aratura (da 701 ppb a 211 ppb).

A conferma della prevalente influenza dell'andamento climatico sulle manifestazioni della fusariosi in frumento, nell'annata 2006-07 nessuna manifestazione della fitopatia è stata rilevata in campo; l'assenza o la limitata incidenza della malattia è stata confermata dai risultati delle analisi con test ELISA sui campioni di tutte le parcelle: solo il 29% dei campioni ha evidenziato la presenza di DON, con valori quasi sempre di poco superiori al limite di rilevanza del metodo. In queste condizioni non sono emerse differenze significative tra i diversi trattamenti a confronto, anche se nelle parcelle con aratura sono stati rilevati valori di contaminazione tendenzialmente più bassi rispetto alle parcelle con minima lavorazione, sia in termini di incidenza della fitopatia (14% contro 44%) che di valore medio di contaminazione (8 ppb contro 28 ppb).

TESI A CONFRONTO	2005-06 (DOPO MAIS)				2007-08 (DOPO FRUMENTO)		
	INCIDENZA FUSARIOSI %	PROD. t/ha	DON		INCIDENZA FUSARIOSI %	PROD. t/ha	DON
			ELISA ppb	HPLC (**) ppb			ELISA ppb
Minima lav.	69,5 a	4,46 a	1571 a	1435	10,5 a	5,39 b	223 a
Aratura	48,0 b	4,78 a	375 b	375	3,8 b	6,29 a	142 b
Simeto	75,5 a	4,39 a	1331 a	1209	9,2 a	5,87 a	223 a
San Carlo	42,0 b	4,85 a	615 b	602	5,1 b	5,82 a	142 b
T 1 (*)	85,2 a	4,49 a	2025 a	1880	13,1 a	5,39 b	295 a
T 2	45,3 b	4,69 a	527 b	473	5,0 b	6,23 a	173 b
T 3	45,8 b	4,69 a	367c	363	3,5 b	5,91 a	81c
Entro fattore, le medie con la stessa lettera non sono statisticamente differenti per $P \leq 0,05$, secondo il test di Duncan.							
(*) T1 = testimone non trattato; T2 = Procloraz + Epossiconazolo; T3 = Metconazolo.							
(**) Analisi di laboratorio effettuate sui campioni di una sola ripetizione.							

Tab. 4 Jesi (AN), 2005-06 e 2007-08. Effetto delle tecniche agronomiche sull'incidenza della fusariosi della spiga e sul contenuto in DON nella granella di frumento duro

Nel 2007-08 la contaminazione da DON è stata riscontrata sul 100% dei campioni con un valore medio di 183 ppb. La varietà più precoce Simeto ha mostrato livelli di DON e di incidenza di fusariosi più elevati rispetto alla cultivar più tardiva San Carlo; per Simeto il valore medio di micotossina è stato di 223 ppb (valore massimo di 695 ppb) contro un valore medio di 142 ppb rilevato per San Carlo (valore massimo di 295 ppb).

Per quanto riguarda le lavorazioni, quelle più limitate e con minore interrimento dei residui sono risultate significativamente più contaminate rispetto a quelle che prevedevano l'aratura. La minima lavorazione ha mostrato un livello medio di contaminazione da DON pari a 223 ppb e un'incidenza di fusariosi del 10,5% contro valori di 142 ppb e 3,8%, registrati per le lavorazioni più profonde.

In un'annata caratterizzata da condizioni meteorologiche non particolarmente negative e da una moderata manifestazione di fusariosi della spiga (7,2% in media), i trattamenti fungicidi sono risultati determinanti per l'abbattimento della contaminazione da DON, con differenze significative e positive rispetto al testimone non trattato. In assenza di trattamento l'incidenza della fusariosi, ha mostrato valori superiori di 3-4 volte rispetto a quanto rilevato utilizzando il prodotto fungicida dotato di maggiore azione contenitrice.

Anche in questa località, come a Roma, l'aratura ha permesso di contenere in maniera significativa l'incidenza della malattia e, di conseguenza, il valore di DON rispetto ai campioni provenienti dalle parcelle con lavorazioni più superficiali. I maggiori effetti benefici per il controllo della fitopatologia sono stati riscontrati nell'interazione tra la lavorazione più profonda e il trattamento fungicida.

CONCLUSIONI

I risultati di questa ricerca sul frumento duro, realizzata senza infezione artificiale di fusariosi, hanno permesso di evidenziare l'importanza di alcuni elementi della tecnica colturale nel ridurre i rischi di contaminazione della granella e nel contenere i valori di DON entro i limiti fissati dalla normativa europea, anche in condizioni particolarmente critiche. Tra gli interventi agronomici mirati al contenimento della fusariosi della spiga e, di conseguenza, del DON nel frumento duro in successione ad altro cereale, le tecniche impiegate per l'asportazione e/o l'interramento con aratura dei residui colturali, in particolare del mais, hanno evidenziato una grande efficacia, anche in presenza di marcate manifestazioni della malattia. L'impiego di varietà poco suscettibili o di ciclo non precoce (peraltro più adatte agli ambienti del Centro-

Nord dove maggiori sono i rischi di contaminazione da DON), la tempestività della raccolta, insieme alla pulizia e alla funzionalità delle macchine operatrici, i trattamenti fusaricidi a inizio fioritura, sono tutti elementi della tecnica colturale che possono contribuire a una efficace azione di prevenzione. In considerazione della non elevata presenza di micotossine nelle produzioni nazionali di frumento duro (Desiderio et al., 2008), il ricorso a trattamenti fusaricidi è ipotizzabile solo in alcuni areali e in presenza di condizioni climatiche favorevoli all'insorgenza della fusariosi o per sopperire alla mancata adozione di una corretta tecnica colturale.

RIASSUNTO

Nell'ambito del Progetto "MICOCER", è stata condotta una ricerca per valutare l'influenza di differenti percorsi culturali sul controllo della contaminazione da Deossinivalenolo (DON) della granella di frumento duro nel triennio 2006-2008 in tre località dell'Italia centrale, Roma, Marciano della Chiana (AR) e Jesi (AN).

In tutte le prove è stato valutato l'effetto di 2 varietà di differente precocità e di 3 trattamenti fungicidi. Inoltre, in ciascuna località e/o anno sono state messe a confronto diverse pratiche agronomiche (precessioni, lavorazioni, concimazioni azotate). Il contenuto in DON è stato determinato con metodo immunoenzimatico (test ELISA, kit Ridascreen® DON, R-Biopharm).

Dai risultati delle prove è emersa una notevole influenza dell'andamento meteorologico, dell'areale di coltivazione e dell'agrotecnica adottata sulla contaminazione da DON.

Tra gli interventi agronomici mirati al contenimento della fusariosi della spiga e del DON nella granella di frumento duro, l'asportazione e/o l'interramento dei residui della coltura precedente, in particolare del mais, hanno evidenziato una grande efficacia, anche in presenza di marcate manifestazioni della malattia. L'impiego di varietà poco suscettibili o di ciclo non precoce, la tempestività della raccolta, gli eventuali trattamenti fusaricidi a inizio fioritura, sono elementi della tecnica colturale in grado di ridurre ulteriormente la contaminazione da DON.

ABSTRACT

Fusarium head blight (FHB) importance is increasing worldwide due to mycotoxins production that represents a serious threat to human and animal health. Deoxynivalenol (DON) is the most frequently recovered *Fusarium* toxin in wheat crops.

A three-year research was carried out in three locations of Central Italy in order to evaluate the effect of different cultivation practices on DON accumulation in durum wheat grain.

The effect of two cultivars, two fungicides and different cultivation practices (crop rotation, tillage, nitrogen fertilization) were compared. DON concentration of all samples was measured by ELISA test.

The overall results showed that DON levels were influenced by the year and by the environment. FHB incidence and DON contamination were strongly reduced with ploughing by reducing the amount of crop debris on the soil surface. The highest incidence of FHB and DON content were observed in the minimum tillage system following maize cultivation.

The use of less susceptible durum wheat cultivars, the use of fungicides and a timely harvest period were also useful to reduce DON contamination levels.

BIBLIOGRAFIA

- AVANTAGGIATO G., VISCONTI A. (2003): *Misure di controllo della contaminazione da micotossine e strategie di detossificazione*, «Tecnica Molitoria», 54, pp. 1025-1038.
- CAMPAGNA C., HAIDUKOWSKI M., PANCALDI D., PASCALE M., RAVAGLIA S., SILVESTRI M., VISCONTI A. (2005): *Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento*, «L'Informatore Agrario», 1, pp. 39-47.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (2006): Regolamento (EC) n. 1881/2006, 19.12.2006, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L. 364/5.
- DESIDERIO E., AURELI G., BELOCCHI A., D'EGIDIO M.G., PASCALE M. (2008): *Bassa presenza di DON nella granella del frumento duro*, «L'Informatore Agrario», 34, pp. 41-44.
- KLIX M.B., BEYER M. AND VEREET J.A. (2008): *Effects of cultivar, agronomic practices, geographic location, and meteorological conditions on the composition of selected Fusarium species on wheat heads*, «Can. J. Plant Pathol.», 30, pp. 46-57.
- KOCH H.-J., PRINGAS C., MAERLAENDER B. (2006): *Evaluation of environmental and management effects on Fusarium head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat*, «European Journal of Agronomy», 24, pp. 357-366.
- MILLER J.D. (2008): *Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges*, «Food Additives and Contaminants», 25 (2), pp. 219-230.
- MORETTI A., CORAZZA L., BALMAS V., SANTORI A., RITIENI A. (2002): *Funghi tossigeni e micotossine: filiera cerealicola*, «Informatore fitopatologico», 12, pp. 17-33.
- MUNKVOLD G.P. (2003): *Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize*, «Annual Review of Phytopathology», 41, pp. 99-116.
- PARRY D.W., JENKINSON P., MCLEOD L. (1995): *Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals: a review*, «Plant Pathol.», 44, pp. 207-238.
- TERZI V., MORCIA C., FACCIOLO P., FACCINI N., ROSSI V., CIGOLINI M., CORBELLINI M., SCUDELLARI D. AND DELOGU G. (2007): *Fusarium DNA traceability along the bread production chain*, «Int. Journal of Food Science and Technology», 42 (12), pp. 1390-1396.

MASSIMO BLANDINO*, AMEDEO REYNERI*, MICHELANGELO PASCALE**,
MIRIAM HAIDUKOWSKI**, MARIA CORBELLINI***, LUCA PLIZZARI***,
GIULIANO MAZZIERI****, DIEGO SCUDELLARI*****

Percorsi produttivi per la prevenzione della contaminazione da deossinivalenolo nel frumento tenero

INTRODUZIONE

La presenza del deossinivalenolo (DON) nella granella dei cereali vernini, così come quella di altri tricoteceni, è connessa con lo sviluppo sulla spiga di diverse specie fungine patogene della coltura, agenti di una patologia nota come fusariosi della spiga (FHB – *Fusarium* Head Blight). I più importanti agenti della malattia su frumento nel Nord e Centro Italia, sono il *Fusarium graminearum* e il *F. culmorum* (Bottalico, 1998; Lops et al., 1998; Birzele et al., 2002; Ioos et al., 2004). Andamenti climatici piovosi o comunque caldumidi nel corso delle fasi fenologiche comprese tra la spigatura e la maturazione lattea, favoriscono l'insorgenza e la diffusione della malattia (Balmas et al., 2000; Moretti et al., 2002). In generale si ritiene che il frumento sia più sensibile alla patologia e alla contaminazione da DON rispetto a orzo e segale (Prickett et al., 2000), inoltre si è osservato che in generale le cultivar di frumento duro sono più suscettibili alla contaminazione da DON delle cultivar di frumento tenero (Pascale et al., 2002; Logrieco et al., 2003). Come è già stato sottolineato in diversi lavori, la qualità sanitaria dei cereali si determina principalmente a partire dal campo, in quanto è riconosciuto il ruolo fondamentale delle condizioni ambientali e dell'agrotecnica per lo sviluppo della malattia (Campagna et al., 2005; Reyneri e Blandino, 2006; Gourdain, 2008). La corretta gestione della problematica della fusariosi della spiga deve quindi essere inserita in un programma di lotta integrata che consideri sia la preven-

* Dip. Agroselwiter, Università degli Studi di Torino

** Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Bari

*** CRA-SCV, S. Angelo Lodigiano (Lo)

**** Azienda Sperimentale ASSAM, Jesi (An)

***** CRPV - Filiera Grandi Colture e Sementi, Imola (Bo)

zione agronomica, sia la difesa fitosanitaria della coltura (Pancaldi et al., 2005; Koch et al., 2006; Maiorano et al., 2008). Per il frumento, le ricerche fino ad ora condotte in ambienti diversi da quello italiano hanno evidenziato che la contaminazione da DON è risultata influenzata principalmente dall'effetto varietale, dalle lavorazioni del terreno, dalla rotazione colturale e dall'applicazione di fungicidi (Bai e Shaker, 1994; Edwards, 2004). Con la recente applicazione in Unione Europea dei limiti per il contenuto in micotossine prodotte da funghi del genere *Fusarium* nei prodotti destinati all'alimentazione umana (Reg. 1881/2006/CE) si rende necessario valutare con maggiore attenzione l'efficacia dei metodi di lotta diretti e indiretti alla fusariosi della spiga nel frumento tenero in diversi areali di produzione. I risultati ottenuti in precedenti sperimentazioni evidenziano una riduzione risolutiva della contaminazione da DON, può essere conseguita solo se sono applicate le diverse pratiche agronomiche in modo corretto e combinato secondo definiti percorsi colturali (Pirgozliev et al., 2003).

Questo contributo analizza l'effetto delle principali strategie di prevenzione e controllo, intese sia come singole tecniche agronomiche, sia come percorsi produttivi di produzione integrata, sulla contaminazione da DON nel frumento tenero, coltivato nel Nord e nel Centro Italia. La scelta di confrontare percorsi produttivi, intesi come un insieme combinato e razionale di tecniche agronomiche di coltivazione, trae origine dalla necessità di valutare in modo più compiuto i vantaggi e i limiti concreti offerti dalla prevenzione in campo, per fornire una traccia più vicina alle realtà operative delle aziende cerealicole.

MATERIALI E METODI

Per valutare l'influenza ambientale e gli strumenti agronomici disponibili per il controllo della fusariosi della spiga su frumento tenero, nelle campagne agrarie 2005-2006, 2006-2007 e 2007-2008, sono stati predisposti 4 campi sperimentali nelle località di Imola (Bo), Jesi (An), San Angelo Lodigiano (Lo) e Riva presso Chieri (To).

In ogni località, secondo un protocollo comune, sono stati confrontati i seguenti fattori in assenza di inoculo artificiale:

- 2 gestioni dei residui colturali della precessione a cereale (interramento mediante aratura o presenza in superficie a seguito della semina diretta/minima lavorazione);
- 2 cultivar con differente suscettibilità alla fusariosi della spiga (sensibile e mediamente resistente);

- 3 trattamenti fungicidi con prodotti a diversa modalità di azione:
 - T1: testimone non trattato;
 - T2: trattamento con miscela fusaricida ad ampio spettro (p.a. proclo-raz, Sportak® EW, Basf + epossiconazolo, Opus®, Basf);
 - T3: trattamento con fungicida triazolico (p.a. metconazolo, Caramba Star®, Basf).

I trattamenti fungicidi sopraelencati sono stati confrontati con ulteriori 2 trattamenti (T4, T5) volti ad approfondire l'effetto delle miscele dei tratta-menti fusaricidi con prodotti che proteggano la funzionalità e la vitalità della foglia bandiera quali i concimi fogliari o prodotti fungicidi strobilurinici:

- T4: trattamento con procloraz + epossiconazolo + Fertileader® Vital-954 (concime fogliare, Timac Agro Italia);
- T5: trattamento con procloraz + azoxystrobin (Amistar®, Syngenta Crop protection).

Sono state confrontate ogni anno le varietà Serio, molto sensibile, e Bolo-gna, mediamente resistente, secondo la classificazione proposta da Mayerle et al. (2007).

LOCALITÀ E PROVINCIA	IMOLA (BO)	JESI (AN)	RIVA PRESSO CHIERI (TO)	S. ANGELO LODIGIANO (LO)
Tessitura terreno	Argilloso	Franco-argilloso	Franco-limoso	Sabbioso
Stagione culturale	2005-2006			
Precessione culturale	Sorgo da granella	Frumento tenero	Mais da granella	Mais da granella
Data di semina	22-dicem-05(1)	17-gennaio-05 ¹	28-ottobre-05	15-novembre-05
Data trattamento fungicida	18-maggio-06	22-maggio-08	18-maggio-06	16-maggio-06
Data di raccolta	12-luglio-06	11-luglio-06	10-luglio-06	12-luglio-06
Stagione culturale	2006-2007			
Precessione culturale	Sorgo da granella	Frumento duro	Mais da granella	Mais da granella
Data di semina	18-ottobre-06	28-novembre-06	27-ottobre-06	16-novembre-06
Data trattamento fungicida	26-aprile-07	30-aprile-07	6-maggio-07	7-maggio-07
Data di raccolta	21-giugno-07	22-giugno-07	28-giugno-07	16-luglio-07
Stagione culturale	2007-2008			
Precessione culturale	Mais da granella	Frumento duro	Mais da granella	Mais da granella
Data di semina	22-ottobre-07	14-dicembre-07	2-novembre-07	15-novembre-07
Data trattamento fungicida	7-maggio-08	5-maggio-08	16-maggio-08	9-maggio-08
Data di raccolta	7-luglio-08	1-luglio-08	15-luglio-08	2-luglio-08

¹ Semina ritardata a causa delle abbondanti precipitazioni autunnali.

Tab. 1 *Principali informazioni relative ai campi sperimentali*

Il trattamento è stato effettuato in ogni anno e località tra la spigatura e inizio fioritura (Zadoks Growth Stage GS 59-61, Zadoks et al., 1974). Tutte le altre principali informazioni relative alle prove sperimentali per ciascun anno di sperimentazione sono riassunte in tabella 1.

Le parcelle elementari hanno presentato una superficie di 10-15 m², secondo uno schema sperimentale split plot, con la modalità di gestione dei residui quale fattore principale e la varietà e i trattamenti fungicidi come sottofattori, con 3 ripetizioni. Per identificare le specie di *Fusarium* responsabili della malattia, dalle parcelle testimone di ciascuna varietà sono state raccolte 10 spighe allo stadio di maturazione latteo-cerosa (GS 78-80) con sintomi di fusariosi. L'isolamento e il riconoscimento delle singole specie di *Fusarium* sono stati eseguiti secondo le metodologie riportate da Nelson et al. (1983). Per tutti i trattamenti a confronto si è proceduto a rilevare alla maturazione cerosa l'incidenza e la severità della fusariosi della spiga, utilizzando la scala di Parry et al. (1995) e, alla raccolta, la produzione, il peso ettolitrico e il peso dei mille semi. I campioni di granella di ogni parcella sono stati analizzati per il contenuto in DON mediante analisi con metodica immunoenzimatica (test ELISA) e confrontati con analisi sul coacervo della singola ripetizione con metodica HPLC con le modalità riportate da Pascale et al. nel capitolo "Confronto tra metodi ELISA e HPLC per la determinazione del deossinivalenolo (DON) in frumento tenero e duro".

RISULTATI

La sperimentazione è stata condotta in annate con differente andamento meteorologico tra l'inizio della spigatura e la raccolta, con una forte influenza sul livello di infezione delle specie responsabili della FHB e del contenuto in DON della granella alla raccolta. Nella primavera del 2006 in tutti gli ambienti, le scarse precipitazioni osservate in concomitanza della fioritura della coltura e l'andamento climatico di giugno, caratterizzato da temperature spesso superiori alla media, hanno determinato una contenuta incidenza delle infezioni. Nello stesso periodo del 2007, alcune piogge durante la fioritura hanno favorito una maggior infezione delle specie responsabili della FHB, con più elevati valori di incidenza e severità dell'attacco su spiga, in particolare per i testimoni non trattati. Nel maggio-giugno del 2008 l'elevata e continua piovosità per tutto il periodo di maturazione, a partire dalla fioritura, ha determinato un forte sviluppo della FHB e alte concentrazioni di DON nelle cariossidi alla raccolta. Le analisi micologiche sulle cariossidi delle parcelle testimone hanno isolato *F. graminearum* con una maggiore frequenza in tutte le località. L'infe-

zione di questa specie fungina è risultata in media del 13% delle cariossidi nelle annate 2005-2006 e 2006-2007 e del 38% nel 2007-2008. Al contrario, altre specie, quali *F. culmorum* e *F. poae* sono stati ritrovate solo in tracce.

Il DON è stato riscontrato nell'82% dei campioni raccolti nel 2006, con un valore mediano dei campioni positivi pari a $103 \mu\text{g kg}^{-1}$, e con il 9% dei campioni positivi che hanno superato il limite di $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Reg. Reg. 1881/2006/CE). Nel 2007 il numero di campioni positivi è stato del 77%, con livelli medi di contaminazione più contenuti; inoltre nessun campione ha superato il limite di legge previsto dal Reg. 1881/2006/CE. Al contrario nel 2008 il 91% dei campioni è risultato contaminato da DON (valore mediano dei campioni positivi di $8161 \mu\text{g kg}^{-1}$), con oltre il 65% dei campioni che hanno presentato valori di contaminazione al di sopra del limite previsto dal regolamento comunitario. Dal confronto tra le località si conferma in ogni anno di sperimentazione come i livelli di contaminazione di questa micotossina aumentino spostandosi dal Centro al Nord Italia.

In tabella 2 è riportato l'effetto della gestione dei residui colturali (interrato e presenti in superficie) sui sintomi della FHB, sulla produzione di granella e sul contenuto in DON. Si evidenzia come la presenza dei residui colturali in

STAGIONE COLTURALE	GESTIONE DEI RESIDUI COLTURALI ^a	INCIDENZA FUSARIOSI ^b (%)	SEVERITÀ FUSARIOSI ^c (%)	PRODUZIONE GRANELLA ^d (t ha ⁻¹)	DON ^e ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
2005-2006	Interramento	18,7 b	1,6 b	8,2 a	157 b
	Presenti in superficie	21,9 a	2,0 a	7,3 b	602 a
	<i>P (F)</i>	0,036	0,034	<0.001	<0.001
2006-2007	Interramento	43,4 b	3,6 b	6,8 a	65 b
	Presenti in superficie	49,3 a	4,9 a	6,4 b	193 a
	<i>P (F)</i>	<0.001	0,003	<0.001	<0.001
2007-2008	Interramento	50,0 b	4,6 b	7,0 a	3581 b
	Presenti in superficie	58,9 a	9,8 a	5,3 b	12740 a
	<i>P (F)</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a Gestione dei residui: interramento mediante aratura; presenti in superficie a seguito di semina su sodo.

^b L'incidenza della fusariosi è stata calcolata come percentuale di spighe presentanti sintomi.

^c La severità della fusariosi è stata calcolata come percentuale di cariossidi per spiga presentanti sintomi.

^d Produzione di granella al 12% di umidità.

^e Analisi effettuate con metodica ELISA, limite di rilevazione di $18 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Valori nella stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti. Il livello di significatività è riportato in tabella. I dati riportati sono dati medi di 4 località e di 3 ripetizioni per ciascuna località e degli altri fattori agronomici previsti dalla sperimentazione (varietà, trattamento fungicida).

Tab. 2 Effetto della gestione dei residui colturali sull'incidenza e la severità della fusariosi della spiga, sulla produzione di granella e sul contenuto in DON, sperimentazione condotta in 4 località nel periodo 2005-2008

superficie quale conseguenza dell'adozione della semina diretta abbia determinato valori di incidenza e severità della fusariosi significativamente più alti in tutte le annate di sperimentazione rispetto all'aratura. In media nelle sperimentazioni condotte nel 2005-2006 e 2006-2007, l'aratura ha ridotto del 13% l'incidenza e del 15% la severità della fusariosi della spiga rispetto alla semina su sodo. Nel 2007-08 le differenze osservate sono state più consistenti e rispettivamente del 15% e 53% rispettivamente per incidenza e severità della FHB.

In tutte le annate si è osservato un deciso vantaggio produttivo a seguito dell'aratura rispetto alla semina diretta, che è risultato compreso tra il 9% delle annate con una contenuta pressione della FHB e il 24% osservato nella campagna con maggiore sviluppo della malattia. L'interramento dei residui colturali con l'aratura ha significativamente ridotto la contaminazione da DON (-70%) rispetto alla semina su sodo in tutte le annate.

In tutte le annate la varietà Serio, classificata come sensibile, ha confermato una maggiore suscettibilità alla FHB, con un aumento medio dell'incidenza e della severità della malattia rispettivamente del 32% e 55% rispetto Bologna, classificata come mediamente resistente (tab. 3). Anche nella campagna 2007-2008, a dispetto del diverso livello di suscettibilità alla patologia, non si sono

STAGIONE COLTURALE	CULTIVAR ^a	INCIDENZA FUSARIOSI ^b (%)	SEVERITÀ FUSARIOSI ^c (%)	PRODUZIONE GRANELLA ^d (t ha ⁻¹)	DON ^e (µg kg ⁻¹)
2005-2006	S	28,5 a	2,9 a	7,6 a	694 a
	MR	12,1 b	0,6 b	7,8 a	65 b
	<i>P (F)</i>	<0.001	<0.001	0,099	<0.001
2006-2007	S	52,0 a	5,3 a	6,4 a	202 a
	MR	40,7 b	3,2 b	6,8 a	57 b
	<i>P (F)</i>	<0.001	<0.001	0,084	<0.001
2007-2008	S	59,2 a	9,4 a	6,1 a	9767 a
	MR	49,7 b	5,0 b	6,2 a	6554 b
	<i>P (F)</i>	<0.001	<0.001	0,375	<0.001

^a S: sensibile, Serio; MR: mediamente resistente, Bologna.

^b L'incidenza della fusariosi è stata calcolata come percentuale di spighe presentanti sintomi.

^c La severità della fusariosi è stata calcolata come percentuale di cariossidi per spiga presentanti sintomi.

^d Produzione di granella al 12% di umidità.

^e Analisi effettuate con metodica ELISA, limite di rilevazione di 18 µg kg⁻¹.

Valori nella stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti. Il livello di significatività è riportato in tabella. I dati riportati sono dati medi di 4 località e di 3 ripetizioni per ciascuna località e degli altri fattori agronomici previsti dalla sperimentazione (gestione dei residui, trattamento fungicida).

Tab. 3 *Effetto della scelta varietale sull'incidenza e la severità della fusariosi della spiga, sulla produzione di granella e sul contenuto in DON, sperimentazione condotta in 4 località nel periodo 2005-2008*

osservate differenze significative per il livello produttivo tra le cultivar in prova. La scelta di una varietà mediamente resistente ha ridotto il contenuto in DON nella granella alla raccolta in media dell'81% nelle annate caratterizzate da andamenti meteorologici, tra spigatura e maturazione cerosa, poco favorevoli allo sviluppo dell'inoculo fungino responsabile della malattia (campagne agrarie 2005-2006 e 2006-2007). Al contrario con una più forte presenza di inoculo fungino, per il manifestarsi di condizioni meteorologiche favorevoli, quali quelle riscontrate nel 2007-2008, l'effetto preventivo dovuto all'adozione di una varietà meno suscettibile è risultato più contenuto (-33%).

Nelle campagne 2005-2006 e 2006-2007, i trattamenti fungicidi hanno

STAGIONE CULTURALE	TRATTAMENTO FUNGICIDA ^a	INCIDENZA FUSARIOSI ^b (%)	SEVERITÀ FUSARIOSI ^c (%)	PRODUZIONE GRANELLA ^d (t ha ⁻¹)	DON ^e (µg kg ⁻¹)
2005-2006	T1	33,2 a	4,0 a	7,3 b	681 a
	T2	17,0 b	1,0 b	7,9 a	274 b
	T3	18,5 b	1,2 b	7,8 a	324 b
	T4	16,9 b	1,0 b	7,9 a	296 b
	T5	16,0 b	1,7 b	7,8 a	323 b
	<i>P (F)</i>	<0.001	<0.001	0,009	0,001
2006-2007	T1	57,9 a	8,5 a	6,1 b	215 a
	T2	42,9 b	3,0 b	6,7 a	83 b
	T3	45,9 b	3,6 b	6,6 a	108 b
	T4	43,6 b	3,0 b	6,8 a	93 b
	T5	41,5 b	3,2 b	6,7 a	148 b
	<i>P (F)</i>	<0.001	<0.001	0,002	<0.001
2007-2008	T1	77,6 a	19,4 a	5,0 b	10477 a
	T2	47,5 c	3,6 b	6,4 a	7324 b
	T3	57,6 b	5,0 b	6,3 a	5387 c
	T4	44,7 c	3,6 b	6,6 a	8260 b
	T5	44,8 c	4,3 b	6,3 a	9356 ab
	<i>P (F)</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a Trattamento fungicida: T1, testimone non trattato; T2, trattamento con procloraz + epossiconazolo; T3, trattamento metconazolo; T4, trattamento con procloraz + epossiconazolo + concime fogliare; T5, trattamento con procloraz + azoxystrobin.

^b L'incidenza della fusariosi è stata calcolata come percentuale di spighe presentanti sintomi.

^c La severità della fusariosi è stata calcolata come percentuale di cariossidi per spiga presentanti sintomi.

^d Produzione di granella al 12% di umidità.

^e Analisi effettuate con metodica ELISA, limite di rilevazione di 18 µg kg⁻¹.

Valori nella stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti. Il livello di significatività è riportato in tabella. I dati riportati sono dati medi di 4 località e di 3 ripetizioni per ciascuna località e degli altri fattori agronomici previsti dalla sperimentazione (gestione dei residui, varietà).

Tab. 4 *Effetto del trattamento fungicida in spigatura sull'incidenza e la severità della fusariosi della spiga, sulla produzione di granella e sul contenuto in DON, sperimentazione condotta in 4 località nel periodo 2005-2008*

significativamente ridotto l'incidenza e la severità della FHB rispettivamente del 38% e del 73%, ma senza evidenziare differenze significative nell'ambito delle diverse soluzioni confrontate (tab. 4). In queste annate il trattamento fungicida condotto alla spigatura ha permesso un aumento significativo della produzione del 8% e una riduzione del contenuto in DON del 61% rispetto al testimone non trattato.

Nel 2007-2008 il trattamento con la miscela procloraz + epossiconazolo (T2) ha evidenziato valori dell'incidenza della fusariosi della spiga significativamente inferiori rispetto a quelli osservati nelle parcelle trattate con metconazolo (T3). In questa annata il trattamento fungicida ha evidenziato un aumento produttivo medio del 22%. Il vantaggio produttivo conseguente al trattamento fungicida è correlato a un aumento del peso ettolitrico e del peso dei mille semi, con una diminuzione delle cariossidi striminzite. L'impiego di un concime fogliare (T4) o di un strobilurina, fungicida in grado di controllare in maniera più efficace le malattie fogliari e dotato di un effetto "rinverdente" sulla coltura (T5), abbinati al trattamento contro i *Fusaria*, non ha evidenziato differenze in termini di contenimento della malattia o di aumento della produzione. Relativamente alla contaminazione da DON il trattamento con metconazolo ha evidenziato valori di contaminazione significativamente inferiori rispetto alla miscela procloraz + epossiconazolo. La riduzione del contenuto in DON osservata per il trattamento T3 rispetto al testimone non trattato (T1) è stata del 45%, mentre il trattamento T2 ha ridotto la concentrazione della tossina del 30%. In un'annata con una maggior pressione della malattia, si conferma l'attività più specificatamente rivolta al *Fusarium graminearum* da parte dei fungicidi a base di metconazolo rispetto ad altri principi attivi, già osservata da Paul et al. (2008). L'azione più selettiva evidenziata da questo principio attivo determina una minor riduzione dei sintomi della malattia, in quanto sono presenti altre specie fungine non tossigene quali *Microdochium nivale* coinvolte nella patologia, ma un più efficace contenimento della contaminazione da DON per effetto dell'attività specifica verso il fungo produttore.

L'aggiunta di un concime fogliare al programma di lotta con fungicida triazolico non ha significativamente aumentato la contaminazione di questa micotossina, mentre l'impiego di strobilurina ha portato a un aumento della contaminazione, con valori in taluni casi anche superiori ai testimoni non trattati, confermando i rischi derivati dall'impiego di questa famiglia di fungicidi in fioritura per un effetto competitivo tra le specie fungine agenti della patologia (Blandino et al., 2006).

Delle 20 possibili combinazioni di trattamenti, in questo contributo ne sono state confrontate 5 che sono l'espressione di altrettanti e significativi percorsi produttivi: percorso produttivo ad alto rischio (AR), rischioso (RI), a

SIGLA	PERCORSO COLTURALE	GESTIONE DEI RESIDUI	VARIETÀ	TRATTAMENTO FUSARICIDA
AR	Alto rischio	Semina diretta	Sensibile	Assente
RI	Rischioso	Semina diretta	Sensibile	Spigatura
MR	A medio rischio	Aratura	Sensibile	Assente
CO	Corretto	Aratura	Mediamente resistente	Assente
AT	Attento	Aratura	Mediamente resistente	Spigatura

Tab. 5 I percorsi produttivi a confronto nelle 4 località della sperimentazione

medio rischio (MR), corretto (CO) e attento (AT). Nel primo sono attuate una serie di pratiche che singolarmente considerate hanno dato luogo ad alte contaminazioni; progressivamente sono state inserite pratiche che invece hanno dimostrato di prevenire l'infezione dei *Fusaria* in fioritura. Infine l'ultimo percorso produttivo (AT) abbina alle scelte agronomiche che meno predispongono la coltura alla contaminazione da DON, la difesa diretta con fungicidi. In tabella 5 sono riportati in dettaglio i percorsi colturali a confronto.

L'effetto dell'applicazione dei percorsi produttivi nei 3 anni di sperimentazione sull'incidenza e la severità della fusariosi della spiga, sulla produzione di granella e sulla contaminazione da DON è riportato in tabella 6. Muovendosi da un percorso ad alto rischio (AR) verso un percorso attento (AT) si è osservata in ogni anno di sperimentazione una riduzione dei sintomi della FHB, un aumento della produzione di granella e una riduzione del contenuto in DON.

Nelle campagne agrarie 2005-2006 e 2006-2007 si è registrata una prima riduzione significativa della contaminazione di questa micotossina rispetto al percorso AR con l'applicazione di un primo fattore di controllo della patologia (trattamento fungicida nel percorso RI e aratura nel percorso MR). Un'ulteriore riduzione significativa del contenuto in DON nella granella si è osservata con l'aggiunta di un altro fattore di controllo (impiego di varietà mediamente resistente nel percorso CO), mentre, in annate con una bassa incidenza della FHB, l'applicazione di un fusaricida all'interno di un percorso agronomico corretto (AT) ha tendenzialmente abbassato il contenuto in DON, senza però determinare differenze significative rispetto al percorso corretto (CO), che non ha previsto l'intervento di lotta diretta.

Al contrario in condizioni di forte pressione della malattia (2007-2008), l'introduzione di ogni ulteriore elemento di controllo con l'adozione di percorsi produttivi progressivamente più attenti ha evidenziato sempre un'ulteriore riduzione significativa della contaminazione della micotossina.

L'applicazione di un percorso RI, con l'applicazione del trattamento fungi-

STAGIONE CULTURALE	PERCORSO CULTURALE ^a	INCIDENZA FUSARIOSI ^b (%)	SEVERITÀ FUSARIOSI ^c (%)	PRODUZIONE GRANELLA ^d (t ha ⁻¹)	DON ^e (µg kg ⁻¹)
2005-06	AR	51,8 a	7,6 a	6,9 c	1740 a
	RI	26,7 c	2,1 c	7,6 b	875 b
	MR	36,9 b	5,2 b	7,4 b	732 b
	CO	20,4 c	1,5 c	8,3 a	23 c
	AT	10,4 d	0,3 d	8,4 a	18 c
	<i>P (F)</i>	0,006	0,019	0,004	<0.001
2006-07	AR	66,1 a	12,8 a	5,7 c	476 a
	RI	48,7 b	4,3 c	6,3 b	226 b
	MR	63,6 a	7,4 b	5,8 c	176 b
	CO	45,3 c	5,9 bc	6,8 ab	41 c
	AT	32,8 d	2,1 d	7,1 a	15 c
	<i>P (F)</i>	0,018	0,022	0,007	<0.001
2007-08	AR	83,4 a	32,8 a	4,0 c	16847 a
	RI	57,0 c	6,1 c	5,4 b	13258 b
	MR	77,6 a	19,1 b	5,7 b	7201 c
	CO	69,3 b	6,6 c	5,8 b	3772 d
	AT	38,4 d	1,3 d	7,4 a	1917 e
	<i>P (F)</i>	<0.001	0,039	0,024	<0.001

^a Percorsi culturali: vedi tabella 5.
^b L'incidenza della fusariosi è stata calcolata come percentuale di spighe presentanti sintomi.
^c La severità della fusariosi è stata calcolata come percentuale di cariossidi per spiga presentanti sintomi.
^d Produzione di granella al 12% di umidità.
^e Analisi effettuate con metodica ELISA, limite di rilevazione di 18 µg kg⁻¹.
Valori nella stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti. Il livello di significatività è riportato in tabella. I dati riportati sono dati medi di 4 località e di 3 ripetizioni per ciascuna località.

Tab. 6 *Effetto dell'applicazione dei percorsi culturali sull'incidenza e la severità della fusariosi della spiga, sulla produzione di granella e sul contenuto in DON, sperimentazione condotta in 4 località nel periodo 2005-2008*

cida in assenza di prevenzione agronomica, ha evidenziato una riduzione dei sintomi della fusariosi della spiga simile a quella evidenziata dal percorso CO, caratterizzato dalla semina di una varietà mediamente resistente con interrimento dei residui. In media entrambi i percorsi culturali hanno ridotto l'incidenza e la severità della FHB rispetto al percorso AR rispettivamente del 36% e del 73%. Al contrario la prevenzione agronomica attuata con il percorso CO ha ridotto del 89% la presenza di DON nella granella rispetto al percorso AR, a fronte di una riduzione media del 41% ottenuta con il solo controllo mediante trattamento fungicida (RI).

L'applicazione del trattamento fungicida in un percorso in cui è già prevista la prevenzione agronomica dello sviluppo della FHB (percorso AT), ha ulteriormente ridotto i sintomi della patologia tutti gli anni di sperimentazione,

sebbene significativi vantaggi produttivi (+ 21%) e limitazioni alla contaminazione da DON (-49%) rispetto al percorso CO, si siano osservati solo nell'annata con condizioni meteorologiche favorevoli allo sviluppo dei *Fusaria*.

CONCLUSIONI

I dati raccolti hanno evidenziato come il rischio di elevati attacchi della fusariosi della spiga nei cereali vernini e conseguenti contaminazioni da DON possa essere molto elevato in Centro e Nord Italia. In particolare, in presenza di condizioni meteorologiche favorevoli allo sviluppo della malattia, le contaminazioni di questa micotossina nel frumento tenero negli areali di coltivazione più settentrionali hanno raggiunto valori anche molto superiori ai limiti comunitari. Alla luce anche delle alte contaminazioni osservate nella campagna 2008 nel Nord Italia, i dati ottenuti da questa sperimentazione confermano l'importanza dell'agrotecnica nel ridurre le contaminazioni da DON nei cereali vernini. Tra le scelte agronomiche volte al contenimento della FHB e, conseguentemente, della concentrazione di DON, l'interramento dei residui colturali, l'adozione di varietà più resistenti e l'impiego di fungicidi tra la spigatura e l'inizio della fioritura hanno dimostrato una sicura efficacia, seppur variabile in relazione alle condizioni ambientali e colturali. L'importanza relativa delle diverse scelte agronomiche sulla prevenzione della FHB e sulla contaminazione da DON riportata è risultata essere differente in annate con decorso asciutto tra la spigatura e la maturazione cerosa, dove prevale l'effetto dovuto alla suscettibilità varietale, seguito dalla presenza dei residui colturali, ma soprattutto dalla loro interazione, rispetto ad annate con andamenti climatici che predispongano un maggior sviluppo della malattia, dove risulta molto importante la presenza dei residui.

La ricerca evidenzia che, innanzitutto, i livelli di contaminazione di DON per il frumento tenero e duro possono essere rispettati attraverso una corretta gestione colturale, che eviti le combinazioni di agrotecniche che conducono a un significativo aumento del rischio, senza peraltro richiedere una sostanziale modificazione delle tecniche correnti. Per i cereali vernini la tecnica agronomica in grado di influenzare il processo infettivo si attua principalmente con la gestione dei residui colturali, principale fonte di inoculo degli agenti della malattia, e la scelta varietale, con l'impiego di cultivar con limitata suscettibilità alla fusariosi della spiga. La rotazione agronomica, che eviti il ristoppio del cereale, ma soprattutto la successione mais (o sorgo)-frumento, possono determinare un ulteriore contenimento del contenuto in DON, in particolare nelle annate e negli ambienti più soggetti all'insorgenza della fusariosi della spiga.

L'intervento di lotta diretta con fungicidi ha determinato una non risolutiva riduzione della contaminazione da DON in presenza di elevati livelli di infezione della spiga, per la presenza di andamenti climatici e di un'agrotecnica predisponente lo sviluppo delle specie fungine responsabili della patologia. L'intervento con fusaricidi alla spigatura non va quindi visto solo come un intervento "curativo" da applicare a un'agrotecnica rischiosa, ma come un ulteriore tassello da inserire in un'agrotecnica corretta. Tale pratica va quindi applicata in via preventiva alla spigatura in tutti quegli areali che sono potenzialmente più soggetti al rischio di infezioni della spiga da *Fusarium*.

Anche alla luce del più alto attacco di fusariosi della spiga registrato nella campagna 2007-2008, è necessario un permanente sforzo da parte di tutti gli operatori della filiera (aziende agricole, centri di raccolta e stoccaggio, industria molitoria, imprese fornitrici dei mezzi tecnici) per monitorare e verificare in ogni areale i migliori metodi di controllo della malattia e aggiornare i mezzi tecnici disponibili, al fine di predisporre e perfezionare i Codici di Buone Pratiche Agricole anche in funzione della destinazione d'uso nelle diverse filiere (infanzia, alimentare per produzioni diverse, zootecnica).

I percorsi culturali basati sull'insieme coordinato delle tecniche agronomiche per la prevenzione della contaminazione da micotossine hanno permesso di ottenere risultati di assoluto rilievo. Peraltro quando la componente climatico-ambientale è estremamente favorevole allo sviluppo delle muffe tossigene, come evidenziato nella campagna 2007-2008 in Nord Italia, la prevenzione agronomica non è da sola in grado di assicurare il raggiungimento degli obiettivi sanitari prefissati. Per questo nuove strade debbono essere esplorate. A titolo di esempio forti attese sono riposte sulle nuove varietà più resistenti a parità di produzione e qualità; di fungicidi più efficaci e possibilmente innovativi cioè con diversi meccanismi di azione rispetto a quelli attuali e, infine, di microrganismi competitori verso quelli tossigeni, o in grado di demolire selettivamente la molecola tossica. Ma nessuna di queste soluzioni, per quanto promettenti, appare da sola in grado di risolvere il problema, anche per la capacità delle specie tossigene di sviluppare resistenze o sfruttare strategie alternative. Per questo, la messa a punto delle tecniche agronomiche mirate alla prevenzione non è conclusa ma dovrà proseguire affinandosi sempre più.

RIASSUNTO

La fusariosi della spiga (FHB - *Fusarium* Head Blight) è una delle principali malattie del frumento; essa è causa di perdite produttive e soprattutto qualitative a seguito della contaminazione da deossinivalenolo (DON). In questo contributo vengono presentati i risul-

tati dell'applicazione di percorsi produttivi per il contenimento della contaminazione da DON nel frumento tenero. Dal 2005 al 2008 sono stati realizzati 4 campi sperimentali per il frumento tenero in Nord e Centro Italia. In ogni località e anno sono stati messi a confronto 2 cultivar a diversa suscettibilità (sensibile vs. mediamente resistente), 2 gestioni dei residui (interramento a seguito dell'aratura vs presenza in superficie a seguito di minima lavorazione o semina su sodo) e 5 trattamenti fungicidi alla spigatura (testimone non trattato, impiego di principi attivi diversi).

Un chiaro vantaggio produttivo è stato evidenziato con l'aratura (+14%) rispetto alla semina su sodo e a seguito del trattamento fungicida (+13%). I sintomi da FHB sono stati ridotti dall'interramento dei residui colturali (-33%), dall'impiego di una varietà mediamente resistente (-55%) e dal trattamento fungicida (-73%). La contaminazione da DON è risultata chiaramente correlata con la severità della FHB. Un percorso agronomico attento (cultivar mediamente resistente, aratura e lotta diretta con fungicidi in spigatura) ha in media ridotto di oltre il 98% il contenuto in DON rispetto a un percorso altamente rischioso (cultivar sensibile, semina su sodo, nessun trattamento fungicida).

ABSTRACT

The new European Union regulations, that defined maximum levels for *Fusarium*-toxins in food, requires the evaluation of the methods of direct and indirect control of the Fusarium head blight (FHB) in soft wheat.

During 2005-2008 period, 2 varieties with different susceptibility were compared in 4 sites. In each place these treatments were compared: 2 cultivar (susceptible vs. medium-resistant), 2 soil tillages (ploughing vs. direct sowing), 5 fungicide treatments at heading (untreated control, application of different active substances).

A clear productive advantage (+14%) was evidenced with ploughing compared to direct sowing and an advantage was also evidenced with the use of fungicide compared to control not treated (+13%). FHB symptoms were significantly reduced by ploughing (-33%), by the use of a medium-resistant variety (-55%) and by the fungicide application at heading (-73%). The deoxynivalenol (DON) contamination was clearly correlated with the FHB severity. The careful agricultural practices (resistant variety, ploughing and fungicide treatment at heading) showed a 98% lower DON contamination than the hazardous productive practices (susceptible variety, direct sowing and no treated).

BIBLIOGRAFIA

- BAI G-H., SHANER G. (1994): *Scab of wheat: prospect for control*, «Plant Dis.», 78 (8), pp. 760-766.
- BALMAS V., VITALE S., MARCELLO A., CORAZZA L. (2000): *Fusariosi della spiga*, «L'Informatore Agrario», 35, pp. 27-29.
- BLANDINO M., MINELLI L., REYNERI A. (2006): *Strategies for the chemical control of Fusarium head blight: effect on yield, alveographic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain*, «European Journal of Agronomy», 25, pp. 193-201.

- BIRZELE B., MEIER A., HINDORF H., KRÄMER J., DEHNE H.-W. (2002): *Epidemiology of Fusarium infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany*, «Europ. J. Plant Pathol.», 108, pp. 667-673.
- BOTTALICO A. (1998): *Fusarium disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe*, «Journal of Plant Pathology», 80, pp. 85-103.
- CAMPAGNA C., HAIDUKOWSKI M., PANCALDI D., PASCALE M., RAVAGLIA S., SILVESTRI M., VISCONTI A. (2005): *Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento*, «L'Informatore Agrario», 1, pp. 39-47.
- EDWARDS S.G. (2004): *Influence of agricultural practices on Fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins*, «Toxicology Letters», 153, pp. 29-35.
- GOURDAIN E. (2008): *Maitriser le risqué sur les cultures de blés: quels outils pour quelles utilisations?*, in *Mycotoxines des cereals*, ed. Barrier Guillot, Ed Arvalis, Paris, pp. 27-40.
- IOOS R., BELHADJ A., MENEZ M. (2004): *Occurrence and distribution of Microdochium nivale and Fusarium species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002*, «Mycopathologia», 158 (3), pp. 351-362.
- KOCH H.J., PRINGAS C., MAERLAENDER B. (2006): *Evaluation of environmental and management effects on Fusarium head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat*, «Europ. J. Agron.», 24, pp. 357-366.
- LOGRIECO A., BOTTALICO A., MULE G., MORETTI A., PERRONE G. (2003): *Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops*, «European Journal of Plant Pathology», 109 (7), pp. 645-667.
- LOPS R., PASCALE M., PANCALDI D., VISCONTI A. (1998): *Infezioni fungine e presenza di deossinivalenolo in cariossidi di frumento prodotte in diverse regioni italiane*, «Informatore Fitopatologico», 4, pp. 60-66.
- MAIORANO A., BLANDINO M., REYNERI A., VANARA F. (2008): *Effects of maize residues on the Fusarium spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain*, «Crop Protection», 27, pp. 182-188.
- MAYERLE M., PANCALDI D., HAIDUKOWSKI M., PASCALE M., RAVAGLIA S. (2007): *Fusariosi e grano tenero: quali sono le varietà più resistenti*, «L'Informatore Agrario», 2007, 32, pp. 45-49.
- MORETTI A., CORAZZA L., BALMAS V., SANTORI A., RITIENI A. (2003): *Funghi tossigeni e micotossine: filiera cerealicola*, «Informatore fitopatologico», 12, pp. 17-22.
- NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., MARASAS W.F.O. (1983): *Fusarium species: an illustrated manual for identification*, Pennsylvania State University, University Park.
- PANCALDI D., CAMPAGNA C., HAIDUKOWSKI M., PASCALE M., PERRONE G., VISCONTI A. (2005): *Efficacia di fungicida sulla "fusariosi della spiga" ed effetto sul contenuto di deossinivalenolo nel frumento*, «Informatore fitopatologico», 1, pp. 57-62.
- PARRY D.W., JENKINSON P., MCLEOD L. (1995): *Fusarium ear blight (scab) in small grain cereal*, «Review Plant Pathol.», 44, pp. 207-238.
- PASCALE M., BOTTALICO A., PANCALDI D., PERRONE G., VISCONTI A. (2002): *Occurrence of deoxynivalenol in cereals from experimental field in different Italian regions*, «Petria», 12, pp. 123-129.
- PAUL P.A., LIPPS P.E., HERSHMAN M.P., MCMULLEN P., DRAPER M.A., MADDEN L.V. (2008): *Efficacy of Triazole-Based Fungicides for Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Control*, in *Wheat: A Multivariate Meta-Analysis*, «Phytopathology», 98 (9), pp. 999-1011.

- PIRGOZLIEV S.R., EDWARDS S.G., HARE M.C., JENKINSON P. (2003): *Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals*, «European Journal of Plant Pathology», 109, pp. 731-742.
- PRICKETT A.J., MACDONALD S., WILDEY K.B. (2000): *Survey of mycotoxins in stored grain from the 1999 harvest in the UK*, HGCA Project Report 230. Home-Grown Cereals Authority, London.
- REYNERI A., BLANDINO M. (2006): *La fusariosi si previene in campo*, Supplemento a «L'Informatore Agrario», 12, pp. 16-18.
- ZADOKS J.C., CHANG T.T., KONZAK C.F. (1974): *A decimal code for the growth stages of cereals*, «Weed Res.», 14, pp. 415-421.

AMEDEO REYNERI*, MASSIMO BLANDINO*, ALBERTO BONDI**,
GIANNI COLOMBARI**, TERESINA MANCUSO***, AMEDEO PIETRI****

Percorsi produttivi per la prevenzione delle micotossine nel mais

INTRODUZIONE

Da quando nell'ultimo decennio, la contaminazione da micotossine nella granello di mais è divenuto un aspetto sanitario di primario rilievo, è subito apparso necessario valutare le possibilità di prevenire tale contaminazione attraverso l'introduzione di pratiche agronomiche in grado di contrastare lo sviluppo dei funghi tossigeni (Reyneri et al., 2005).

Infatti, negli areali maidicoli nazionali le pratiche ordinarie di post raccolta assicurano in genere un buon livello di controllo delle condizioni di conservazione nelle strutture di stoccaggio, limitando la probabilità di accumulo di micotossine in questa fase (Reyneri et al., 2002). Pertanto già da un primo esame del processo di filiera si evidenzia che, nel caso della maiscoltura italiana, la produzione di micotossine è in larga parte un problema dipendente dalle pratiche agronomiche.

Ad accentuare il problema della contaminazione da micotossine durante la fase di coltivazione sono le condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo di alcune muffe tossigene e alcune pratiche agronomiche che accentuano la durata delle fasi fenologiche favorevoli alla diffusione dell'inoculo e allo sviluppo di tali muffe. Riguardo alle condizioni ambientali, nella Pianura padano-veneta si rinvencono contaminazioni diffuse da *Fusarium verticillioides*, responsabile del marciume rosa della spiga (*Fusarium ear rot*) e da *Fusarium graminearum*, agente del marciume rosso della spiga (*Gibberella ear rot*). Il primo

* Dip. Agroselviter, Università degli Studi di Torino

** Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste, Regione Lombardia

*** Dip. di Economia ed Ingegneria Agraria Forestale e Ambientale, Università degli Studi di Torino

**** Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Università Cattolica del Sacro Cuore

prevale nelle condizioni più ordinarie di coltivazione ed è presente in tutte le annate produttive interessando la totalità dei lotti commercializzati (Battilani et al., 2005; AA.VV., 2005), mentre il secondo appare prevalente solo nelle annate o ambienti caratterizzati da condizioni più fresche durante la maturazione (Doohan, 2003).

Riguardo alle pratiche agronomiche, si devono distinguere quelle che favoriscono l'infezione-inoculo, da quelle che favoriscono la crescita-sviluppo del microrganismo, a quelle che favoriscono la sua dispersione.

Le prime interessano soprattutto quelle che aumentano l'esposizione a una serie di insetti fitofagi che erodendo i tegumenti della cariosside, facilitano la penetrazione del micelio e la colonizzazione fungina all'interno della stessa (Blandino et al., 2008) e quelle correlate agli stress idrici che determinando dilatazioni e contrazioni differenziali tra i vari tessuti vegetali, creano altre vie di penetrazione dei microrganismi. Favoriscono invece la crescita-sviluppo delle muffe tutte quelle pratiche che allungano il processo di maturazione della granella mediante una permanenza prolungata in campo.

Con riferimento invece alle tecniche agronomiche che favoriscono la dispersione, occorre ricordare soprattutto l'avvicendamento e la gestione dei residui attraverso le lavorazioni del terreno; infatti, i *Fusaria* più dannosi sono particolarmente presenti nei residui colturali dei cereali e l'entità dell'inoculo dipende largamente dalla precessione, risultando maggiore nel caso della monocoltura maidicola o di successione a un cereale a paglia o del sorgo, e dell'interramento dei residui, risultando accresciuto quando i residui sono lasciati completamente o in parte in superficie come nel caso della semina diretta o della minima lavorazione (Maiorano et al., 2008).

La rilevanza delle numerose pratiche nelle diverse condizioni colturali e ambientali non è di facile definizione: infatti, la contaminazione finale da micotossine si deve essenzialmente alla complessa interazione ambiente x pratiche colturali x genotipo (Munkvold, 2003).

Nonostante tale complessità, la definizione di percorsi produttivi in grado di fornire produzioni di granella con ridotta probabilità di elevate contaminazioni, è apparsa da subito fondamentale. A tal fine, nell'ambito del progetto Interregionale MICOCER, è stata impostata una ricerca per confrontare percorsi produttivi che combinassero in modo razionale le pratiche agronomiche con la maggiore azione preventiva con altre che, introducendo pratiche più rischiose, potessero potenzialmente accrescere la probabilità di incorrere in elevate contaminazioni.

L'interazione è stata valutata quindi esaminando in diversi ambienti, differenti percorsi produttivi impostati con 2 ibridi a diversa precocità.

MATERIALI E METODI

Nel triennio 2005-2007 sono stati confrontati 6 percorsi produttivi in 3 diverse località della pianura irrigua Piemontese (Carmagnola e Vigone) e Lombarda (Mantova). In tutte le situazioni sono stati posti a confronto percorsi ottenuti dalla combinazione di: epoche di semina, densità colturale, concimazione azotata, ibrido e trattamento alla piralide.

In tabella 1 sono riportati in dettaglio i 4 percorsi colturali più significativi, ottenuti dalla combinazione delle pratiche agronomiche prima ricordate. Per gli altri aspetti si ricorda che: per tutti gli ambienti e le tesi la precessione colturale è stata il mais, le lavorazioni hanno previsto un'aratura superficiale, l'irrigazione è stata attuata secondo le modalità ordinarie della zona (scorrimiento in provincia di Torino e aspersione a Mantova) e il diserbo è stato attuato con un doppio intervento in pre-emergenza e in post emergenza dopo una sarchiatura.

Nei 3 ambienti sono stati impiegati 2 ibridi: PR35Y65 (classe FAO 400) e Kermess (classe FAO 600). Le parcelle elementari hanno presentato una superficie di almeno 500 m², secondo uno schema a blocchi randomizzati con 3 ripetizioni. La dimensione delle parcelle ha tenuto conto della necessità di ottenere un ambiente uniforme e chiuso, così da riproporre in modo corretto la condizione colturali di pieno campo, nonché, per il numero di file, della larghezza a cui operano le macchine utilizzate per il trattamento insetticida.

Il trattamento contro la piralide (*Ostrinia nubilalis*) è stato effettuato nella seconda o terza decade di luglio, impiegando un insetticida piretroide (α -cipermetrina) applicato al momento del picco di volo della seconda generazione e distribuito con attrezzatura munita di trampoli e barra irroratrice a manica d'aria. Le raccolte hanno avuto luogo quando la granella ha raggiunto una umidità compresa tra il 20 e il 26% separatamente per le 2 epoche di semina e in talune circostanza anche per i 2 ibridi.

SIGLA	PERCORSO COLTURALE	DATA DI SEMINA	DENSITÀ COLTURALE (pt ha ⁻¹)	FERTILIZ. N ¹ (kg ha ⁻¹)	CONTROLLO CHIMICO PIRALIDE
PR	rischioso	1-10 Maggio	80000	400	non trattato
PM	a medio rischio	25 Mar - 10 Apr.	80000	400	non trattato
PC	corretto	25 Mar - 10 Apr.	65000	200	non trattato
PA	attento	25 Mar - 10 Apr.	65000	200	distribuzione insetticida ²

¹ La fertilizzazione azotata è stata condotta solo in copertura con urea (46%).
² Trattamento con insetticida piretroide (α -cipermetrina) eseguito al picco di sfarfallamento degli adulti dell'insetto.

Tab. 1 *I percorsi produttivi a confronto nelle 3 località della sperimentazione*

A Mantova, all'interno dello schema sperimentale comune alle altre località, è stato effettuato un ulteriore approfondimento relativo alle modalità di semina. Per ciascun percorso produttivo e senza variare l'investimento, sono state confrontate parcelle seminate con un'interfila ordinaria di 75 cm e con un'interfila di 45 cm.

In tutte le località i rilievi hanno interessato la produzione di granella e l'umidità alla raccolta, l'attacco della piralide e la presenza di ammuuffimenti sulla spiga; per questi ultimi aspetti è stata rilevata l'incidenza, espressa come percentuale di spighe infestate da piralide o colpite da ammuuffimenti, e la severità, intesa come percentuale della spiga erosa dal lepidottero o interessata da muffa visibile.

Sulla granella sono state ricercate le fumonisine B_1 e B_2 , le aflatossine B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , il DON (deossinivalenolo); le analisi sono state effettuate nel laboratorio dell'Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione dell'Università Cattolica di Piacenza. Per la separazione/quantificazione delle micotossine sono state utilizzate le tecniche strumentali più avanzate: per le aflatossine la cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC) con rivelatore fluorimetrico (HPLC-F; Pietri et al., 2009; Stroka et al., 2003); per le fumonisine la HPLC con rivelatore di massa a triplo quadrupolo (HPLC-MS/MS; Pietri et al., 2009; Visconti et al., 2001); per i tricoteceni la gascromatografia (GLC) capillare con rivelatore di massa a trappola ionica (GLC-MS; Eskola et al., 2001; Gilbert et al., 1992). Queste tecniche, che hanno consentito una identificazione sicura e una quantificazione accurata delle micotossine nei campioni esaminati, sono tutte ufficialmente riconosciute a livello internazionale.

RISULTATI

Confronto tra percorsi produttivi

Sebbene la valutazione tra percorsi produttivi debba essere effettuata esaminando la contaminazione finale della granella da micotossine, un primo esame relativo all'entità dell'attacco della piralide e sulla diffusione degli ammuuffimenti permette di compiere una prima valutazione sulle pratiche colturali messe in atto.

L'incidenza e la severità dell'attacco della piralide sono risultate significativamente più elevate nelle semine tardive (PR) rispetto alle semine ordinarie; in questo ambito, come atteso, il trattamento insetticida (PA) ha sempre ridotto significativamente la percentuale di spighe attaccate (-37%) e la superficie media di granella presentanti rotture e danni (-41%) alla raccolta (tab. 2).

FATTORE	FONTE DI VARIAZIONE	INCIDENZA PIRALIDE	SEVERITÀ PIRALIDE	INCIDENZA MARCUME DELLA SPIGA	SEVERITÀ MARCUME DELLA SPIGA
Anno e località	2006, Bigarello	60.1 ab	16.8 bc	55.5	11.7
	2006, Carmagnola	71.0 a	20.9 ab	61.4	10.1
	2006, Vigone	71.8 a	23.1 a	63.0	11.7
	2007, Bigarello	71.8 a	14.7 c	51.5	11.1
	2007, Carmagnola	50.5 b	16.4 bc	49.4	14.5
	2007, Vigone	62.0 ab	20.7 ab	57.9	16.3
	<i>P</i> (F)	**	**	ns	ns
Percorso culturale	PR	79.7 a	24.1 a	71.5 a	19.2 a
	PM	67.7 b	19.8 b	60.0 b	14.2 b
	PC	68.0 b	19.6 b	55.6 c	11.3 c
	PA	42.7 c	11.6 c	38.7 d	7.5 d
	<i>P</i> (F)	***	***	***	***
Ibrido (classe FAO)	400	63.7	18.8	56.2	12.5
	600	65.4	18.7	56.7	13.7
	<i>P</i> (F)	ns	ns	ns	ns
Interazione	<i>P</i> (F)	ns	ns	ns	ns
La stessa lettera indica l'assenza di differenze significative (ANOVA). Significatività <i>P</i> (F) = ns; non significativo, *significativo per $P < 0,05$; ** significativo per $P < 0,01$; *** significativo per $P < 0,001$. I valori medi riportati sono stati trasformati usando $y' = \arcsen \sqrt{x} * 180/\pi$, in quanto percentuali derivanti da conteggio.					

Tab. 2 *Effetto di diversi percorsi produttivi e della classe di maturazione dell'ibrido sui danni su spiga da piralide e da marciume della spiga*

Anche per l'incidenza e la severità del marciume della spiga sono state rilevate differenze altamente significative tra i diversi percorsi produttivi. Se confrontata con il percorso corretto (PC), l'adozione di percorsi più o meno rischiosi, quali PR e PM, ha aumentato la severità dell'ammuffimento rispettivamente del 70% e del 26%. Al contrario il trattamento insetticida (PA) ha ridotto la severità del marciume della spiga (-34%) rispetto al PC. L'attacco da piralide e la presenza di marciume della spiga sono risultati simili tra i 2 ibridi a confronto; pertanto, non è stata osservata nessuna interazione tra l'impiego di ibridi a diversa precocità e i diversi percorsi produttivi.

Nell'ambito di ciascun percorso produttivo, invece, non si sono evidenziate differenze significative relative alla diffusione degli ammuffimenti e all'attacco della piralide tra le colture seminate con interfila a 45 e a 75 cm.

Le fumonisine B₁ e B₂ sono risultate presenti in tutti i campioni analizzati e correlate con l'entità dell'attacco della piralide e del marciume della spiga. Le

pratiche agronomiche più strettamente legate a queste tossine sono state l'epoca di semina e la difesa dalla piralide. Pertanto, le contaminazioni medie si sono ridotte passando dal percorso produttivo ad alto rischio (PR), caratterizzato da semine tardive e assenza di difesa, a quello attento (PA) con semine tempestive e distribuzione di insetticida per colpire la seconda generazione della piralide (tab. 3). Dall'esame dei risultati del triennio si è rilevata una riduzione media della contaminazione da fumonisine rispettivamente di 7, 3 e 2 volte per PR, PM e PC rispetto alla PA; inoltre, quest'ultimo percorso produttivo ha sempre presentato le minori contaminazioni. La diversa interfila alla semina non ha influenzato il contenuto in fumonisine.

L'analisi della contaminazione da DON evidenzia, a differenza del caso precedente, una forte influenza del ritardo della maturazione; pertanto, le maggiori concentrazioni sono state riscontrate con l'ibrido a ciclo pieno (classe FAO 600) e semine tardive seguite nel percorso PR (tab. 3). Con questo percorso si sono riscontrate contaminazioni di 7 volte superiori rispetto al PC. Per la capacità di chiudere il ciclo rapidamente, il ritardo dell'epoca di semina ha comportato incrementi di contaminazione più contenuti per l'ibrido più precoce.

Infine, non sono stati evidenziati vantaggi apprezzabili sul contenuto di DON con trattamento insetticida (PA); si conferma che il fungo produttore (*Fusarium graminearum*) di questa micotossina non è diffuso o facilitato dall'attività della piralide.

FATTORE	FONTE DI VARIAZIONE	FUMONISINA $B_1 + B_2$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFLATOSSINA B_1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Percorso colturale	PR	12412 a	346 a	1.1 a
	PM	5319 b	172 b	0.0 a
	PC	3800 c	89 c	0.0 a
	PA	1733 d	84 c	0.0 a
	P (F)	***	**	ns
Ibrido (classe FAO)	400	5285 a	105 b	0.6
	600	6346 a	240 a	0.0
	P (F)	ns	**	ns
Interazione	P (F)	ns	ns	ns
La stessa lettera indica l'assenza di differenze significative (ANOVA). Significatività P (F) = ns; non significativo, *significativo per $P < 0,05$; ** significativo per $P < 0,01$; *** significativo per $P < 0,001$. I valori medi riportati sono stati trasformati usando $y' = \arcsen \sqrt{x} \cdot 180/\pi$, in quanto percentuali derivanti da conteggio.				

Tab. 3 Effetto di diversi percorsi produttivi e della classe di maturazione dell'ibrido sulla contaminazione da fumonisine, DON e aflatossine

Le aflatossine sono risultate poco presenti e ritrovate in tracce solo nel 2006 in alcuni campioni provenienti da Mantova. In questo ambiente, i diversi percorsi produttivi non hanno influenzato chiaramente il produttore di queste tossine (*Aspergillus flavus*) perché sono state contaminate solo alcune tesi dell'ibrido più precoce. Sebbene questo risultato sia da correlare a uno stress idrico "puntiforme", piuttosto che alla tesi sperimentale, è tuttavia ragionevole ritenere che gli ibridi più precoci siano mediamente più sensibili agli stress idrici: a) per apparati radicali meno espansi e profondi; b) per le maggiori esigenze idriche medie giornaliere conseguenti a investimenti e produzioni di granella elevati all'interno di brevi cicli colturali; c) per le minori riserve idriche della pianta contenute sostanzialmente nell'esile stocco ed espresse, indirettamente, dal più elevato harvest index.

Le produzioni di granella ottenute seguendo i diversi percorsi produttivi hanno evidenziato che l'adozione di semine tardive (PR), ha portato a una significativa riduzione media (-20%) della produzione per entrambi gli ibridi a confronto, rispetto ai percorsi produttivi caratterizzati da semine ordinarie.

A parità di epoca di semina, il trattamento insetticida (PA) contro la piralide ha permesso di registrare vantaggi produttivi maggiori per l'ibrido più precoce (+6%) rispetto a quello più tardivo (+2,5%). L'investimento alla semina, la distanza dell'interfila e la concimazione azotata non hanno influenzato significativamente la produzione.

Un rilievo condotto su 8 aziende maidicole piemontesi ha permesso di calcolare i costi variabili sostenuti per le principali pratiche colturali; sulla base delle produzioni accertate nel corso della sperimentazione è stato possibile calcolare il reddito lordo attribuibile ai diversi percorsi produttivi a confronto (tab. 4). In relazione alla enorme volatilità dei prezzi della granella di mais, così come di altri cereali, si è ritenuto in questa sede più corretto esprimere i costi variabili, la produzione lorda vendibile (plv) e il reddito lordo in base a valori indice, fatto 100 il valore riferito al percorso produttivo attento (PA).

A un esame più approfondito (tab. 4) si può osservare che la determinazione degli scarti dai valori calcolati per il percorso produttivo più attento (PA) evidenzia che il percorso PM si discosta modestamente in presenza di resa minima, in modo più accentuato in presenza di resa massima e media. Il percorso PR manifesta un elevato scostamento, in presenza delle diverse rese produttive. Il percorso PC mostra il minore scostamento dai valori del percorso produttivo più attento (PA). Per quanto concerne il reddito lordo, si può osservare una dispersione dei percorsi PR, PM, PC rispetto a PA, piuttosto marcata, comunque più elevata rispetto alla plv. La resa massima ottenuta nel percorso produttivo meno attento (PR) minimizza lo scostamento dei valori

PERCORSO PRODUTTIVO	PR		PM		PC		PA
	N. INDICE	DEV. ST.	N. INDICE	DEV. ST.	N. INDICE	DEV. ST.	N. INDICE
con resa minima (8 t ha ⁻¹)							
costi variabili (€/ha)	113	9,3	94	4,5	92	5,6	100
plv (€/ha)	77	16,6	92	5,7	95	3,2	100
reddito lordo (€/ha)	55	31,7	91	6,4	98	1,8	100
con resa media (11 t ha ⁻¹)							
costi variabili (€/ha)	113	9,3	94	4,5	92	5,6	100
plv (€/ha)	77	16,5	89	7,7	93	4,6	100
reddito lordo (€/ha)	61	27,5	87	9,1	94	4,2	100
con resa massima (14 t ha ⁻¹)							
costi variabili (€/ha)	113	9,3	94	4,5	92	5,6	100
plv (€/ha)	79	15,0	79	15,0	90	7,1	100
reddito lordo (€/ha)	68	22,7	74	18,3	89	7,5	100
Fonti: dati aziendali direttamente rilevati in areali maidicoli piemontesi (2007); prezzo medio secondo semestre 2007 Associazione Granaria di Milano per mais nazionale.							

Tab. 4 Risultato economico per i diversi percorsi produttivi a confronto

da quelli del percorso più attento (PA). Con la messa in atto del percorso produttivo meno accurato (PR), da quanto sopra si desume che se le condizioni esterne permettono il raggiungimento di rese ottimali, ciò compensa almeno in parte i maggiori costi colturali. Ciò si può anche osservare dalla diminuzione del valore della deviazione standard. Se invece le condizioni ambientali si manifestano in modo sfavorevole, la perdita di produzione penalizza ulteriormente il risultato economico, già eroso dai maggiori costi colturali. Per contro il percorso produttivo più attento (PC) mostra invece una limitata dispersione dei valori, indipendentemente dalle rese ottenute. Da questo esame si conferma che la scelta di un percorso produttivo attento (PA) non è assolutamente in contrasto con la redditività della coltura; semmai è l'adozione di pratiche poco attente quali quelle seguite nei percorsi PR e PM che determina un reddito lordo apprezzabilmente inferiore.

CONCLUSIONI

In questa ricerca le pratiche colturali hanno confermato di svolgere un ruolo di notevole rilevanza nel ridurre le contaminazioni delle principali micotossine del mais. In relazione alla diversa ecologia dei funghi tossigeni (*F. verticillioides*, *F. graminearum*, *A. flavus*) i diversi percorsi produttivi a confronto non

hanno permesso di ridurre le contaminazioni in misura simile. In particolare per il contenimento delle fumonisine sono risultati determinanti la semina tempestiva e la lotta alla seconda generazione della piralide (PA), quando per il controllo del DON appare necessario prestare la massima attenzione al ciclo dell'ibrido e alla data di semina che devono essere rispettivamente medio o medio-precoco e tempestiva nell'esecuzione.

Per quanto attiene la contaminazione da aflatoossina i dati offrono solo delle risposte indirette, perché le diverse tesi sperimentali, create a livello di località, anni, ibridi, investimenti, concimazioni, trattamenti, epoche di semina e modalità irrigue non sono state in grado di generare contaminazioni significative per questa micotossina.

Tuttavia, in generale, se *Aspergillus flavus* riesce a penetrare all'interno dei tessuti riproduttivi, secondo le vie sopra ricordate, è ragionevole ritenere che la permanenza in campo dell'ibrido comporterebbe aumento di AFB1, perché le condizioni di temperatura e umidità esterne e interne la pianta sono estremamente favorevoli allo sviluppo del fungo, così come si evidenzerebbe che tanto è più precoce è l'infezione, quanto più grave è la contaminazione.

Considerando che per produrre un mais sano, adatto alle crescenti esigenze del mercato, occorre prevenire per via agronomica l'insieme delle più frequenti tossine, è opportuno sintetizzare in uno schema la diversa efficacia dei percorsi produttivi confrontati (tab. 5).

Dall'esame dello schema si evidenzia che il percorso indicato come rischioso (PR) si conferma quello potenzialmente più soggetto a contaminazioni anche incrociate di micotossine e che aggiungendo progressivamente pratiche colturali più attente nel complesso la probabilità di incorrere in contaminazioni elevate si riduce. Le risultanze di questa ricerca sottolineano quindi che è possibile contrastare lo sviluppo di più funghi tossigeni, sebbene non con uguale efficacia, adottando percorsi produttivi attenti.

Occorre considerare che anche seguendo un percorso produttivo attento,

	PR		PM		PC		PA	
	PRECOCE	MEDIO-TARDIVO	PRECOCE	MEDIO-TARDIVO	PRECOCE	MEDIO-TARDIVO	PRECOCE	MEDIO-TARDIVO
Fumonisine	++	+	+++	+++	+++	+++	++++	++++
DON	+++	+	+++	++	+++	+++	++++	+++
Aflatoossine	(++)	(+++)	(+++)	(++++)	(+++)	(++++)	(+++)	(++++)

Tab. 5 Azione preventiva esercitata dai diversi percorsi produttivi e dalla precocità dell'ibrido. Al crescere del numero di crocette corrisponde un'azione preventiva progressivamente più efficace (le azioni preventive riferite alla aflatoossine sono entro parentesi perché richiedono ulteriori conferme)

non è sempre possibile conseguire una contaminazione in linea con le attese, perché i principali fattori ambientali non sono controllabili e alcuni genotipi presentano una maggiore sensibilità alle muffe; inoltre è opportuno ricordare che i metodi preventivi non incidono direttamente sulla causa primaria, ovvero sull'inoculo del fungo tossigeno. Ciò nondimeno, per tutte le micotossine esaminate si sono riscontrate concentrazioni medie in linea con quelle delle normative comunitarie (Reg. 1881/06/CE; Reg. 1126/07/CE) adottando le pratiche colturali più attente.

RIASSUNTO

La presenza delle micotossine nei cereali è un problema economico e sanitario. Tali sostanze sono principalmente prodotte in campo e sono influenzate dalle condizioni ambientali durante la maturazione e dalle tecniche agronomiche. Lo scopo di questo contributo è quello di confrontare l'effetto di diversi percorsi produttivi sulla contaminazione da fumonisine, deossinivalenolo e aflatossine nella granella di mais. Dal 2005 al 2007, 2 ibridi con diversa precocità e 4 combinazioni di pratiche agronomiche (epoca di semina, densità colturale, fertilizzazione N e controllo della piralide), sono stati messi a confronto. La riduzione del contenuto di fumonisine può essere ottenuta principalmente con un trattamento insetticida contro la piralide del mais e con una semina tempestiva. Il contenuto di questa micotossina è risultato meno influenzato dalla fertilizzazione azotata, dall'investimento colturale o dalla maturità dell'ibrido. La presenza di DON è principalmente correlata allo spostamento della fase di maturazione della coltura nel periodo più fresco autunnale. Sono quindi da evitare soprattutto semine e raccolte tardive, impiego di ibridi a ciclo lungo, alti investimenti o apporti azotati. Il trattamento insetticida non ha ridotto la presenza di questa tossina. Le aflatossine sono state ritrovate solo nella località più calda e con l'ibrido più precoce, risultando favorite da stress idrici.

I dati di questa sperimentazione sottolineano come l'applicazione di Buone Pratiche Agricole può condurre efficacemente a un buon controllo delle principali micotossine da *Fusarium*.

ABSTRACT

The presence of mycotoxins in cereals is an economic and safety problems of great concern. Such toxins are principally produced in field and are influenced by both environmental conditions and agricultural inputs during growth and maturation of the maize plant. The aim of this research was to evaluate the effect of several crop management techniques on fumonisins, DON and aflatoxins contamination in maize kernels. Experiments were conducted in Northern Italy during 2006 and 2007 using two maize hybrids with different precocity. Factors evaluated were seed planting time (March versus May), plant density (65,000 plants versus 80,000 plants per ha), N fertilization (200 kg N versus 400 kg N per ha), and chemical treatment to control European maize borer (ECB).

The reduction of fumonisins could be principally achieved by the chemical treatment

to control European maize borer and an early planting time. These toxins were partially influenced by plant density, N fertilization and hybrid.

DON contamination was influenced mainly by the length of the kernel ripeness; thus a reduction of this toxin was obtained with an early planting time, an early maturing hybrid a low plant density and a low N fertilization.

Aflatoxins were infrequently found and were positively influenced by the plant stress.

This study clearly underlines that the application of good agricultural practices (GAP) in crop management strategies can effectively control fumonisin contamination of maize kernels.

BIBLIOGRAFIA

- AA.VV. (2004): *Impiego di tecniche agronomiche per contenere le micotossine nella granella di mais*, «L'Informatore Agrario», 60 (6), pp. 45-50.
- AA.VV. (2005): *La diffusione delle micotossine nelle produzioni italiane di mais*, «L'Informatore Agrario», 61 (10), pp. 47-51.
- BATTILANI P., SCANDOLARA A., BARBANO A., PIETRI A., PERTUZZI T., MAROCCO A., BERRARDO N., VANNOZZI G.P., BALDINI M., MIELE S., SALERA E., MAGGIORE T. (2005): *Monitoraggio della contaminazione da micotossine in mais*, «L'Informatore Agrario», 61 (6), pp. 47-49.
- BLANDINO M., REYNERI R., SALADINI M., VANARA F. (2008): *Effect of insecticide application against the European corn borer (Ostrinia nubilalis) on Fusarium verticillioides control and on fumonisin contamination*, in Proceedings of X International Fusarium and Fusarium Genomics Workshop 2008 Alghero (Italy), August 30-September 2, «Journal of Plant Pathology», 90 (3, Supplement), p. 71.
- DOOHAN F.M., BRENNAN J., COOKE B.M. (2003): *Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals*, «Eur. J. Plant Path.», 109, pp. 755-768.
- GILBERT J., SHARMAN M., PATEL S., BOENKE A., WAGSTAFFE P.J. (1992): *Deoxynivalenol in wheat and maize flour reference materials. 2. Preparation and certification*, «Food Additives and Contaminants», 9, pp. 119-135.
- ESKOLA M., PARIKKA P., RIZZO A. (2001): *Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and Fusarium infection in Finnish cereal samples in 1998*, «Food Additives and Contaminants», 18, pp. 707-718.
- MAIORANO A., BLANDINO M., REYNERI A., VANARA F. (2008): *Effects of maize residues on the Fusarium spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain*, «Crop Protection», 27, pp. 182-188.
- MUNKVOLD G.P. (2003): *Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears*, «Eur. J. Plant Path.», 109, pp. 705-713.
- PIETRI A., ZANETTI M., BERTUZZI T.: *Distribution of aflatoxins and fumonisins in dry-milled maize fractions*, «Food Additives and Contaminants», in stampa.
- REYNERI A., BLANDINO M., FERRERO C., BERSANI L. (2002): *Effetto delle operazioni di post-raccolta sulla contaminazione da micotossine nel mais*, «Tecnica Molitoria», 10, pp. 977-994.
- REYNERI A., BLANDINO M., VANARA F., MAIORANO A. (2005): *Fattori agronomici che influenzano la produzione di micotossine*, «Informatore Fitopatologico», 3, pp. 3-10.

- STROKA J., VON HOLST C., ANKLAM E. (2003): *Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B₁ in cattle feed: collaborative study*, «Journal of AOAC», 86, 6, pp. 1179-1186.
- VISCONTI A., SOLFRIZZO M., GIROLAMO A. DE (2001): *Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study*, «Journal of AOAC International», 84, pp. 1828-1837.

Micotossine: fattore limitante nelle produzioni animali

PREMESSA

Le micotossine sono metaboliti secondari, prodotti da numerose specie fungine capaci di colonizzare gli alimenti destinati al consumo umano e animale, sia in campo che durante il trasporto e lo stoccaggio delle derrate alimentari (Payne et al., 1988; Scheidegger e Payne, 2003). Mentre i metaboliti primari sono considerati composti essenziali per la crescita, i metaboliti secondari sono normalmente prodotti dagli organismi come conseguenza delle relazioni che essi creano con l'ambiente esterno (CAST, 2003; Santin, 2005). Le condizioni nelle quali tali metaboliti vengono prodotti non sono ancora ben definite, tuttavia sembra che gli stress ambientali, come cambiamenti repentini e traumatici della temperatura, dell'umidità, della aerazione o la presenza di agenti inibitori la crescita del fungo favoriscano la produzione di tali sostanze (Giorni et al., 2007).

Le micotossine rappresentano una diversificata gamma di sostanze, non costituiscono una classe chimica ben definita e sono caratterizzate dall'avere strutture fra loro molto diverse. Infatti, mentre il metabolismo primario è fondamentalmente lo stesso per tutti gli esseri viventi, quello secondario dipende dalla specie e, talvolta, dal particolare ceppo fungino. Da ciò la grande diversità di molecole prodotte (CAST, 2003).

La formazione di micotossine è strettamente connessa alla crescita del fungo; queste sostanze vengono prodotte a ogni latitudine e in ogni tipo di clima. A oggi la loro diffusione viene considerata un problema mondiale, tanto che la FAO stima che circa il 25% dei cereali prodotti nel mondo siano contaminati da una o più famiglie di micotossine.

* *Istituto di Scienze degli alimenti e della nutrizione, Facoltà di Agraria UCSC, Piacenza*

MICOTOSSINE	PRODOTTI ALIMENTARI REGOLAMENTO CE N. 1881/2006 E 1126/2007		TENORI MASSIMI µg/KG
Aflatossine	AFB ₁	Arachidi da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico	8,0
		Frutta a guscio da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico	5,0
		Frutta secca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico	5,0
		Arachidi, frutta a guscio, frutta secca e relativi prodotti di trasformazione	2,0
		Tutti i cereali e loro prodotti derivati	2,0
	AFM1	Latte crudo (6), latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	0,050
Tricoteceni	DON	Cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granturco	1250
		Grano duro e avena non trasformati	1750
		Granturco non trasformato, a eccezione di quello destinato alla molitura a umido	1750
		Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe	750
		Pasta (secca)	750
		Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500
		Alimenti a base di cereali trasformati e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
Zearalenone	ZEA	Cereali non trasformati diversi dal granturco	100
		Granturco non trasformato	350
		Cereali destinati al consumo umano diretto	75
		Pane (compresi i piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione, esclusi le merende a base di granturco e i cereali da colazione a base di granturco	50
		Granturco destinato al consumo umano diretto, merende a base di granturco e cereali da colazione a base di granturco	100
		Alimenti a base di cereali trasformati (esclusi quelli a base di granturco) e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	20
		Alimenti a base di granturco trasformato destinati ai lattanti e ai bambini	20
Tossine T-2, HT-2	T-2 + HT-2	Cereali non trasformati e prodotti a base di cereali	Non fissato
Fumonisine	FB ₁ + FB ₂	Granturco non trasformato, a eccezione di quello destinato alla molitura a umido	4000
		Granturco destinato al consumo umano diretto, prodotti a base di granturco destinato al consumo umano diretto, a eccezione dei successivi:	1000
		Cereali da colazione e merende a base di granturco	800
		Alimenti a base di granturco trasformato e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	400

Ocratossina A	OTA	Cereali non trasformati Tutti i prodotti derivati dai cereali non trasformati Caffè torrefatto in grani e caffè torrefatto macinato Vini Uve essiccate	5,0 3,0 5,0 2,0 10,0
MICOTOSSINE	PRODOTTI DESTINATI ALL'ALIMENTAZIONE ANIMALE (DIRETTIVA CE N. 100/2003)		TENORI MASSIMI MG/KG
Aflatossina	AFB1	Tutte le materie prime per mangimi Mangimi completi per bovini, ovini e caprini, a eccezione di: – mangimi completi per animali da latte – mangimi completi per vitelli e agnelli Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani) Altri mangimi completi Mangimi complementari per bovini, ovini e caprini, suini e pollame Altri mangimi complementari	0,02 0,02 0,005 0,01 0,02 0,01 0,02 0,005
MICOTOSSINE	PRODOTTI DESTINATI ALL'ALIMENTAZIONE ANIMALE (RACCOMANDAZIONE CE N. 576/ 2006)		TENORI MASSIMI MG/KG
Tricoteceni	DON	Materie prime per mangimi – Cereali e prodotti a base di cereali fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco – Sottoprodotti del granoturco Mangimi complementari e completi, a eccezione di: – mangimi complementari e completi per suini – mangimi complementari e completi per vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti	8 12 5 0,9 2
Zearalenone	ZEA	Materie prime per mangimi – Cereali e prodotti a base di cereali fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco – Sottoprodotti del granoturco Mangimi complementari e completi – Mangimi complementari e completi per suinetti e scrofe (giovani scrofe) – Mangimi complementari e completi per scrofe e suini da ingrasso – Mangimi complementari e completi per vitelli, bovini da latte, ovini (inclusi agnelli) e caprini (inclusi capretti)	2 3 0,1 0,25 0,5
Ocratossina A	OTA	Materie prime per mangimi – Cereali e prodotti a base di cereali Mangimi complementari e completi – Mangimi complementari e completi per suini – Mangimi complementari e completi per pollame	0,25 0,05 0,1
Fumonisine	FB ₁ + FB ₂	Materie prime per mangimi – Granoturco e prodotti derivati Mangimi complementari e completi per: – suini, equini (Equidi), conigli e animali da compagnia – pesci – pollame, vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti – ruminanti adulti (> 4 mesi) e visoni	60 5 10 20 50

Tab. 1 Tenori massimi (ammessi e raccomandati) di alcune micotossine nei prodotti alimentari e nei mangimi

Le micotossine, per le proprietà tossiche e immunodepressive di cui sono dotate, hanno effetti negativi sulla salute degli animali da reddito: possono ridurre le performance produttive e alterare il metabolismo (Smith et al., 2005), causando ingenti perdite economiche. Secondo la Food and Drug Administration (FDA), le perdite economiche dovute all'effetto che le micotossine hanno sull'intero comparto agricolo americano ammonterebbero a circa \$932 milioni/anno (CAST, 2003), di cui \$9 milioni/anno sarebbero legate alla riduzione delle performance produttive degli animali che ingeriscono tali sostanze. La FAO ha stimato che, su scala mondiale, le perdite dovute alle micotossine nel solo comparto avicolo, che rappresenta all'interno del settore zootecnico uno dei più colpiti, sarebbero superiori ai \$100 milioni/anno (Devegowda and Murthy, 2005).

Dati gli ingenti danni economici e il rischio per la salute pubblica, molte nazioni (più di 100 nel mondo) hanno regolamentato i limiti massimi di micotossine consentiti per gli alimenti a uso umano e zootecnico. In particolare, la Comunità Europea ha recentemente emanato una serie di documenti (Direttiva CE n. 100/2003, Raccomandazione CE n. 576/2006, Regolamento CE n. 1881/2006 e 1126/2007) atti a regolamentare i livelli massimi di micotossine in alimenti destinati al consumo umano e animale (tab. 1). L'Italia, con il decreto del Ministero della Salute del 15 maggio 2006 (GURI 120 del 25.5.2006), ha anticipato, rendendolo ufficiale, quanto raccomandato dalla CE, circa i livelli massimi di OTA nei mangimi. Anche l'EFSA fra il 2004 e il 2007 ha intensificato la sua attività sull'argomento "micotossine e rischio per la salute pubblica", con una serie di pareri che hanno come argomento le principali classi di micotossine e le ricadute che esse possono avere in modo diretto o indiretto sulla salute umana. In particolare i pareri di EFSA hanno riguardato aflatossine (EFSA-Q-2006-174, 2007); fumonisine (EFSA-Q-2003-040, 2005); deossinivalenolo (EFSA-Q-2003-036, 2004); zearalenone (EFSA-Q-2003-037, 2004) e ocratossina (EFSA-Q-2003-037, 2006).

Anche se sono state classificate circa 1100 specie di funghi capaci di produrre più di 2000 micotossine diverse (Turner and Alderidge, 1983; CAST, 2003), i principali generi di miceti micotossigeni sono *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Le micotossine prodotte da questi funghi vengono classificate in base alla struttura chimica, alle proprietà tossiche e cancerogene che le caratterizzano e al genere di funghi che le producono. Le principali classi di micotossine sono: le aflatossine (AF), ocratossina A (OTA), tricoteceni (tossina T-2, tossina HT-2, diacetossiscirpenolo o DAS, deossinivalenolo o DON, nivalenolo o NIV), zearalenone (ZEA), moniliformina (MON) e fumonisine (FB₁ e FB₂).

Quando ingerite dagli organismi superiori, le micotossine possono deter-

minare effetti cronici, sub-cronici e acuti (Galvano et al., 2001). Le manifestazioni cliniche conclamate sono evidenti solo quando il livello è prossimo a quello necessario a indurre situazioni di tossicità acuta. Infatti, uno dei principi fondamentali della tossicologia, legato al rapporto dose-risposta, è difficilmente verificabile nelle micotossicosi. Più frequentemente, la manifestazione degli effetti negativi dovuti alla presenza di micotossine è tardiva e può evidenziarsi anche dopo che è stata sospesa la somministrazione dell'alimento contaminato. In questo modo il rapporto causa:effetto non è facilmente individuabile e verificabile.

Ecco una sintesi degli effetti delle principali famiglie di micotossine:

- *aflatossine* e in modo particolare l' AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 e l' AFG_2 , sono potenti epatotossici. Molti animali esposti a queste micotossine riportano danni epatici e riduzione delle difese immunitarie, risultando più esposti a vari agenti patogeni. Le aflatossine vengono convertite nel fegato in metaboliti più solubili, come l' AFM_1 , che vengono escreti nel latte (oltre che nelle urine) di animali in lattazione (Galvano et al., 1998) e questo rappresenta un importante aspetto nella gestione degli allevamenti di vacche, capre e pecore. Suini e polli che ingeriscono alimenti contaminati da AF riducono le performance produttive e sono affetti da un aumento della morbidità;
- *tricoteceni*: sono potenti inibitori della sintesi di proteine. In particolare, il DON è considerato il tricotecene che più frequentemente causa problemi agli animali, che vanno dall'inappetenza, al rifiuto dell'alimento, al vomito, alla minore resistenza alle malattie. I suini sono considerati particolarmente sensibili al DON, mentre i ruminanti sembrano essere più resistenti;
- *ocratossina A* è una micotossina nefrotossica e immunodepressiva. Gli animali che ingeriscono questa molecola mostrano una minore capacità di accrescimento o di produzione di latte e uova;
- *zealalenone*: ha effetti estrogenici e causa edemi alla vulva, vulvovaginiti, edema all'utero, cisti ovariche, aumento della velocità di maturazione dei follicoli, aborti e turbe al sistema riproduttivo degli animali. Nei maschi causa una cattiva formazione degli spermatozoi e una riduzione della fertilità;
- *fumonisine*: sono dotate di attività immunodepressiva. La FB_1 inibisce la ceramide-sintetasi nella biosintesi delle sfingomieline e questo giustifica molti dei suoi effetti tossici. Per questo motivo nei maiali che ricevono FB_1 vi è un marcato aumento della sfinganina e della sfingosina in tutti i tessuti con lesioni (polmone, fegato) o senza lesioni (rene, pancreas). La tossicità della FB_1 è stata studiata, mettendo in evidenza che il primo sintomo è la riduzione di assunzione dell'alimento.

Prima di analizzare i principali effetti dell'ingestione delle micotossine nei diversi allevamenti zootecnici (avicoli, suini e ruminanti), occorre sottolineare che la presenza di micotossine negli alimenti vegetali utilizzati dagli animali, solo raramente si caratterizza per valori elevati. Più frequentemente le micotossine vengono riscontrate a livelli inferiori rispetto agli specifici limiti di legge. Questo fatto non ne riduce le potenzialità negative, in quanto l'esposizione continuata può causare alterazioni dello stato metabolico con conseguenti peggioramenti delle *performance* produttive (peso vivo, peso delle carcasse, produzione di uova e produzione di latte) apparentemente immotivati, aumento degli oneri da trattamenti farmacologici, provocando ingenti perdite economiche (Smith et al., 2005). A ogni modo, il rispetto dei limiti imposti o raccomandati dalla legislazione non dà garanzie sufficienti.

Hamilton (1984) nel suo articolo "Determining safe levels of mycotoxins" con lungimiranza affermava: «What are safe levels of mycotoxins? (...) Unfortunately, this question has been poorly investigated. The main reason for this inactivity have been that we have taken refuge in regulatory guidelines promulgated to satisfy legal requirements rather than scientific requirements and that, in consequence, we have abdicated our responsibility» così lo stesso autore afferma «There is no safe level for mycotoxins» (graf. 1).

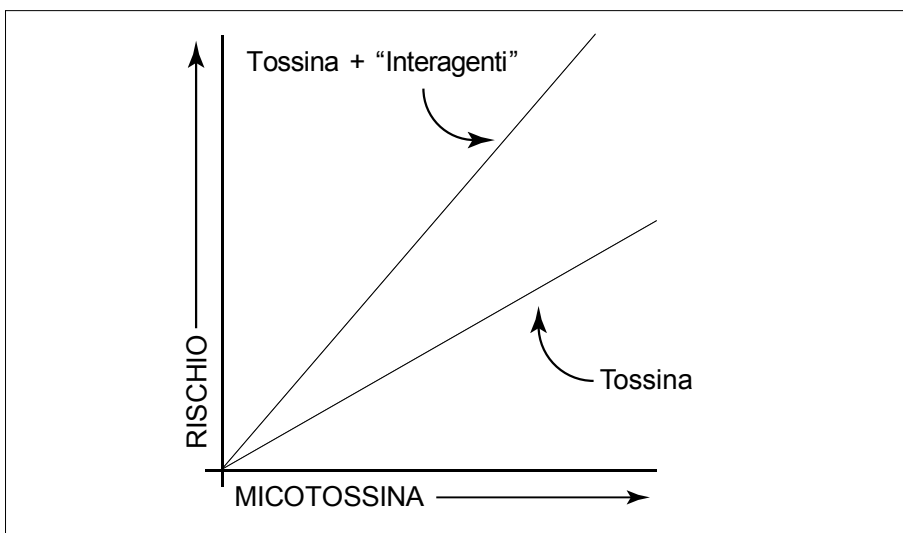
Inoltre, un altro aspetto poco conosciuto riguarda la concomitante presenza di più micotossine nello stesso alimento, fenomeno particolarmente diffuso in natura, che può causare l'insorgenza di un effetto sinergico, che amplifica l'effetto negativo sugli organismi superiori che la singola micotossina avrebbe se assunta da sola (tab. 2).

Alla luce di queste considerazioni, l'affermazione di Hamilton (1984) «There is no safe level for mycotoxins» è chiaramente rappresentata dal grafico (graf. 1) dal quale risulta che «The prudent person will probably assume that any level carries a risk».

Un ulteriore problema è rappresentato dalle micotossine coniugate, dette

MICOTOSSINE	SPECIE TESTATA	EFFETTO SINERGICO	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
AFB ₁ & OTA	Polli	Sinergico	Huff et al., 1992
AFB ₁ & OTA	Suini	Additivo	Harvey et al., 1989
AFB ₁ & T-2	Suini	Sinergico	Kubena et al., 1993
AFB ₁ & FB ₁	Suini	Sinergico	Harvey et al., 1995
DON & MON	Polli	Meno che Additivo	Harvey et al., 1997b
OTA & Citrina	Polli	Antagonista	Manning et al., 1985
AFB ₁ & MON	Polli	Meno che Additivo	Kubena et al., 1997

Tab. 2 *Effetto sinergico, additivo o antagonista associato alla somministrazione di due micotossine nei suini e nei polli*



Graf. 1 *Illustrazione di un approccio prudente riguardo i livelli di sicurezza legati al consumo di micotossine. Adattato da Hamilton (1984)*

anche “micotossine nascoste”, non rilevate con le comuni tecniche analitiche (Berthiller et al., 2004; Gareis et al., 1990). Ad esempio, le piante sono in grado di detossificare il DON, coniugando la tossina con glucosio a opera dell’enzima glicosil-transferasi (Poppenberger et al., 2003). La trasformazione della molecola del DON ne riduce la determinazione analitica. Anche lo ZEA può subire un processo di coniugazione che avviene a carico del β -D-glucopiranoside e a opera del fungo *Rhizopus spp.* (Kamimura, 1986). Quando il complesso viene ingerito dagli animali, il legame viene sciolto rendendo disponibile la tossina “madre” (Gareis et al., 1990).

MICOTOSSINE E ALLEVAMENTO AVICOLO

L’allevamento avicolo è sicuramente quello più sensibile alle riduzioni di *performance* dovute all’ingestione di micotossine. Non è infatti un caso che la moderna micotossicologia, intesa come scienza che studia gli effetti che le micotossine hanno sulla salute di uomini e animali, sia nata come conseguenza di quella che negli anni ’60 è stata chiamata la malattia X dei tacchini, che decimò la popolazione di questa specie di interesse zootecnico in Inghilterra.

Fra le micotossine più studiate e che più frequentemente causano perdite economiche nel comparto avicolo, vi sono le aflatossine. Anche se esse non

sono considerate un problema alle nostre latitudini, potrebbero diventarlo per i cambiamenti climatici in atto. Particolare attenzione deve essere riservata agli alimenti che provengono da zone a clima più caldo. Le principali perdite economiche associate all'ingestione di AF includono riduzione della crescita e della produzione di uova, aumento della mortalità e possibile, anche se trascurabile, contaminazione delle carcasse, nonché aumento della suscettibilità alle malattie (Devegowda and Murthy, 2005). Anche la qualità delle carni prodotte subisce un peggioramento, dovuto alla riduzione nella produzione di protrombina. I tacchini sono la specie più suscettibile alle aflatossine, mentre meno sensibili sono i broilers e le galline ovaiole. I segni clinici con cui l'aflatossicosi si manifesta riguardano anoressia, riduzione delle *performance* produttive, tipiche emorragie viscerali e tossicità embrionale. Inoltre, le aflatossine sono in grado di interferire con la digestione degli alimenti e il metabolismo degli avicoli. La suscettibilità alle AF sembra essere legata anche al sesso e, soprattutto, all'età degli animali: gli individui più giovani sono quelli dove più gravi sono gli effetti di queste tossine.

Circa tre volte più tossica delle aflatossine è l'ocratossina A, soprattutto negli individui più giovani (Huff et al., 1984). L'OTA, normalmente considerata una micotossina che si sviluppa nelle condizioni di stoccaggio degli alimenti, ha caratteristiche nefrotossiche e causa stress ossidativi (Costa et al., 2008). L'ingestione di alimenti contaminati negli avicoli causa perdita di peso, dell'efficienza alimentare e della produzione di uova. Aravind et al. (2003) riportano un aumento dell'attività epatica (GGT +39%), riduzione delle proteine plasmatiche (-16%) e dell'ematocrito (-11%). Particolarmente sensibili all'ingestione di OTA, oltre agli individui più giovani, sembrano essere i tacchini. Hamilton et al. (1986) hanno riscontrato indici di mortalità molto elevati in un allevamento di tacchini durante un'ocratossicosi. L'OTA ha inoltre un effetto diretto sui linfonodi che, riducendo l'immunità cellulare negli avicoli, aumenta la suscettibilità alle malattie. Il problema dell'OTA sembra essere particolarmente sentito in Danimarca, dove Hohler (1999) ha dimostrato che il 40% degli alimenti destinati al consumo animale è contaminato da tale micotossina.

Dermatiti, lesioni della cavità orale e irritazioni della mucosa intestinale sono i principali sintomi dell'ingestione dei tricoteceni (tossine T-2 e HT-2, DAS, DON e NIV). Gli avicoli sembrano essere particolarmente suscettibili a due tipi di tricoteceni: tossina T-2 e DAS. Il principale effetto legato all'ingestione di tricoteceni negli avicoli è la riduzione dell'appetito, da qui il nome a questa classe di micotossine di "feed refusal toxins". Inoltre, dopo le aflatossine, i tricoteceni sono fra i principali immunosoppressori per gli avicoli. Essi causano una riduzione dell'immunità cellulare e hanno effetti diretti su linfo-

nodi, timo e mucosa intestinale. I principali sintomi dell'ingestione di alimenti contaminati da tossina T-2 negli avicoli sono le lesioni orali che si manifestano anche a dosaggi relativamente bassi (0,4 mg/kg).

Le fumonisine rappresentano la principale causa di malattie come la "spiking mortality" e la "sindrome degli alimenti tossici". I principali sintomi sono paralisi e diminuzione della crescita. I broilers e i tacchini sono relativamente resistenti agli effetti della FB₁, anche se nelle condizioni di campo occorrono ingestioni di 20 mg/kg di FB₁ nei primi 30 giorni di vita per causare un drastico aumento della mortalità.

La moniliformina (MON) causa effetti diretti sul sistema cardiovascolare, riducendo le *performance* e causando aumento della mortalità. L'ingestione di bassi livelli di MON può risultare in una riduzione della crescita degli animali, in disfunzioni epatiche con aumento del tenore ematico di piruvato, lesioni cardiache e peggioramento della risposta immunitaria.

Gli avicoli sembrano essere più resistenti allo zearalenone rispetto ad altre specie animali, come suini e bovini. Un'alta concentrazione di ZEA nella dieta, però, causa riduzione delle performance produttive anche negli avicoli. Inoltre, questa micotossina può essere trasferita nelle uova (Dailey et al., 1980), con implicazioni dirette sulla salute umana.

MICOTOSSINE E ALLEVAMENTO SUINO

L'allevamento suino, per la diffusione che esso ha nel panorama nazionale ed europeo e per il diffuso uso che si fa delle sue carni, è probabilmente uno dei comparti zootecnici dove maggiore è stata l'attenzione dei ricercatori riguardo le micotossicosi (Smith et al., 2005).

L'esposizione cronica all'AFB₁ (da 500 a 800 µg/kg) causa nei suini all'ingrasso e in fase di finissaggio (da 40 a 140 kg) riduzione della crescita in peso, dell'utilizzazione degli alimenti, della digestione dei lipidi e della funzionalità epatica e renale (Bonomi et al., 1992; Silvotti et al., 1995; Baldi et al., 2003). Secondo Linderman et al. (1993) l'ingestione di queste micotossine causa una minore sintesi proteica nei suini all'ingrasso, con riduzione delle proteine totali e delle albumine a livello plasmatico. Inoltre, durante la condizione di aflatossicosi, è stato segnalato un peggioramento del metabolismo del fegato (Guerra et al., 2005), documentato dall'aumento nel plasma di diversi indicatori della funzionalità epatica, come la γ -glutamyltransferasi e la fosfatasi alcalina (Schell et al., 1993). L'accumulo di metaboliti nelle carni di animali sottoposti a diete contaminate da AF non sembra rappresentare un grosso problema, in quando l'accumulo è modesto e di molto inferiore all'1%.

Come per le aflatossine, anche l'OTA viene considerata un grave problema per l'allevamento suino. L'ingestione di 2,5 mg/kg di OTA in giovani suini (15 kg) ha ridotto l'ingestione di alimento, l'efficienza di utilizzo dello stesso e, di conseguenza, il peso corporeo degli animali. Disfunzionalità epatiche e soprattutto renali, sono considerate una conseguenza dell'ingestione di OTA. Inoltre, tale micotossina comporta un peggioramento dei principali indici riproduttivi e una depressione del sistema immunitario, anche se i meccanismi non sono stati del tutto spiegati (Smith et al., 2005). Un pericolo diretto per la salute umana è rappresentato dalla possibile concentrazioni di OTA nelle carni di suini. Zanotti et al. (2001), campionando circa 160 salumi dal commercio, hanno dimostrato come il 56% dei campioni raccolti avevano una concentrazione di OTA superiore a 1 µg/kg. Pietri et al. (2006) hanno condotto un'indagine sulla contaminazione da OTA di carne suina fresca e conservata. Sono stati raccolti 22 campioni di carne fresca (rifilature di prosciutto) presso stabilimenti industriali e sono stati prelevati complessivamente 84 campioni di prosciutto crudo (n = 30), prosciutto cotto (n = 12), salame (n = 12), coppa (n = 18) e würstel (n = 12), in punti vendita dell'Emilia. La tossina è risultata presente nel 47% dei campioni, ma solo nel 24% sopra a 0,03 µg/kg. Alti livelli di OTA sono stati trovati solo in alcuni campioni di prosciutto crudo: in 5 (17%) di questi la contaminazione trovata ha superato il livello di 1,0 µg/kg e in 2 era superiore a 10 µg/kg.

La tossicosi da fumonisine nei suini è caratterizzata da sintomi polmonari, cardiovascolari ed epatici. Edema polmonare letale e idrotorace è stato osservato nei suini esposti a un alimento con più di 12 mg/kg di FB₁. Quando l'esposizione è durata per un periodo di 8 settimane, anche livelli di 1 mg/kg hanno prodotto proliferazione del tessuto connettivo polmonare. Quando i suini sono esposti alle fumonisine, essi manifestano anche un danno epatico, con necrosi epatica e colestasi. Gli animali affetti diventano anoressici; evidenziano segni di encefalopatia, perdono peso e mostrano iperplasia dei noduli epatici. Queste alterazioni sono accompagnate da variazioni dei parametri biochimici ematici. Le fumonisine non vengono accumulate nelle carni, perciò non ne modificano la qualità (Rotter et al., 1997). Quando le scrofe in lattazione ingeriscono fumonisine, non vengono eliminati metaboliti nel latte e perciò non si evidenziano effetti tossici sui suinetti. Tuttavia, scrofe in lattazione alimentate con diete contaminate da FB₁ hanno mostrato una riduzione della fertilità e peggioramenti nello sviluppo dei feti (Zomborsky-Kovacs et al., 2000).

Il nostro Istituto ha effettuato una prova di crescita, allevando per 35 giorni 128 suinetti del peso iniziale di circa 9 kg. Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi omogenei e alimentati con 4 diete identiche contenenti il 33% di mais. Per preparare le 4 diete sono state utilizzate 4 partite di mais (natural-

MAIS UTILIZZATO PER LA PREPARAZIONE DEI MANGIMI	CONCENTRAZIONE DI FB ₁ NEL MAIS (µG/KG)	INCREMENTO MEDIO GIORNALIERO G/DIE
1 – Bt	922	403
2 – Bt	5212	389
3 – non-Bt	6458	382
4 – non-Bt	13166	368

Tab. 3 *Effetto della fumonisina B₁ (FB₁) sull'incremento medio giornaliero dei suinetti (peso iniziale circa 9 kg) allevati per 35 giorni con un mangime contenente il 33% di mais (dati ISAN - UCSC)*

mente contaminato) che presentavano livelli di fumonisina rispettivamente di 922, 5212, 6458 e 13166 µg/kg; le partite con i due livelli più bassi erano di mais Bt, le altre due del corrispondente isogenico. In tabella 3 sono riportati gli incrementi medi giornalieri (in g/die) dei 4 gruppi di suinetti. Risultano evidenti le differenze di crescita dovute al livello di fumonisina; 35 g di differenza tra la prima e l'ultima tesi sperimentale comportano una minor crescita di 1225 g per animale nei 35 giorni di prova, con una perdita economica significativa.

La riduzione dell'ingestione è fatto abbastanza comune nel caso di alimenti contaminati da muffe, ma è particolarmente marcata quando associata alla presenza di tricoteceni. I principali tricoteceni sono la tossina T-2 e HT-2, il DAS, il NIV e, particolarmente diffuso, il DON. I tricoteceni sono dei potenti inibitori della sintesi proteica nei mammiferi e interferiscono con la sintesi del DNA e RNA (Smith et al., 2005). I segni clinici indotti dalla tossina T-2 e dal DAS comprendono irritazioni dermiche e orali, necrosi, gastroenteriti, vomito, diarrea, alterazione nei parametri della coagulazione, emorragie e riduzione dell'appetito. La tossina T-2 somministrata alle scrofe in gestazione ad alti dosaggi nelle settimane precedenti il parto determina una alta mortalità fetale. Il DON, invece, causa rifiuto parziale o totale dell'alimento. Alterazioni nei rapporti fra serotonina, dopamina e acido 5 idrossi-indolacetico (5-HIAA) a livello celebrale possono essere alla base del rifiuto del cibo: la somministrazione di 30 µg/kg di DON induce un aumento del 5-HIAA nel fluido cerebrospinale con conseguente aumento del turnover della serotonina (Prelusky et al. 1992). Inoltre, la presenza di DON determina un'alterazione del metabolismo proteico a livello epatico (inibizione della sintesi proteica), con aumento della aminoacidemia e soprattutto dei livelli di triptofano, che in maggior quantità giunge al cervello e aumenta la sintesi di serotonina (Smith, 1997). I tricoteceni sono rapidamente metabolizzati dall'organismo animale ed escreti. I residui non rappresentano in genere un problema pratico di contaminazione delle carni (CAST, 2003).

Lo ZEA e i suoi metaboliti sono dotati di specifiche attività estrogeno-simili. Particolarmente sensibile è la specie suina, nella quale determina evidenti manifestazioni estrali negli animali impuberi. Livelli di 1 mg/kg inducono tipici segni dell'estro in scrofette (Kordik et al., 1992). Situazioni di estro permanente, di pseudo-gravidanza e di conseguente infertilità sono rilevabili anche a livelli più bassi di contaminazione, quali 20 µg/kg di alimento o meno. La riduzione delle *performance* riproduttive si manifesta anche a causa dell'aumento di prolassi vaginali e rettali, vulvovaginiti, edema dell'utero, cisti ovariche, aumento della velocità di maturazione dei follicoli, mentre nei verri si ha degenerazione degli epiteli germinali e alterata formazione di sperma. Lo ZEA è metabolizzato rapidamente e non è determinabile di norma nei fluidi biologici o nella carne (Kordik et al., 1992).

MICOTOSSINE E RUMINANTI

I ruminanti sono dotati di un ampio comparto digestivo, che permette loro di avere una minore suscettibilità verso le micotossine. In particolare, il sistema rumino-reticolare e la sua popolazione microbica, formata da protozoi, batteri e lieviti, giocano un ruolo fondamentale nel controllare lo sviluppo di patogeni e sono coinvolti nel metabolismo delle micotossine (McIntosh et al., 2001). Per questo i ruminanti vengono considerati più "resistenti" degli avicoli e dei suini alle micotossine (McIntosh et al., 2002; Cheeke and Palo, 1995; Yiannikouris & Jouany, 2002). In ogni caso, i metaboliti che vengono prodotti a livello ruminale possono essere caratterizzati da proprietà tossiche e cancerogene simili o addirittura maggiori delle "molecole madri", diversificando le dinamiche di metabolizzazione delle tossine e i meccanismi con i quali queste tossine esplicano i loro effetti negativi per la salute degli animali.

Le AF vengono trasformate a livello ruminale in metaboliti come l'aflatossicolo. Alcuni autori hanno trovato che circa il 42% dell'AFB₁ viene convertita in aflatossicolo *in vitro* (Engel e Hagemeister, 1978). La formazione di aflatossicolo non rappresenta una vera e propria detossificazione della molecola madre, in quanto la tossicità e la cancerogenicità delle due molecole sono simili. Da questo possiamo trarre l'informazione che il ruminale risulta poco efficiente nel proteggere i ruminanti dalle AF.

Un altro aspetto che riflette una bassa efficienza di detossificazione del ruminale è legato al rapido assorbimento delle aflatossine attraverso le mucose del tratto gastro-intestinale dei ruminanti. Prove condotte nel nostro Istituto (Moschini et al., 2007; Gallo et al., 2008) hanno evidenziato come le aflatossine madri (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) e i loro metaboliti (principalmente

l'AFM₁), compaiono nel plasma dopo appena 5 minuti dalla somministrazione di alimenti contaminati. La rapidità con la quale avviene l'assorbimento e la loro metabolizzazione, sembra essere legata a un passaggio delle molecole che si verifica prima dell'intestino, già a livello della bocca, dell'esofago e, successivamente, del rumine (Gallo et al., 2008).

L'aflatossicosi nei ruminanti causa lesioni epatiche, accumulo di acidi grassi nel fegato, reni e cuore e può causare encefalopatie ed edemi (CAST, 2003). In condizioni di pieno campo, inoltre, l'ingestione di AFB₁ da parte di vacche da latte può comportare una riduzione delle *performance* produttive degli animali e della capacità di degradare la sostanza organica assunta con la dieta, (Jouany & Diaz, 2005). Guthrie (1979) ha determinato anche effetti negativi riscontrabili sulle *performance* riproduttive. Inoltre, l'AFB₁ sotto forma del suo principale metabolita idrossilato, l'AFM₁, viene escreta nel latte degli animali in lattazione (Galvano et al., 1998; Masoero et al., 2007). Il tasso con cui tale passaggio avviene, comunemente definito *carry-over*, varia con l'animale, con la specie, con la fase di lattazione e con il livello produttivo (Veldman et al., 1992; Masoero et al., 2007). Nelle vacche da latte con una produzione media di 30 litri di latte al giorno il valore di *carry-over* medio è circa il 3%, anche se studi condotti da Masoero et al. (2007), hanno messo in evidenza come tale valore può variare da un minimo di 0,1% a valori massimi di 5,8%, principalmente in relazione al livello produttivo; più le *performance* dell'animale sono alte più il *carry-over* assumerà valori vicini al limite massimo dell'intervallo.

Le vacche e le pecore sembrano essere gli animali con un'escrezione maggiore, mentre le capre e le bufale hanno un *carry-over* circa 10 volte più basso.

La contaminazione diretta del latte e indiretta dei prodotti che da esso derivano (Pietri et al., 1997, 2003) rappresenta forse il principale problema associato all'ingestione di AF nei ruminanti. Infatti, la quantità di micotossina ingerita che causa effetti sulle *performance* produttive e la salute degli animali è molto più alta rispetto a quella associata con l'escrezione di residui tossici nel latte.

In questi ultimi anni sono state condotte indagini sulla qualità micotossicologica del mais prodotto in nord Italia (Pietri et al., 2004). In generale, dall'insieme dei dati emerge che quando l'andamento stagionale (soprattutto all'epoca del raccolto) è caratterizzato da un clima temperato, umido e piovoso (es. 1996 in nord Italia), prevale una contaminazione da zearalenone e tricoteceni (soprattutto DON), in quanto vengono favoriti funghi quali *F. graminearum* e *F. culmorum*; con un clima più caldo e secco (es. le ultime annate), prevalgono i funghi produttori di fumonisine (*F. verticillioides* e altri), favoriti anche da forti attacchi di insetti (soprattutto dalla piralide) alle piante; in

questo ultimo caso è possibile anche una contaminazione diffusa (anche se in genere quantitativamente modesta) da aflatossine. Quando il clima è particolarmente caldo e siccitoso, come nell'estate 2003, la contaminazione da aflatossine può diventare rilevante. Il mais è un componente importante delle razioni per le bovine in lattazione; il mais contaminato da aflatossine prodotto nell'estate 2003, ha causato notevoli problemi nel comparto lattiero-caseario nel periodo ottobre 2003-settembre 2004, dato che il latte di molte aziende agricole presentava talvolta valori di AFM_1 superiori al limite comunitario (solo in Lombardia sono state eliminate oltre 7000 tonnellate di latte, con rilevanti danni economici) (Piva et al., 2006).

Diverse sono le tecniche che possono essere messe in campo per ridurre gli effetti dovuti alle micotossine. Uno dei metodi più diffusi nelle nostre stalle da latte è rappresentato dall'impiego di agenti adsorbenti (Masoero et al., 2008; Galvano et al., 2001), utilizzati principalmente per evitare concentrazioni di AFM_1 nel latte al di sopra dei limiti imposti dalla comunità europea (tab. 1). Gli adsorbenti appartengono a diverse categorie: argille, carboni attivi, pareti di lievito, clorofille, porfirine ecc. La classe di adsorbenti più utilizzata negli allevamenti è quella dei silicati, detti anche argille. Fra queste molto utilizzate sono le bentoniti/montmorilloniti, le caoliniti, le illiti e le zeoliti (Diaz e Smith, 2005). Dotate di capacità di scambio ionico, esse sono in grado di catturare la molecola della micotossina, intrappolarla nelle maglie della struttura a foglietto tipica delle argille e legarla con diversi legami chimici (legami idrogeno, forze di Van der Waals e interazioni elettrostatiche). Somministrate agli animali con la dieta, hanno la capacità di sequestrare le micotossine favorendone l'eliminazione con le feci. In questo modo viene ridotta la quantità di micotossina assorbita dagli animali ed escreta con il latte come AFM_1 .

Masoero et al. (2008) hanno ottenuto una riduzione pari al 65% nella concentrazione nel latte di AFM_1 in vacche alla cui dieta veniva aggiunto un agente sequestrante argilloso, appartenente alla categoria delle Mg-bentoniti (ATOX®, Grupo Tolsa, Madrid, Spain), rispetto ad animali che non ricevevano questa aggiunta nel mangime. Sempre questi autori hanno messo in evidenza come la strategia con la quale gli adsorbenti vengono aggiunti agli alimenti è in grado di migliorare l'efficienza: aggiungere l'adsorbente direttamente nell'alimento contaminato, spesso rappresentato dalla farina di mais, o pellettare insieme mangime contaminato e argilla aumentano le *performance* delle argille rispetto alla loro semplice additivazione nel carro miscelatore durante la preparazione dell'unifeed.

Lo zearalenone viene convertito a livello ruminale nei metaboliti α -zearalenolo, con un tasso superiore al 90%, e β -zearalenolo (Kiessling et al., 1984). L' α -zearalenolo è un metabolita quattro volte più estrogenico rispetto alla mo-

lecola madre. La riduzione dello ZEA a livello ruminale aumenta la polarità della molecola, influenzandone l'assorbimento e aumentandone l'escrezione per via enteropatica e nelle urine. Questo consente ai ruminanti di avere una maggiore protezione dei monogastrici agli effetti negativi associati all'ingestione di questa tossina. A ogni modo, l'ingestione di alti quantitativi di ZEA, superiori a 750 µg/kg, nella dieta somministrata a vacche in lattazione, ha effetti diretti sulle performance riproduttive e può essere causa di vaginiti, aborti e infertilità (Coppock et al., 1990). Weaver et al. (1986) però, alimentando gli animali con 250 mg/giorno di ZEA, non riportano alcun effetto negativo sulle loro *performance* riproduttive, confermando che i ruminanti sembrano essere particolarmente resistenti allo ZEA. Inoltre, il *carry over* dello ZEA e dei suoi metaboliti nel latte è molto basso e non rappresenta un rischio reale per la salute dei consumatori.

I tricoteceni, al pari delle altre micotossine, vengono metabolizzati a livello ruminale e convertiti in altre forme. Il DON viene bioconvertito nel diene e ciò ne riduce la citotossicità e l'induzione di vomito (Scott, 1984). Comunque, nelle vacche il DON è stato associato con la riduzione dell'ingestione e della produzione di latte (Trenholm et al., 1984; Whitlow e Hagler, 1987). Le vacche da carne e le pecore sembrano essere particolarmente tolleranti al DON, non mostrando differenze nell'ingestione degli alimenti e/o nella produzione di latte dopo l'ingestione di diete contaminate con alti livelli (1 e 8.5 mg/kg, rispettivamente) (Jouany e Diaz, 2005). La tossina T-2 è stata associata con fenomeni di rifiuto dell'alimento, gastroenteriti, emorragie intestinali e morte (Weaver et al., 1986; Mirocha et al., 1989). L'ingestione di questa tossina ha mostrato effetti anche sui principali indicatori del sistema immunitario, come il numero dei globuli bianchi e dei neutrofili.

Poche sono le conoscenze riguardo il destino delle fumonisine nel tratto gastro-intestinale dei ruminanti. La FB₁ sembrerebbe poco metabolizzata a livello ruminale (Caloni et al., 2000). Inoltre, i ruminanti sono considerati molto tolleranti alle fumonisine rispetto ai monogastrici, anche se poco è conosciuto circa il destino metabolico delle fumonisine nei ruminanti. Dopo la somministrazione orale di alti quantitativi di FB₁ non vengono misurati nel plasma né la molecola madre né i suoi metaboliti. Diversi autori inoltre hanno concluso che il *carry over* delle fumonisine nel latte è molto basso e minore di 0.05%, non rappresentando un problema per la contaminazione del latte e dei prodotti derivati. Scarse informazioni vi sono sugli effetti tossici dell'ingestione delle fumonisine nei ruminanti, anche se Diaz et al. (2002) hanno misurato una riduzione nella produzione di latte e nel consumo di alimento in vacche da latte alimentate con 100 mg/kg di FB₁.

L'OTA viene convertita a livello ruminale in composti meno tossici. Il ru-

mine, perciò, può essere considerato efficiente nel proteggere l'animale contro gli effetti tossici dell'OTA, a patto che la popolazione protozoaria, quella maggiormente coinvolta nei meccanismi di protezione, non sia scarsa. Infatti, condizioni di acidosi sub-clinica possono influenzare la vitalità protozoica e aumentare la suscettibilità dei ruminanti all'OTA.

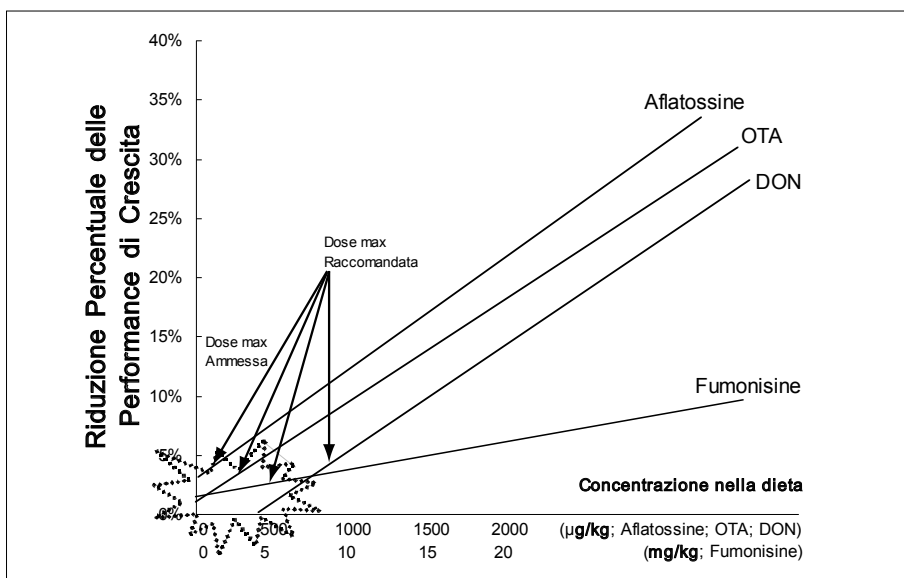
PRESENZA DI MICOTOSSINE NEI MANGIMI IN ITALIA

L'analisi sintetica condotta nel nostro Istituto (Piva et al., 2006) sulla presenza di micotossine in Italia ha mostrato una presenza sistematica delle micotossine negli alimenti, seppur variando in entità anno per anno. Ad esempio, nel caso delle fumonisine (Moretti, 2004) viene segnalata la presenza in tutti i campioni di cereali e derivati controllati (oltre 500) nel periodo 1991-2002, con valori compresi fra 0,1 e oltre 50 mg/kg. Lo ZEA, nello stesso periodo citato, risulta presente in circa il 50% di campioni di mais per mangimi (oltre 500 campioni) con valori oscillanti fra 0,005 e 2,5 mg/kg (Moretti, 2004). L'OTA, nel periodo 1982-2001, è presente in circa 1/3 dei campioni di cereali anche se a livelli bassi, inferiori ai 15 µg/kg (Moretti, 2004; Pietri 2001). Il DON è segnalato nel 100% dei campioni raccolti in Italia, con valori che arrivano a concentrazioni pari a 3,1 mg/kg (Lops et al., 1998). In ogni caso, la contaminazione da DON sembra essere maggiore negli areali del Nord Italia rispetto a quelli del Sud; nei primi si possono raggiungere valori di contaminazione per il frumento duro di 6 mg/kg e per il tenero di 3 mg/kg (Pascale et al., 2002). L'aflatossina è segnalata in poco meno del 30% dei campioni di cereali e loro derivati destinati all'uomo, con valori compresi da 0,1 a oltre 24 µg/kg (Miraglia et al., 1998).

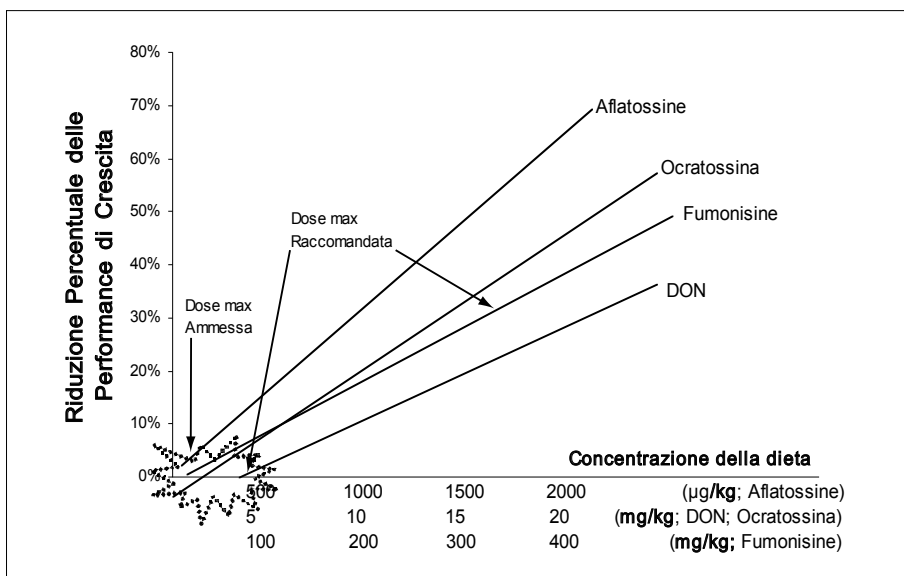
EFFETTI DEI BASSI LIVELLI DI CONTAMINAZIONE SULLE PERFORMANCE PRODUTTIVE

La legislazione dell'UE, a tutela della salute del consumatore e dello stato sanitario degli animali allevati, prevede dei limiti di presenza di alcune micotossine nelle derrate alimentari e nei mangimi destinati agli animali. Per quelle micotossine per le quali non sono definiti limiti precisi vengono espresse delle raccomandazioni (tab. 1).

Per i mangimi, si tratta di livelli che non dovrebbero indurre manifestazioni patologiche conclamate e che dovrebbero garantire la sicurezza del consumatore. Riprendendo però le considerazioni di Hamilton (1984), non si può



Graf. 2 *Effetto del consumo di bassi dosaggi di micotossine sulle performance di crescita dei suini (Southern and Clawson, 1979; Lindemann et al., 1993; Stoev et al., 2002; Zomborszky et al., 2002; Malagutti et al., 2005; Smith et al., 2005; Accensi et al., 2006)*



Graf. 3 *Effetto del consumo di bassi dosaggi di micotossine sulle performance di crescita degli avicoli (Kubena et al., 1997a; Kubena et al., 1997b; Li et al., 2000; Devegowda and Murthy, 2005; Bintvihok and Kositcharoenkul, 2006; Danicke et al., 2007)*

MICO-TOSSINA	ANIMALI		INGESTIONE MICO-TOSSINE GIORNI	DOSE INGERITA DAGLI ANIMALI (CONCENTRAZIONE NEGLI ALIMENTI) µG/KG	DOSE MASSIMA AMMESSA ^(*) O RACCOMANDATA ^(*) µG/KG	PERDITA D'EFFICIENZA PRODUTTIVA	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
Aflatossine	AFB ₁	Suini	49	420	20 ^A	-8,7%	Lindemann et al. 1993
				840		-32,7%	
			42	800		-26,8%	Lindemann et al. 1993
			66	20		-0,1%	
				385		-6,6%	Southern and Clawson, 1979
				750		-9,4%	
		Broilers	14	1480	20 ^A	-21,7%	Bintvihok and Kositcharoenkul, 2006
				50		-1.25%	
			28	100		-0,63%	
			42	50		-4,01%	
Tricoteceni	DON	vacche da latte	84	6000	5000 ^R	-6,14%	Charmley et al. 1993
				12000		-5,70%	
		anatre	49	100	5000 ^R	-0%	Danicke et al. 2004
				900		-1,37%	
				2000		-2,74%	
				4200		-1,37%	
		suini	28	5300		-0,00%	
				7300		-1,37%	
				280	900 ^R	+1,38%	Accensi et al. 2006
				560		-6,03%	
		tacchini	56	840	5000 ^R	-11,03%	
				2090		-3,11%	
				4660		-1,65%	Danicke et al. 2007
				5420		-3,98%	
		broiler ovaiole	21	15000	5000 ^R	-36.6%	Kubena et al. 1997b
			30	500	—	-1,4%	
	T-2 + HT-2	broiler		1000		-3,4%	
			17	2000	—	-3,5%	
				500		0.0%	Rezar et al. 2007
		broiler		1500		-2,38%	
			19	4500	—	-12,12%	
				13500		-42,24%	
				5000		-17,52%	Kubena et al. 1997b

prudentemente identificare un livello di sicurezza per le micotossine che sia differente da zero.

A tale scopo, analizzando i dati di alcune prove sperimentali condotte sui suini e sugli avicoli, nelle quali sono riportate le perdite di performance produttive sulla base dei quantitativi di micotossina ingerita, è stato possibile estrapolare delle stime sugli effetti che i bassi dosaggi di micotossine (sotto i limiti ammessi o raccomandati dalla UE) potrebbero avere sull'accrescimento in peso degli animali da reddito (graf. 2 e 3). Dall'analisi dei grafici si evidenzia come esista un effetto deprimente dovuto alla presenza di micotossine (aflatossine, OTA, DON, fumonisine) negli alimenti alle basse concentrazioni. Anche se diversi autori hanno confermato quanto da noi riportato in questa sede (tab. 4), per la esiguità del dato, non sempre gli effetti sono evidenti e significativi nella comune sperimentazione biologica. Inoltre, in situazioni di pieno campo, la bassa rilevabilità analitica (quando presenti in entità modesta), la presenza di "micotossine nascoste" e di effetti "confondenti" (cattiva nutrizione, impianti non idonei, scelte manageriali sbagliate, etc.) rendono più difficile isolare l'effetto dovuto all'ingestione di micotossine.

A ogni modo, la presenza di micotossine negli alimenti è sistematica e ineliminabile, anche in condizioni climatiche ottimali.

La situazione mangimistica italiana, la produzione nazionale di cereali e il loro utilizzo in alimentazione animale, desunto da un'indagine presso le maggiori aziende mangimistiche del settore per le varie specie, è riportato nella tabella 5. In pratica, la produzione globale di mangimi è stimata pari a 18,4 milioni di ton; il mais è il cereale più utilizzato in alimentazione animale e per quasi la totalità viene prodotto a livello nazionale (tab. 5). La fonte proteica

	TON
<i>Produzione Nazionale di Mangimi</i>	<i>~ 18.360.000</i>
<i>Produzione Industriale Mangimi Completi</i>	<i>~ 13.260.000</i>
Avicoli	41%
Bovini	26%
Suini	18%
Animali fam.	9%
Altro	5%
<i>Auto-produzione Aziendale</i>	<i>~ 5.100.000</i>
Avicoli	—
Bovini	55%
Suini	40%
Altro	5%

Tab. 5 *Produzione nazionale di mangimi per l'allevamento animale (fonte ASSALZOO, 2008)*

	MIGLIAIA DI TON
<i>Produzione stimata di Cereali (periodo 2008-2015) (fonte ASSALZOO)</i>	
Mais	~ 9.000
Grano tenero	~ 4.000
Orzo	~ 1.100
<i>Utilizzo dei Cereali nella preparazione industriale di mangimi</i>	
Mais* e derivati	5-60%
Orzo e derivati	0-30%
Grano e derivati	0-45%
* Nella auto-produzione aziendale di mangime, la quota del mais potrebbe essere maggiore N.B.: La principale fonte proteica nell'alimentazione animale è la soia, che viene importata in ragione di ~ 4.000 migliaia di Ton	

Tab. 6 *Produzione nazionale di cereali e utilizzo in alimentazione animale*

PRODUZIONE ANIMALE	RIDUZIONI STIMATE DI PRODUZIONE
Latte bovino	-0,5%
Carne bovina	-0,5%
Carne suina	-1,0%
Broiler	-2,0%
Tacchini	-2,0%
Produzione Uova	-1,5%
Carne ovicaprina	-0,5%
Latte ovicaprino	-0,5%

Tab. 7 *Stima della riduzione nelle produzioni zootecniche nazionali, per anno, dovute alla presenza di micotossine nei cereali*

principale è la soia, che è importata per circa 4 milioni di ton. A ogni modo, la soia è un alimento a rischio di contaminazione da micotossine praticamente irrilevante.

Sulla scorta di questi dati (tabb. 5 e 6) e di quelli di letteratura sugli effetti delle micotossine sulle performance (tab. 4; graf. 2 e 3), si possono ragionevolmente fare delle stime di perdita produttiva media annua per i singoli comparti produttivi (tab. 7), dovuta alla presenza di micotossine nei cereali. Si tratta di perdite apparentemente poco significative e spesso non rilevabili direttamente. A ogni modo, stimando un valore delle produzioni zootecniche di circa 14 miliardi di euro (ISTAT, 2006) e ipotizzando un effetto depressivo sulle performance degli animali dovuto all'ingestione di micotossine pari a circa 0,5-2% a seconda delle specie, si ottiene una perdita pari a oltre 200 milioni di euro per l'intero comparto zootecnico italiano¹.

¹ Questa stima non tiene conto di eventuali oneri aggiuntivi derivanti da maggiori interventi veterinari o da peggioramento dell'impatto ambientale.

CONCLUSIONI

Le produzioni zootecniche devono convivere con la presenza di micotossine nei cereali destinati all'alimentazione animale. Si deve prendere coscienza degli effetti negativi, spesso poco evidenti, che determinano negli allevamenti. Il danno diretto è difficilmente misurabile nel caso di contaminazioni a bassi livelli. In ogni caso, una stima prudenziale porta a una valutazione media del danno economico, pur con differenze fra i vari allevamenti, stimabile attorno all'1,0-1,5%, con una perdita in termini economici dell'ordine di oltre 200 milioni di euro per anno, anche in condizioni climatiche normali.

RIASSUNTO

Le micotossine sono metaboliti secondari prodotti da funghi filamentosi, con proprietà tossiche e cancerogene per gli uomini e gli animali. Le principali micotossine sono le aflatossine, l'ocratossina A, i tricoteceni, lo zearalenone, le fumonisine, l'acido ciclopiazonico e gli alcaloidi da ergot. Queste micotossine possono essere prodotte da molte specie fungine, principalmente appartenenti a cinque generi: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Stachybotrys*. Tali funghi possono produrre micotossine sia in campo, che durante le fasi di essiccazione, di trasporto e di stoccaggio degli alimenti.

L'esposizione diretta alle micotossine negli uomini e negli animali avviene attraverso il consumo o il contatto con cereali, semi, spezie, frutta, bevande e altre parti vegetali contaminate. Le micotossine, come tali o come metaboliti, possono contaminare prodotti di origine animale come latte, carne, uova e loro derivati ed entrare in modo indiretto nella catena alimentare.

Gli stati patologici associati all'ingestione o al contatto con le micotossine vengono chiamati "micotossicosi" e possono insorgere in forma acuta, cronica, o sub-cronica. Dato che le micotossine raramente sono responsabili di intossicazioni acute ed emergenze sanitarie pubbliche, il rischio percepito dai consumatori appare essere basso rispetto ad altri contaminanti degli alimenti come i pesticidi, gli additivi, i metalli pesanti e gli agenti microbici. Comunque, la contaminazione da micotossine negli alimenti ha causato e causa problemi di ordine sanitario. Per questo, più di 100 nazioni nel mondo hanno regolamenti specifici che fissano dei limiti massimi per la contaminazione degli alimenti da micotossine.

Nelle produzioni animali, l'ingestione di bassi livelli di micotossine può causare severe perdite economiche legate alla riduzione della produttività, principalmente per i danni arrecati agli organi bersaglio, a fenomeni immunodepressivi e a interferenze con le funzioni riproduttive. Diagnosticare la presenza di micotossicosi appare difficile in quanto vi sono molteplici fattori che possono interferire, rendendo meno chiari gli effetti dell'ingestione di micotossine, come la razza, il sesso, l'ambiente, il livello nutritivo, la quota di micotossine ingerite dagli animali e la presenza di altri contaminanti negli alimenti. Le recenti ricerche sulle micotossine mirano a evidenziare gli effetti sulle performance produttive degli animali e le eventuali interazioni fra micotossine e altri fattori, nonché a verificare l'influenza sullo stato sanitario degli animali esposti a livelli di contaminazione molto bassi.

ABSTRACT

Mycotoxins are natural secondary metabolites of filamentous fungi, which exhibit toxic and carcinogenic effects in humans and animals. The most important mycotoxins are aflatoxins, ochratoxin A, trichothecenes, zearalenone, fumonisins, cyclopiazonic acid and ergot alkaloids. These mycotoxins are produced by a wide range of fungal species, mainly belonging to five genera: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* and *Stachybotrys*. Direct exposure of humans and animals to mycotoxins is through consumption or contact with contaminated cereals, seeds, spices, fruits, beverages and other plant materials. Mycotoxins or their metabolites, could contaminate animal productions and indirectly enter the human food chain by consumption of milk, meat, eggs and their derivatives. Diseases caused by mycotoxins are referred to as "mycotoxicosis" and they can be acute, chronic or sub-chronic. Due to the fact that mycotoxins rarely cause acute intoxication diseases and health emergencies, the risk perceived by the consumers is lower than other food-related threats, such as pesticides, additives, heavy metals and microbial agents. However, mycotoxins in the human food chain have been responsible for many documented diseases. For this, many countries have fixed legal limits for mycotoxins presence in food: more than 100 nations have specific regulations for mycotoxins. In animal productions, a low level of mycotoxin ingestion could cause drastic economical losses related to decreased productivity, due to chronic damage of target organs, immune suppression and interference with the reproductive system. The diagnosis of naturally occurring mycotoxicosis appears often difficult because there are interactions with multiple factors, such as breed, sex, environment, nutritional status, toxin level ingestion and presence of other feed contaminants. The new research aspects of animal mycotoxicology aim to highlight on farm the effects related to mycotoxins ingestion and their interaction with other factors, and to verify the effect of "very low" levels of mycotoxin ingestion on health status of animals.

BIBLIOGRAFIA

- ABBAS H. K., MIROCHA C.J., TUIITE J. (1986): *Natural occurrence of deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol and zearalenone in refused corn stored since 1972*, «Appl. Environ Microbiol.», 51, pp. 841-843.
- ACCENSI F., PINTON P., CALLU P., ABELLA-BOURGES N., GUELFY J.-F., GROSJEAN F. and OSWALD I.P. (2006): *Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets*, «J. Anim. Sci.», 84, pp. 1935-1942.
- ARAVIND K.L., PATIL V.S., DEVEGOWDA G., UMAKANTHA B., GANPULE S.P. (2003): *Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers*, «Poultry Sci.», 82, pp. 571-576.
- BALDI A., FUSI E., SANGALLI L., REBUCCI R., LOSIO N., PAVONI E., BERTASI B., CHELI F. (2003): *In vitro evaluation of cytotoxicity and oxidative damage induced by ochratoxin A and aflatoxin B1: protective role of antioxidants*, «Italian Journal of Animal Science», 2 (Suppl. 1), pp. 231-233.
- BERTHILLER F., SCHUHMACHER R., POPPENBERGER B., LUCYSHYN D., LEMMENS M.,

- ADAM G., KRŠKA R. (2004): *Determination of masked mycotoxins using HPLC-Tandem Mass Spectrometry*, Proceedings to the XI IUPAC Conference on mycotoxins and Phycotoxins, Bethesda, MD, 2004.
- BINTVIHOK A., KOSITCHAROENKUL S. (2006): *Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B1*, «Toxicon», 47, pp. 41-46.
- BONOMI A., QUARANTELLI A., MAZZALI I., LUCCHELLI L., CABASSI E., CORRADI A., UBALDI A., FUSARI A., CHIZZOLINI R. (1992): *The effects of aflatoxin B1 contaminated rations on the productive efficiency and on meat yield and quality in fattening pigs*, «Rivista della società italiana di scienza dell'alimentazione», 22, pp. 351-377.
- CALONI F., SPOTTI M., AUERBACH H., CAMP H.O., GREMMELS J.F., POMPA G. (2000): *In vitro metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora*, «Vet. Res. Com.», 24, pp. 379-387.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (2003): *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human system*, Ames, Iowa, USA.
- CHARMLEY E., TRENHOLM H.L., THOMPSON B.K., VUDATHALA D., NICHOLSON J.W.G., PRELUSKY D.B., CHARMLEY L.L. (1993): *Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition*, «J. Dairy Sci.», 76, pp. 3580-3587.
- CHEEKE P.R., PALO R.T. (1995): *Plant Toxins and mammalian herbivores: Co-evolutionary relationships and atinutritional effects*, in *Recent developments in the nutrition of herbivores*, pp. 87-136.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2000): *White paper on food safety*, COM (1999) 719 final. Brussels, 12 January 2000.
- COPPOCK R.W., MOSTROM M.S., SPARLING C.G., JACOBSEN B., ROSS S.C. (1990): *Apparent Zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid treated corn*, «Vet. Hum. Toxicol.», 32, pp. 246-248.
- COSTA S., UTAN A., SPERONI E., CERVELLATI R., PIVA G., PRANDINI A., GUERRA M.C. (2008): *Oxidative stress induced by ochratoxin A in LLC-PK1 cell line and the chemoprotective effects of carnosic acid*, «World Mycotoxin Journal», 1, pp. 469-474.
- DAILEY P., REESE RE, BROUWER E.A. (1980): *Metabolism of ¹⁴C zearaleone in laying hens*, «J. Agric. Food Chem.», 28, pp. 286-291.
- DÄNICKE S., UEBERSCHÄR K.-H., VALENTA H., MATTHES S., MATTHÄUS K., HALLE I. (2004): *Effects of graded levels of Fusarium-toxin-contaminated wheat in Pekin duck diets on performance, health and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone*, «British Poultry Sci.», 45, pp. 264-272.
- DÄNICKE S., VALENTA H., UEBERSCHÄR K.-H., MATTHES S. (2007): *On the interactions between Fusarium-toxin-contaminated wheat and non-starch-polysaccharides hydrolysing enzymes in turkey diets on performance, health and carry-over of deoxynivalenol and zearalenone*, «British Poultry Sci.», 48, pp. 39-48.
- DEVEGOWDA G., MURTHY T.N.K. (2005): *Mycotoxins: their effects in poultry and some practical solutions*, in *The Mycotoxin Blue Book*, Diaz, D.E. (eds), Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, pp. 25-56.
- DIAZ D.E., HAGLER W.M. Jr., BLACKWELDER J.T., EVE J.A., HOPKINS B.A., ANDERSON K.L., JONES F.T., WHITLOW L.W. (2004): *Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed*, «Mycopathologia», 157, pp. 233-241.

- ENGEL V.G., HAGEMEISTER H. (1978): *Untersuchungen über den verbleib von aflatoxin B1 in verdauungstrakt von kühen* (Abstract), «Milchwissenschaft», 33, pp. 21-23.
- GALLO A., MOSCHINI M., MASOERO F. (2008): *Aflatoxins absorption in the gastro-intestinal tract and in vagina mucosa in lactating dairy cows*, «Italian Journal of Animal Science», 7, pp. 339-349.
- GALVANO F., GALOFARO V., DE ANGELIS A., GALVANO M., BOGNANNO M., GALVANO G. (1998): *Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy*, «Journal of Food Protection», 61, pp. 738-741.
- GALVANO F., PIVA A., RITTIENI A., GALVANO G. (2001): *Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review*, «Journal-of-Food-Protection», 64 (1), pp. 120-131.
- GAREIS M., BAUER J., THEIM J., PLANK G., GRABLEY S., GEDEK B. (1990): *Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin, during digestion in swine*, «Zentralbl Veterinarmed», B 37, pp. 236-240.
- GIORNI P., MAGAN N., PIETRI A., BERTUZZI T., BATTILANI P. (2007): *Studies on Aspergillus Section Flavi isolated in northern Italy from maize*, «Int. J. Food Microbiol.», 113, pp. 330-338.
- GUERRA M.C., GALVANO F., BONSI L., SPERONI E., COSTA S., RENZULLI C., CERVELLATI R. (2005): *Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B1- and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo-2)*, «British Journal of Nutrition», 94, pp. 211-220.
- GUTHRIE L.D. (1979): *Effects of aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle*, «J Dairy Sci», 62, p. 134.
- HAMILTON P.B. (1984): *Determining safe levels of mycotoxins*, «J Food Protect», 47, pp. 570-575.
- HAMILTON R.M.G., THOMPSON B.K., TRENHOLM H.L. (1986): *The effects of deoxynivalenol (vomitoxin) on dietary preference of white Leghorn hens*, «Poultry Sci», 65, pp. 288-293.
- HARVEY R.B., HUFF W.E., KUBENA L.F., PHILLIPS T.D. (1989): *Evaluation of diets co-contaminated with aflatoxin and ochratoxin fed to growing pigs*, «Am J Vet Res», 50, pp. 1400-1405.
- HOHLER D. (1999): *A brief survey on important mycotoxins and possible detoxification methods*, «World Poult. Sci.», 53, p. 1585.
- HUFF W.E., DOERR J.A., WABECK C.J., CHALOUPKA G.W., MAY J.D., MERKLEY J.W. (1984): *The individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on various processing parameters of broiler chickens*, «Poultry Sci», 63, pp. 2153-2161.
- HUFF W.E., KUBENA L.F., HARVEY R.B., PHILLIPS T.D. (1992): *Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A*, «Poultry Sci», 71 (1), pp. 64-69.
- JONES M., EWART G. (1979): *Effects on milk production associated with consumption of de-corticated extracted groundnut meal contaminated with aflatoxin*, 105 (21), pp. 492-493.
- JOUANY J.P., DIAZ D. (2005): *Effects of mycotoxins in ruminants*, in *The Mycotoxin Blue Book*, D.E. Diaz (eds), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 295-323.
- JOUANY J.P., DIAZ D. (2005): *Mycotoxins in ruminants*, in *The Mycotoxin Blue Book*, D.E. Diaz (eds), Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, pp. 312-321.
- KAMIMURA H. (1986): *Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by Rhizopus sp.*, «Appl Environ Microbiol», 52, pp. 515-519.

- KIESSLING K.H., PETTERSSON H., SANDHOLM K., OLSEN M. (1984): *Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria*, «Appl. Environ. Microbiol.», 47, pp. 1070-1073.
- KUBENA L.F., HARVEY R.B., HUFF W.E., YERSIN A.G., ELISSALDE M.H., WITZEL D.A. (1993): *Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol*, «Poultry Sci.», 72 (1), pp. 51-59.
- KUBENA L.F., EDRINGTON T.S., KAMPS-HOLTZAPPLE C., HARVEY R.B., ELISSALDE M.H., ROTTINGHAUS G.E. (1995b): *Influence of fumonisin B1 present in Fusarium moniliforme culture material and T-2 toxin on turkey poults*, «Poultry Sci.», 74, pp. 306-313.
- KUBENA L.F., EDRINGTON T.S., HARVEY R.B., BUCKLEY S.A., PHILLIPS T.D., ROTTINGHAUS G.E., CASPER H.H. (1997b): *Individual and combined effects of fumonisin B1 present in Fusarium moniliforme culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks*, «Poultry Sci.», 76, pp. 1239-1247.
- KUBENA L.F., EDRINGTON T.S., HARVEY R.B., PHILLIPS T.D., SARR A.B., ROTTINGHAUS G.E. (1997a): *Individual and combined effects of fumonisin B1 present in Fusarium moniliforme culture material and diacetoxyscirpenol or ochratoxin A in turkey poults*, «Poultry Sci.», 76, pp. 256-264.
- KURTZ H.J., MIROCHA C.J. (1978): *Zearalenone (F2) induced estrogenic syndrome in swine*, in T.D. Wyllie and L.G. Morehouse (Eds.), *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*, vol. 2., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1256-1264.
- LI Y.C., LEDOUX D.R., BERMUDEZ A.J., FRITSCH K.L., ROTTINGHAUS G.E. (2000): *The individual and combined effects of fumonisin B1 and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poults*, «Poultry Sci.», 79, pp. 871-878.
- LINDEMANN M.D., BLODGETT D.J., KORNEGAY E.T., SCHURIG G.G. (1993): *Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine*, «J. Anim. Sci.», 71, pp. 171-178.
- LINDERMAN M.D., BLODGETT D.J., HARPER A.F., KORNEGAY E.T., DOERR J.A. (1997): *Appraisal of the value of selected clays and minerals in diets with or without aflatoxin-contaminated maize fed to young pigs*, «J. Anim. Feed Science», 6, pp. 507-519.
- LOPS R., PASCALE M., PANCALDI D., VISCONTI A. (1998): *Infezioni fungine e presenza di deossinivalenolo in cariossidi di frumento prodotte in diverse regioni italiane (Fungal infections and deoxynivalenol presence in wheat kernels yielded in different Italian regions)*, «L'Informatore Fitopatologico», 4, pp. 60-66.
- MALAGUTTI L., ZANNOTTI M., SCAMPINI A., SCIARAFFIA F. (2005): *Effects of ochratoxin A on heavy pig production*, «Anim. Res.», 54, pp. 179-184.
- MANNING R.O., BROWN T.P., WYATT R.D., FLETCHER O.J. (1985): *The individual and combined effects of citrinin and ochratoxin A in broiler chicks*, «Avian Dis.», 29, pp. 986-997.
- MASOERO F., GALLO A., DIAZ D., PIVA G., MOSCHINI M. (2008) (in press): *Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M1 excretion into milk of lactating dairy cows*, «Anim. Feed Sci. Technol.», doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.07.009.
- MASOERO F., GALLO A., MOSCHINI M., PIVA G., DIAZ D. (2007): *Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts*, «Animal», 1, pp. 1344-1350.
- MCINTOSH F.M., STANLEY K.N., STEWART C.S., NEWBOLD C.J. (2002): *The role of protozoa in the survival of E. coli, verocytotoxin encoding bacteriophage and their vtec lysogens in the rumen*, «J Dairy Sci.», 60 (Suppl. 1), pp. 153-154.

- MIRAGLIA M., BRERA C., ONORI R., CORNELI S., COLATOSTI M., CAVA E., IPPOLITI D., QUAGLIA M. (1998): *Mycotoxin contamination in Italy over the last decade*, in *Mycotoxins and phycotoxins – development in chemistry, toxicology and food safety*, edited by M. Miraglia, H. van Egmond, C. Brera and J. Gilbert, Alaken Inc., Fort Collins, CO, USA, pp. 601-608.
- MIROCHA C.J., ABBAS H.K. (1989): *Chemistry, occurrence and toxicology of the hemorrhagic mycotoxin (wortmannin) produced by Fusarium*, in S. Natori, K. Hashimoto, and Y. Ueno (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins* 88, Elsevier, New York, pp. 213-221.
- MORETTI A., LOGRIECO A., VISCONTI A., BOTTALICO A. (2004): *An overview of mycotoxins and toxigenic fungi in Italy*, in *An overview of toxigenic fungi and mycotoxins in Europe*, edited by A. Logrieco and A. Visconti, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 141-160.
- MOSCHINI M., GALLO A., PIVA G., MASOERO F. (2007): *Mucosal absorption of aflatoxin B1 in lactating dairy cows*, «Italian Journal of Animal Science», 6 (Suppl. 1), pp. 324-326.
- MURPHEY P.A., HENDRICH S., LANDGREN C., BRYANT C.M. (2006): *Food mycotoxins: an update*, «J. Food Sci.», 71, pp. 51-65.
- OSWEILER G.D., KEHRLI M.E., STABEL J.R., THURSTON J.R., ROSS P.F., WILSON T.M. (1993): *Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves*, «J. Anim. Sci.», 71, pp. 459-466.
- PASCALE M., BOTTALICO A., PANCALDI D., PERRONE G., VISCONTI A. (2002): *Occurrence of deoxynivalenol in cereals from experimental fields in various Italian regions*, «Petria», 12, pp. 123-129.
- PAYNE G.A. (1998): *Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops*, in K.K.S. Sinha and D. Bhatnagar (Eds.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, pp. 279-306.
- PHOHL-LESZKOWICZ A. (2000): *Risques micotoxicologiques pour la santé des animaux et de l'homme*, «Ch. Nutr. Diet.», 35, pp. 389-397.
- PIETRI A., BERTUZZI T., BERTUZZI P., PIVA G. (1997): *Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese*, «Food Additives and Contaminants», 14 (4), pp. 341-344.
- PIETRI A., BERTUZZI T., GUALLA A., PIVA G. (2006): *Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy*, «Italian Journal of Food Science», 18 (1), pp. 99-106.
- PIVA G., BATTILANI P., PIETRI A. (2006): *Emerging issues in southern Europe: Aflatoxins in Italy*, in *The mycotoxin factbook – food and feed topics*, Barug D., Bhatnagar D., Van Egmond H.P., Van Der Kamp J.W., Van Osenbroggen W.A., Visconti A., Editors. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, pp. 139-153.
- PIETRI A., BERTUZZI T., MOSCHINI M., PIVA G. (2003): *Aflatoxin M₁ occurrence in milk samples destined for Parmigiano Reggiano Cheese production*, «Italian Journal of Food Science», 15 (2), pp. 301-306.
- PIETRI A., BERTUZZI T., PALLARONI L., PIVA G. (2004): *Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy*, «Food Additives and Contaminants», 21, pp. 479-487.
- PIETRI A., BERTUZZI T., PALLARONI L., PIVA G. (2001): *Occurrence of ochratoxin A in Italian wines*, «Food Additives and Contaminants», 18, pp. 647-654.
- POPPENBERGER B., BERTHILLER F., LUCYSHYN D., SIEBERER T., SCHUHMACHER R., KRŠKA R., KUCHLER K., GLOSS J., LUSCHING C., ADAM G. (2003): *Detoxification of the Fusa-*

- rium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from Arabidopsis thaliana*, «Biol Chem», 278, pp. 47905-47914.
- PRELUSKY D.B. (1993): *The effect of low-level deoxynivalenol on neurotransmitter levels measured in pig cerebral spinal fluid*, «J Envir Sci Health», B28, pp. 731-761.
- REZAR V., FRANKIC T., NARAT M., LEVART A., SALOBIR J. (2007): *Dose-dependent effects of T-2 toxin on performance, lipid peroxidation, and genotoxicity in broiler chickens*, «Poultry Sci.», 86, pp. 1155-1160.
- ROTTER B.A., THOMPSON B.K., LESSARD M., TRENHOLM H.L., TRYPHONAS H. (1994): *Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and haematological parameters in young swine*, «Fund Appl Toxicol», 23, pp. 117-124.
- SANTIN E. (2005): *Mould Growth and mycotoxin production*, in *The Mycotoxin Blue Book*, Diaz D.E. (eds), Nottingham University Press, Thrumpron, Nottingham, pp. 225-234.
- SCHEIDEGGER K.A., PAYNE G.A. (2003): *Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of Aspergillus flavus from pathogenicity to functional genomics*, «J. Toxicol.-Toxin. Rev.», 22, pp. 423-459.
- SCHELL T.C., LINDEMANN M.D., KORNEGAY E.T., BLODGETT D.J., DOERR J.A. (1993): *Effectiveness of different types of clay for reducing the detrimental effects of aflatoxin-contaminated diets on performance and serum profiles of weanling pigs*, «Journal-of-Animal-Science», 71 (5), pp. 1226-1231.
- SCOTT P.M. (1984): *The occurrence of vomitoxin (deoxynivalenol, DON) in Canadian grains*, in H. Kurata and Y. Ueno (Eds.), *Toxic fungi - Their Toxins and Health Hazard*, Elsevier Scientific Publishing Company, Inc., New York, pp. 182-189.
- SILVOTTI L., DI LECCE R., BONOMI A., BORGHETTI P., PERILLO A., PIEDIMONTE G., CORRADI A., CABASSI E. (1995): *In vitro responses of macrophages and lymphocytes of pigs fed with aflatoxins B1 and G1*, «European-Journal-of-Veterinary-Pathology», 1, pp. 117-121.
- SJÖBERG L. (2001): *Limits of knowledge and the limited importance of trust*, «Risk Anal.», 21, pp. 189-198.
- SJÖBERG L. (2004): *Principle of risk perception applied to gene technology*, European Molecular Biology Organization, EMBO report 5, pp. 47-51.
- SLOVIC P. (1993): *Perceived risk, trust, and democracy*, «Risk Anal.», 13, pp. 675-682.
- SLOVIC P., FLYNN J.H., LAYMAN M. (1991): *Perceived risk, trust, and the politics of nuclear waste*, «Science», 254, pp. 1603-1607.
- SMITH T.K., DIAZ G., SWAMY H. (2005): *Current concepts in mycotoxicoses in swine*, in *The Mycotoxin Blue Book*, D. E. Diaz (eds), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 235-248.
- SMITH T.K., McMILLAN E.G., CASTILLO J.B. (1997): *Effect of feeding blends of Fusarium mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine*, «J. Anim. Sci.», 75, pp. 2184-2191.
- SOUTHERN L.L., CLAWSON A.J. (1979): *Effects of aflatoxins on finishing swine*, «J. Anim. Sci.», 49, pp. 1006-1011.
- STOEV S.D., PASKALEV M., McDONALD S., MANTLE P.G. (2002): *Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs*, «Exp Toxic Pathol», 53, pp. 481-487.
- TRENHOLM H.L., HAMILTON R.M.G., FRIEND D.W., THOMPSON B.K., HARTIN K.E. (1984): *Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: Effects on swine, poultry, and dairy cattle*, «J Am Vet Med Assoc», 185, pp. 527-531.

- TURNER W.B., ALDERIDGE D.C. (1983): *Fungal Metabolites II*, Academic Press, London, U.K.
- WEAVER G.A., KURTZ H.J., BEHRENS J.C., ROBISON T., SEGUIN B.E., BATES F.Y., MIROCHA C.J. (1986): *Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers*, «Am. J. Vet Res», 47, pp. 1395-1397.
- WHITLOW L.W., HAGLER W.M. (1987): *The association of productivity in dairy cows with deoxynivalenol*, in *Recent Developments in the study of mycotoxins*, pp. 3-13.
- WYATT R.D. (2005): *Mycotoxins interactions*, in *The Mycotoxin Blue Book*, D.E. Diaz (eds), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 269-278.
- YIANNIKOURIS A., JOUANY J-P. (2002): *Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review*, «Anim. Res.», 51, pp. 81-99.
- ZOMBORSZKY-KOVACS M., VETESI F., HORN P., REPA I., KOVACS F. (2002): *Effects of prolonged exposure to low-dose fumonisin B1 in pigs*, «J. Vet. Med.», 49, pp. 197-201.

Finito di stampare in Firenze
presso la tipografia editrice Polistampa
nel settembre 2009

