UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Agraria

Corso di Laurea in Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio Montano

SCREENING VISIVO DEL GERMOPLASMA MAIDICOLO ITALIANO PER RESISTENZA AD *ASPERGILLUS FLAVUS L.*

Relatore: Prof. Stefano Bocchi

Correlatori: Dott.ssa Carlotta Balconi

Dott. Alessio Torri

Elaborato finale di:

Alborghetti Ilaria

Matr. 792253

Anno Accademico 2013-2014

Indice

RIASSUNTO 1

BIODIVERSITA' DI *ASPERGILLUS FLAVUS* IN EUROPA IN RELAZIONE ALLA GESTIONE DEL RISCHIO DI AFLATOSSINE 3

INTRODUZIONE 4

1. INTEGRATED PEST MANAGEMENT (IPM) 4

2. LE PIANTE E LE LORO PATOLOGIE 6

3. PATOGENI VEGETALI 7

3.1. Classificazione patogeni 9

3.2. Funghi 9

3.3. Altre fonti di stress biotico 10

3.4. Meccanismi di resistenza ai patogeni 12

3.4.1. Resistenza ospite-specifica 13

3.5. La protezione delle piante dalle malattie 14

4. MAIS 15

4.1. Morfologia 16

4.2. Fisiologia 18

5. MAIS DA GRANELLA 19

5.1. Ambiente di coltivazione e vocazione pedoclimatica 19

5.2. Scelta varietale 19

5.3. Sistemazione e preparazione del suolo 20

5.4. Avvicendamento colturale 20

5.5. Semina 20

5.5.1. Alta densità, alta produttività 21

5.6. Gestione del suolo 21

5.7. Fertilizzazione 22

5.8. Irrigazione 22
5.9. Raccolta 23
6. GENETICA E MIGLIORAMENTO 23
6.1. Mais e genetica 23
6.2. Miglioramento genetico 24
7. PATOLOGIE DEL MAIS 26
7.1. Fusariosi della spiga 26
7.2. Ruggine (Fig. 4) 27
7.3 Nanismo 28
7.4. Mosaico 28
7.5. Carbone 29
7.6. Marciume dello stocco 30
8. *ASPERGILLUS FLAVUS* 30
8.1. Importanza per l'uomo 32
8.2. Attacco fungino in Indiana, Missouri, Illinois e Tennessee a causa di condizioni climatiche estreme 33
SCOPO DEL LAVORO 34
MATERIALI E METODI 35
1. PREPARAZIONE DEL CAMPO 35
2. MATERIALI UTILIZZATI 36
2.1. Terreno agar-acqua 37
2.2. Terreno PDA 37
3. METODI 38
3.1. Tecniche di inoculo fungino 38
3.2. Preparazione del materiale 39
3.3.Valutazione visiva della contaminazione da *Aspergillus flavus* 40
3.3.1. Stima della contaminazione ambientale (Visual Rating) 40

4. VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE AL PUNTO DI INOCULO (NIK) 42

5. SAGGIO DI VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE INTERNA 43

RISULTATI 46

1. VALUTAZIUONE VISIVA DELLA CONTAMINAZIONE DA *ASPERGILLUS FLAVUS* 46

1.1. Valutazione contaminazione ambientale nelle due località 47

1.2. Valutazione contaminazione ambientale nella località di Bergamo 48

1.3. Valutazione contaminazione ambientale nella località si Sant'Angelo Lodigiano 49

1.4. Confronto tra le due località di tutti i genotipi presi in esame 50

1.5. Valutazione contaminazione media al punto di inoculo nelle due località 51

1.6. Valutazione contaminazione al punto di inoculo di Bergamo 52

1.7. Valutazione contaminazione al punto di inoculo di Sant'Angelo Lodigiano 53

1.8. Confronto genotipi inoculati nelle due località 54

2. SAGGIO DI VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE INTERNA 55

2.1. Confronto contaminazione interna nelle due località 55

2.2. Contaminazione interna media di *A. flavus* nelle due località 56

2.3. Confronto campioni inoculati con *Aspergillus flavus* nelle due località 57

DISCUSSIONE 58

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE 62

RIASSUNTO

Le colture agrarie sono continuamente sottoposte a stress di varia origine e natura, sia biotici che abiotici. Fra i primi risultano particolarmente temuti attacchi parassitari fungini che, oltre a ridurre le produzioni, possono avere conseguenze molto dannose sull'intera filiera e sul consumatore finale.

La coltura di mais, sottoposta annualmente ad attacchi di malerbe, virus, batteri, nematodi e funghi, deve essere adeguatamente gestita in modo tale che si possa evitare che la presenza di questi parassiti possa ridurre il livello quali-quantitativo della produzione.

Gli strumenti disponibili per l'agricoltore sono di diversa natura ed i migliori risultati si ottengono con un ricorso integrato a questi mezzi. La cosiddetta (IPM) Integrated Pest Management fa riferimento a questo concetto. Gli interventi di carattere meccanico, fisico, chimico si devono inquadrare all'interno di una logica agronomica integrata che non può sottovalutare la scelta dell'ibrido da coltivare. Per quanto riguarda in particolare il rapporto ospite/patogeno fungino, il miglioramento genetico, individua linee resistenti/tolleranti e scarta quelle più suscettibili.

I patogeni fungini micotossigeni principali in mais sono: *Fusarium vetricillioides* endemico nell'areale italiano e *Aspergillus flavus* il quale si sviluppa maggiormente durante annate siccitose e con climi caldi; *A. flavus* è produttore di aflatossine, le quali possono inquinare la catena alimentare e provocare gravi danni alla salute dell'uomo.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di identificare fonti genetiche di resistenza ad *A. flavus*, nell'ambito dell'annata maidicola 2013. E' stato effettuato uno screening 14 linee *inbred* di mais, selezionate dal germoplasma dell'Unità di Ricerca per la Maiscoltura di Bergamo (CRA-

MAC) in due località: Bergamo e Sant'Angelo Lodigiano; queste linee sono state scelte per la loro resistenza/ suscettibilità a *F. verticilloides* nell'ambito di un precedente screening. Il lavoro è stato suddiviso in due parti: 1) alla valutazione della risposta delle quattordici linee pure, 2) inoculo artificiale di *A. flavus* è seguita infatti la valutazione della presenza di contaminazione fungina interna delle stesse linee inbred prese in esame.

Il piano sperimentale ha previsto tre tipi di trattamenti: un controllo, un inoculo con acqua sterile e un inoculo con *A. flavus.*

I risultati riguardanti la valutazione per tutti i genotipi sotto studio indicano un'incidenza ambientale molto bassa.

Al punto di inoculo, invece, la contaminazione è risultata mediamente più estesa a Sant'Angelo Lodigiano rispetto a quanto osservato a Bergamo.

Il livello di contaminazione interna delle cariossidi delle 14 linee pure, in generale, è risultata più elevata a Sant'Angelo Lodigiano per tutti e tre i diversi trattamenti.

Questo screening ha dato la possibilità di trovare un genotipo (Lo577) il quale sotto inoculo risulta avere un basso grado di contaminazione al punto di inoculo e una bassa contaminazione interna alla cariosside.

BIODIVERSITA' DI *ASPERGILLUS FLAVUS* IN EUROPA IN RELAZIONE ALLA GESTIONE DEL RISCHIO DI AFLATOSSINE

Per quanto riguarda la biodiversità di *Aspergillus flavus* in Europa in relazione alla gestione di rischio di aflatossine, è stato scritto un articolo da Perrone G., Gallo A. e Logrieco AF. su "frontiers in Microbiology", il 21 luglio 2012.

RIASSUNTO:

Il fungo produttore di aflatossine *Aspergillus flavus* è largamente conosciuti come il problema più grave e pericoloso nei prodotti agricoli per la presenza di micotossine. In Europa, prima dell'attacco delle aflatossine nel mais (2003-2004) dovuto alle nuove condizioni climatiche, la contaminazione era limitata solamente agli alimenti importati. Sono disponibili poche informazioni riguardo la biodiversità molecolare e la struttura della popolazione di *A. flavus* in Europa.

Dati preliminari hanno evidenziato l'enorme presenza del morfotipo L di *A. flavus*, come la specie predominante nei campi di mais, ma non ci sono prove dell'alta tossicità del morfotipo S, e di altre specie aflatossigeniche.

Il rischio del verificarsi un aumento delle aflatossine è previsto nel mondo ed in particolare nel Sud-Est dell'Europa a causa dell'aumento delle temperature.

In campo, il controllo biologico sulle aflatossine, è stato utilizzato per la prima volta in Africa e USA attraverso un ceppo atossigeno di *A. flavus*.

Sono necessari studi sulla variazione della produzione di aflatossine nella popolazione di *A. flavus* per descrivere un duraturo ceppo atossigeno di *A. flavus.* L'obiettivo di questo articolo è quello di dare una visione d'insieme sulla biodiversità e variazione genetica di *A. flavus* in Europa in materia di gestione del rischio di aflatossine in campo.

INTRODUZIONE

1. INTEGRATED PEST MANAGEMENT (IPM)

L'Integrated Pest Management (IPM) è una tecnica efficace ed ambientalmente sensibile riguardo alla gestione delle specie nocive, la quale si basa su una combinazione di pratiche agronomiche ottimali (Bottrell D. R., 1979). I programmi IPM utilizzano informazioni sui cicli di vita dei parassiti e la loro interazione con l'ambiente. Tali informazioni, unitamente a metodi di controllo dei parassiti disponibili, vengono utilizzate per gestire i danni causati da parassiti attraverso mezzi più economici, e con un impatto minimo su persone e ambiente. Infatti, IPM limita l'uso di pesticidi e sostanze chimiche e favorisce l'utilizzo di prodotti naturali (Bottrell D. R., 1979).

I programmi IPM non utilizzano un singolo metodo di controllo, ma seguono una serie di operazioni (valutazioni, operazioni e rilievi). Le fasi previste sono solitamente quattro:

- Impostare azioni di soglie: prima di intraprendere qualsiasi azione di controllo dei parassiti, IPM, inizialmente, fissa un limite d'azione, ossia un livello al quale devono iniziare le operazioni di controllo dei parassiti. Il livello in cui il parassita potrà diventare una minaccia economica, è fondamentale per riuscire ad orientare le decisioni future riguardo al controllo.

- Monitorare e identificare i parassiti: non tutti gli insetti, erbe infestanti o altri organismi viventi richiedono controlli. Molti organismi sono innocui, ed alcuni sono addirittura benefici. I programmi di gestione integrata servono per monitorare i parassiti

ed identificarli con precisione, in modo tale che vengano prese le decisioni di controllo più appropriate e che queste possano essere effettuate in concomitanza con le soglie d'intervento. Il controllo e l'identificazione dei parassiti elimina la possibilità che pesticidi possano essere utilizzati quando non sono realmente necessari.

- Prevenzione: in una coltura agricola, la prevenzione può essere effettuata utilizzando diversi metodi culturali come: la rotazione tra colture diverse, la selezione di varietà resistenti ai parassiti, e l'utilizzo di piante portinnesto indenni. Questi metodi di controllo possono essere molto efficaci ed economicamente efficienti e non presentano rischi per l'uomo e per l'ambiente.

- Controllo: una volta che le operazioni precedenti hanno indentificato un controllo necessario dei parassiti, i programmi IPM valutano un metodo di intervento adeguato, sia per efficacia che per rischio. I controlli dei parassiti meno rischiosi sono scelti in primo luogo tra sostanze chimiche mirate, come, ad esempio feromoni, i quali disturbano l'accoppiamento del parassita; oppure viene effettuata la cattura o il diserbo. Se questi controlli non funzionano, si deve ricorrere ad una irrorazione mirata di pesticidi (Bottrell D. R., 1979).

Un importante effetto dell'IPM è la riduzione delle infestanti con una conseguente maggior intercettazione della luce da parte delle colture; inoltre bisogna cercar di lasciare il terreno inattivo per il minor tempo possibile in modo tale che le piante infestanti non riescano a crescere e la rotazione di mais e arachidi riduce attacchi al mais da piralide (Litsinger

JA., 1976). Inoltre viene effettuata la lotta biologica, ossia la lotta contro gli organismi nocivi mediante metodi biologici. A questo scopo si favoriscono i nemici naturali o si liberano intenzionalmente insetti utili. Anche microrganismi come funghi e batteri vengono impiegati contro organismi nocivi.

Grazie a queste tecniche di prevenzione delle colture, si può ottenere un aumento della produzione ed una maggiore qualità nutraceutica del prodotto finale (Gallagher K. D., 2000).

2. LE PIANTE E LE LORO PATOLOGIE

La patologia vegetale è la scienza che studia le malattie delle piante e se ne occupa nei sui vari aspetti: come esse si manifestano, le cause che le determinano, le modalità con cui si propagano, le modalità di sviluppo e le vie utilizzate per prevenirle o per debellarle. Attualmente il settore della Patologia abbraccia diversi settori, quali: la Virologia vegetale, la Fitobatteriologia, la Micologia, e la Patologia post-raccolta.

Le piante devono continuamente difendersi da attacchi da parte di batteri, virus, funghi, invertebrati e da altre piante, poiché essendo ancorate al terreno sono incapaci di sfuggire a questi attacchi. Nel corso della loro evoluzione hanno quindi sviluppato meccanismi chimici, fisici e molecolari, i quali permettono loro di adattarsi a fattori ambientali sfavorevoli. La resistenza dell'organismo vegetale ai diversi stress viene trasmessa alle generazioni successive secondo le leggi mendeliane (Buchanan et al., 2003).

Esistono due diversi tipi di stress: gli stress abiotici e gli stress biotici. I primi sono quegli stress che risultano da un eccesso o una carenza dei fattori che determinano le caratteristiche chimiche e fisiche dell'ambiente.

Tra le condizioni ambientali che causano stress idrico possiamo trovare: lo stress idrico, le alte o basse temperature, l'eccessiva salinità del terreno e lo squilibrio dei nutrienti minerali. Uno stress si definisce biotico quando l'effetto viene generato da un organismo patogeno ed è in grado di provocare malattie o infezioni come tumore del colletto, marcescenze dei vari tessuti, oidi, ruggini o maculature.

Per organismo patogeno, si intende un organismo che, per completare parte o l'intero ciclo di vita, necessita di penetrare all'interno dei tessuti dell'ospite causando un effetto dannoso su questo (Buchanan et al., 2003). Solamente quando l'interazione tra ospite e patogeno è positiva si genera una malattia; in natura la maggior parte delle piante sono sane, quindi la presenza di una malattia è limitata solamente ad alcuni esemplari. Una malattia raramente porta alla morte della pianta, la selezione naturale tende a limitare i danni della tossicità e quindi a favorire un maggior sviluppo e riproduzione del patogeno (Buchanan et al., 2003).

3. PATOGENI VEGETALI

La maggior parte delle malattie delle piante sono dovute ad una precedente infezione, derivante da un patogeno insediatosi nei tessuti dell'ospite. In questi casi si parla di malattie infettive o parassitarie, in quanto si hanno in conseguenza all'insediamento di un parassita. In altri casi lo stato di sofferenza di una pianta, può essere data da fattori abiotici, ed in questo caso si parla di malattie non infettive o parassitarie. Una infezione può essere localizzata o sistemica, quando invade tutta la pianta. Piante nelle quali sono visibili i danni dati dall'infezione, si definiscono piante suscettibili al patogeno e questo modello si contrappone a quello di resistenza, cioè la capacità da parte della pianta di porre barriere e

bloccare l'avanzata del patogeno. La forma più leggera di resistenza la si ottiene con la tolleranza, ossia quella condizione in cui il patogeno pur insediandosi all'interno della pianta non ne causa gravi danni. Il tempo che intercorre tra l'insediamento del patogeno e la manifestazione dei sintomi viene indicato come periodo di incubazione, il quale può variare da pochi giorni fino a diversi mesi. Tra i due organismi, ospite e patogeno, si possono instaurare diversi tipi di parassitismo, come:

- la simbiosi, ossia quando i due organismi traggono entrambi vantaggio dalla convivenza;
- il parassitismo, quando un organismo vive a danno dell'altro sottraendogli sostanze utili;
- il saprofitismo, ossia quando un organismo si nutre su un substrato inerte, costituito soprattutto da sostanze organiche derivanti da un altro organismo non più vivente.

I sintomi causati dai patogeni possono essere numerosi. Questi possono essere localizzati, ossia solo su una parte della pianta, oppure sistemici o generalizzati quando si manifestano in modo diffuso su tutta la superficie della pianta (Belli, 2012). I sintomi si manifestano tramite modificazioni di forma e dimensione, infatti si può avere un accartocciamento delle foglie, una bollosità della lamina fogliare, un accrescimento dei tessuti causati da iperplasia o ipertrofia, i quali causano la formazione di galle o tumori. Inoltre, si possono formare scopazzi, ossia il raccorciamento degli internodi dei tratti apicali dei rami, si possono notare fenomeni di nanismo o gigantismo. Infine, si possono avere anche alterazioni di colore.

3.1. Classificazione patogeni

I patogeni possono essere classificati in tre classi: biotrofi, necrotofi, parassiti obbligati e parassiti facoltativi .

I patogeni biotrofi sono patogeni che per vivere hanno assoluta necessità di utilizzare il metabolismo delle cellule vive dell'ospite.

I necrotofi, invece, sono parassiti che traggono il loro nutrimento dalle cellule dell'ospite dopo averne provocato la morte.

I parassiti obbligati, appartenenti ai patogeni biotrofi, sono patogeni che non possono svilupparsi in assenza del proprio ospite e quindi non possono essere coltivati in substrati artificiali.

I parassiti facoltativi, invece fanno parte dei patogeni necrotofi, i quali possono essere coltivati su adatti substrati (Buchanan, 2003; Belli, 2012).

3.2. Funghi

I funghi o miceti sono organismi eterotrofi viventi come saprofiti, parassiti o associati in simbiosi con altri organismi. Il Regno dei Funghi è costituito da un gruppo estremamente numeroso e diversificato di organismi dotati delle seguenti caratteristiche comuni:

- sono eucarioti e multinucleati
- sono eterotrofi
- si nutrono per assorbimento
- si riproducono per spore
- sono caratterizzate dalla presenza di ife riunite in micelio

La struttura vegetativa dei funghi è costituita da una parte chiamata tallo, la quale nei miceti più semplici è di tipo olocarpico, ossia formato da una singola cellula, altre hanno un tallo di tipo eucarpico il quale è differenziato in porzioni vegetative e riproduttive e caratterizzato dal fatto di avere un'entità vegetativa filamentosa e multinucleata, il micelio.

Il micelio consiste di un complesso ramificato di strutture tubulari a parete relativamente rigida, le ife, le quali possono essere settate o meno.

La dispersione delle spore, ha un ruolo molto importante nella propagazione delle malattie e questa diffusione può avvenire grazie al vento, ossia tramite una diffusione anemofila, attraverso la pioggia o attraverso l'attività umana.

La germinazione delle spore può avvenire mediante diverse modalità:

- con emissione di un tubetto germinativo
- con la liberazione di sporangiospore
- con la formazione di un promicelio
- con la gemmazione
- attraverso la formazione di un'altra spora in condizioni sfavorevoli.

I funghi possono avere una riproduzione sessuata e una riproduzione asessuata, quest'ultima più veloce. I funghi fitopatogeni sono gli *Oomycota*, gli *Ascomycota* ed i *Basidiomycota* (Belli, 2012).

3.3. Altre fonti di stress biotico

- VIRUS

I virus costituiscono un regno a sé, in quanto non hanno struttura e organizzazione cellulare. Fra essi vi sono patogeni dell'uomo, degli animali, delle piante e di molti organismi.

I virus delle piante sono chiamati fitovirus, entità infettive e patogene, ossia capaci di insediarsi e moltiplicarsi all'interno della pianta ospite.

Sono composti da un acido nucleico, DNA o RNA (Takács et al., 2014), e da un rivestimento proteico denominato capside.

I virus si possono diffondere sia attraverso il floema che attraverso lo xilema. La propagazione vegetativa dei virus avviene attraverso l'innesto di una pianta sana con una pianta infetta oppure per diffusione di polline o di semi di piante infette. La trasmissione, inoltre può avvenire mediante vettori. Per vettore si intende un qualsiasi organismo capace di trasmettere il patogeno da una pianta ad un'altra. Tra i vettori si annoverano numerose specie di animali appartenenti principalmente alla classe degli insetti, nematodi e acari. La cuscuta può essere vettore di virus da pianta a pianta (Belli, 2012).

- NEMATODI

Nel suolo vivono liberi più di 80 generi diversi di nematodi e possono attaccare le radici delle piante usando le cellule di questo tessuto per nutrirsi, sottraendo nutrimento alla pianta e portando modifiche strutturali all'apparato radicale della pianta. I nematodi sono biotrofi obbligati e sono dotati di uno stiletto capace di attraversare la parete cellulare.

- BATTERIOSI

L'esistenza delle malattie batteriche delle piante è nota dalla fine del 1800. L'azione di queste popolazioni sulla pianta è in generale benefica e la malattia batterica è l'evento indotto da condizioni particolari sia dell'ospite sia ambientali (Belli 2012).

In generali i batteri sono:

- in gran parte termofili e, quindi, preferiscono come ospiti l'uomo e gli animali, anche se le forme che colonizzano i vegetali presentano uno sviluppo ottimale attorno a 25-30 °C e cessano la loro moltiplicazione a 33-40°C

- hanno esigenze di acqua e umidità molto superiori rispetto alle necessità dei funghi (Taylor et al., 2015)
- non sono in grado di effettuare una penetrazione diretta nei tessuti dell'ospite
- preferiscono ambienti di crescita sub-alcalini
- sono ostacolati nella diffusione a distanza dal loro aggregarsi in piccole masse mucillaginose, difficilmente staccabili e trasportabili dal vento.

Nonostante queste limitazioni, i batteri possono essere molto distruttivi, in quanto hanno una velocità di riproduzione molto veloce.

3.4. Meccanismi di resistenza ai patogeni

Le piante sono continuamente esposte ai patogeni, ma la maggior parte di queste rimane sana per la maggior parte della sua vita, e questo è dovuto ad uno dei seguenti motivi: la pianta è incapace di soddisfare le esigenze vitali del patogeno e possiede barriere strutturali e chimiche per non permettere l'insediamento del patogeno, e queste vengono chiamate piante non ospite; la pianta riconosce il patogeno e attiva meccanismi di difesa che bloccano l'infezione e questo viene identificato con il termine resistenza dell'ospite o incompatibilità; ed infine la pianta è suscettibile al patogeno, compatibilità, ma le condizioni ambientali non permettono l'instaurarsi delle infezioni.

Le piante possiedono due linee di difesa: la difesa passiva e la difesa attiva.

- Le difese passive o costitutive sono barriere chimiche o strutturali precostituite che hanno un effetto di esclusione per la maggior parte dei patogeni,

- le difese attive o inducibili sono quelle che costituiscono un sistema di sorveglianza in grado di individuare cellule o molecole estranee, innescano una rapida risposta di difesa.

A sua volta, ciascuna delle due linee di difesa, è formata da due ulteriori sezioni, a seconda che le difese siano strutturali o chimiche. Le difese passive strutturali comprendono i tessuti e le strutture cellulari, le quali si oppongono fisicamente e meccanicamente al patogeno, mentre le difese attive strutturali includono tutte le neo-apposizioni, le quali rafforzano le barriere strutturali precostituite. Le difese chimiche passive sono caratterizzate da composti ad attività antibiotica; infine, le difese chimiche attive sono quelle sintetizzate ex-novo come le fitoalessine.

3.4.1. Resistenza ospite-specifica

Durante la coevoluzione con le piante alcuni microrganismi hanno acquisito fattori di patogenicità in grado di far loro superare le naturali difese dell'ospite e di stabilire con esso uno stato di compatibilità. Successive fasi evolutive hanno permesso alle piante di acquisire meccanismi di riconoscimento dei microrganismi in modo tale da attivare i sistemi di difesa attiva. I geni del patogeno che codificano per elicitori si chiamano geni di avirulenza (avr) e sono molecole in grado di essere riconosciute dai recettori dell'ospite, codificati a loro volta da geni della resistenza (R).

Su questi concetti si fondano le basi genetiche della resistenza ospite-specifica stabilendo la condizione di resistenza\incompatibilità oppure di suscettibilità\incompatibilità.

La resistenza ospite-specifica conferisce un alto grado di resistenza all'ospite con un unico grave limite ovvero può essere facilmente aggirata

da mutazioni che coinvolgano uno dei due geni coinvolti nel riconoscimento (Belli, 2012).

3.5. La protezione delle piante dalle malattie

Per quanto riguarda la difesa della pianta dalle malattie, le vie da seguire sono sostanzialmente due: quella della profilassi, ossia la prevenzione e quella della terapia, cioè la cura della malattia.

Nella scelta delle metodologie da adattare per la protezione delle piante da attacchi parassitari bisogna tener conto di due aspetti fondamentali: la salvaguardia della salute delle persone ed il rispetto degli equilibri ecologici che in molti casi garantiscono un contenimento naturale di vari patogeni e fitofagi dannosi alle piante che vogliamo proteggere. Una modalità di difesa preventiva è quella che tende ad impedire l'entrata del patogeno in paesi in cui non è ancora presente e questa modalità viene chiamata quarantena. Un'altra modalità è l'impiego di piante resistenti. La resistenza di alcune piante rispetto a diversi patogeni può essere o una resistenza genetica o una resistenza indotta. La resistenza genetica è una resistenza dovuta ad uno o più geni che determinano la presenza di barriere strutturali o di sostanze chimiche le quali possono essere sfavorevoli all'attacco di patogeni; mentre la resistenza indotta è una resistenza che può essere indotta nella pianta sia mediante inoculazione di ceppi non virulenti di virus, batteri o funghi sia attraverso l'utilizzo di induttori chimici di resistenza.

Gli interventi di natura agronomica sono numerosi, i quali si possono utilizzare non solo per contrastare i vettori, ma anche per difendere la pianta direttamente dai loro patogeni. Alcuni interventi sono: la scelta più appropriata di un terreno da destinare la coltura, lavorazioni del terreno e

sistemazioni di questo, eliminazione di piante spontanee le quali possono fungere da fonte di inoculo, un adeguato apporto idrico e concimazioni equilibrate (Belli, 2012). I mezzi fisici con i quali si possono salvaguardare le piante sono soluzioni di disinfezione del terreno attraverso il calore. La disinfezione può essere effettuata attraverso l'immissione nel terreno di tubi dai quali uscirà vapore acqueo surriscaldato e tenuto sotto appositi teli, in modo da mantenere la temperatura (Moratö et al., 2003). Un'altra tecnica è la solarizzazione, la quale consiste nel ricoprire il terreno con teli e lasciare che sia il sole a scaldare i terreni; viene utilizzata anche la termoterapia la quale mira a risanare le piante o più frequentemente semi o porzioni di pianta mediante trattamento con calore. I mezzi chimici fanno riferimento agli agrofarmaci. Tra gli agrofarmaci troviamo antiparassitari, diserbanti, fitoregolatori e cicatrizzanti.

4. MAIS

Il mais (*Zea mays* L), fa parte della sottofamiglia maydeae, della grande famiglia delle Poaceae o Graminieae ed infine della classe delle Monocotiledoni. La parola Zea deriva dal greco e significa "vivere", mentre il nome della specie mays fa riferimento alla parola indiana "mahiz" o "marisi" che significa "pane della vita". Il mais fa parte del genere Zea, un gruppo di piante native dell'America centrale e del Messico. Il genere mais comprende numerose specie, tra le quali anche specie selvatiche annuali e perenni, le quali sono conosciute come "teosinte", un termine che deriva da "teocintli" degli indiani Nahuatl il cui significato è "seme degli dei". La specie coltivata *Zea mays* L. deriva dall'addomesticamento di una specie precedente la Zea parviglumis

coltivato nella circa 10.000 anni fa nella valle del fiume Balsas nel sud del Messico (Belli, 2012; Lorenzoni, 2007).

4.1. Morfologia

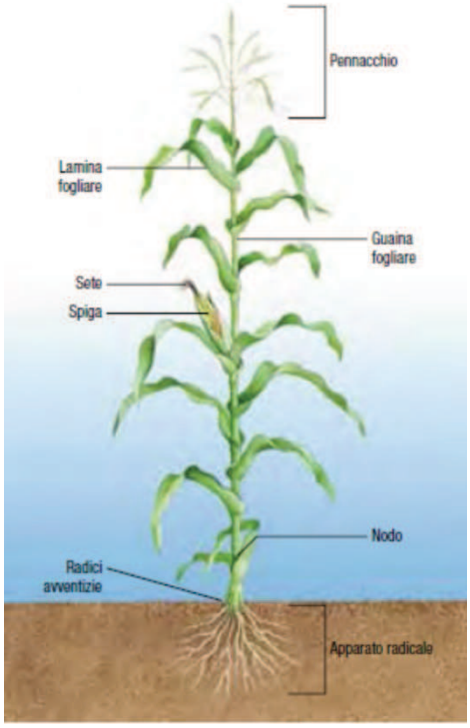

Figura 1. Schema della morfologia della pianta di mais sia per la parte ipogea che per la parte epigea

La pianta di mais ha molte caratteristiche in comune con altre *Poaceae*:

- il fusto o culmo è distinto in internodi;
- le foglie sono distribuite sul culmo in due file opposte o distiche (Thompson, 2014) e ogni nodo è caratterizzato ad avere una sola foglia;
- ogni foglia è caratterizzata ad avere una lamina espansa collegata ad una guaina che avvolge il culmo.

- I nodi basali hanno la tendenza a formare ramificazioni o culmi di accestimento, chiamati anche polloni, e sviluppano radici avventizie.

Il sistema radicale è di tipo fascicolato ed è caratterizzato ad avere quattro radici seminali e radici avventizie epigee ed ipogee. Esse si sviluppano nel terreno in profondità ed in tutte le direzioni. La maggior parte dell'apparato radicale, più dell'80%, si trova nei prima 30-35 cm.

Le radici seminali, nelle prime settimane di crescita esauriscono la loro funzione, ma restano funzionali anche in seguito. Per quanto riguarda le radici avventizie ipogee, queste si sviluppano nei primi 4-5 nodi localizzati appena sotto il colletto, quindi si trovano sulla superficie del terreno; mentre quelle epigee, le radici aeree, sono emesse nei 2-3 nodi basali, solamente dopo che la pianta ha espanso 9-10 foglie.

Dal punto di vista anatomico, all'estremità di ogni radice si trova la cuffia, una struttura in grado di penetrare nel terreno senza rovinarsi. Nella zona dei peli radicali, i quali ricoprono una parte della radice, dall'esterno verso l'interno, si possono notare: tegumenti esterni, una zona corticale e un cilindro centrale contenente i tessuti di conduzione (Lorenzoni, 2007).

Il fusto o culmo, chiamato anche stocco, misura solitamente tra i 2-3 m di lunghezza. Il culmo, negli ambienti italiani, ha un diametro di 3-4 cm e possiede da 18 a 21 internodi, ma solitamente sono 14. Questi sono ravvicinati e di diametro maggiore alla base della pianta, mentre sono più allungati nella parte superiore.

I nodi sono in numero variabile e si può avere un minimo di 8-10 fino ad un massimo 22-24. Il numero di nodi minimo si trova nelle specie precoci, mentre quelle con un numero maggiore sono le specie tardive.

Le foglie sono disposte asimmetricamente sui due lati dello stocco, e per ogni nodo posto fuori da terra corrisponde una foglia.

Ciascuna foglia si compone di tre parti ben distinte:

- la guaina, la quale abbraccia quasi completamente l'internodo che si trova al di sopra del nodo originario. Si può notare a partire dallo stadio di sesta foglia quando inizia l'allungamento del culmo.
- Il lembo o lamina è la foglia vera e propria ed è di forma lanceolata con nervature longitudinali parallele di cui quella mediana è quella più grossa.
- La ligula, è un'espansione laminare a guisa di membrana incolore ed è situata tra lembo e guaina che fascia strettamente il lo stocco. Ha la funzione di ostacolare l'entrata dell'acqua o di eventuali parassiti, e permette la posizione più o meno orizzontale della lamina.

La funzione dell'epidermide è quella di proteggere i tessuti sottostanti dal disseccamento, dall'azione degli agenti atmosferici e dall'attacco di parassiti. L'epidermide, inoltre, sia per le caratteristiche delle sue pareti cellulari sia per la presenza su di essa di apparati stomatici, regola la traspirazione e gli altri scambi gassosi fra i tessuti interni alla foglia e l'ambiente esterno (Lorenzoni, 2007).

Gli stomi dono presenti sull'epidermide su entrambe le facce della foglia, ma sono presenti in numero maggiore sulla pagina inferiore. Sulla pagina inferiore ce ne sono dai 100 ai 400 per millimetro quadrato. Gli stomi sono molto importanti per la pianta poiché permettono gli scambi gassosi e ne consentono la regolazione.

4.2. Fisiologia

La quantità di sostanza organica prodotta dai vegetali è proporzionale all'efficienza con la quale l'energia del sole viene utilizzata ai fini

biosintetici. I limiti all'efficienza biosintetica sono solitamente riferiti a carenze del processo fotosintetico (source) o dal processo di traslocazione e deposito dei fotosintati (sink). La velocità di accumulo di sostanza secca dipende dall'efficienza fotosintetica e dalla superficie fogliare presente sul campo espressa dall'indice LAI (Leaf area index) = m^2 di superficie fogliare/m^2 di terreno. L'efficienza teorica del processo fotosintetico è stimabile pari al 28.6%, però tenendo conto della distribuzione della vegetazione sul terreno e delle variazioni nell'intensità luminosa si arriva ad una efficienza reale tra l'1.5 e il 2% (Lorenzoni, 2007).

5. MAIS DA GRANELLA

5.1. Ambiente di coltivazione e vocazione pedoclimatica

Nelle zone di produzione vocate per la coltura, sia dal punto di vista pedologico che climatico, è possibile ottenere adeguate produzioni con buone caratteristiche qualitative tramite una corretta gestione agronomica.
Non è consigliata la coltivazione nelle aree con ridotte sommatorie termiche, anche per gli ibridi e gli ecotipi più precoci, ed in presenza di suoli grossolani senza disponibilità irrigua e suoli salini e/o sodici.

5.2. Scelta varietale

Gli ibridi e gli ecotipi devono essere scelti in funzione delle specifiche condizioni pedoclimatiche di coltivazione, degli aspetti produttivi e del comportamento nei confronti di parassiti animali e vegetali.
Inoltre, si deve privilegiare le varietà resistenti e/o tolleranti alle principali fitopatie ed in grado di offrire ampie garanzie anche in termini di qualità e con classe FAO compatibile con l'ambiente di coltivazione.

Si possono utilizzare ecotipi anche di produzione aziendale, selezionati per le caratteristiche della granella, per la resistenza o tolleranza fitopatologica e l'adattamento climatico.

5.3. Sistemazione e preparazione del suolo

I lavori di sistemazione e preparazione del suolo alla semina, devono essere eseguiti con l'obiettivo di salvaguardare e migliorare la fertilità del suolo, evitando fenomeni erosivi e di degrado. Quindi si consiglia l'utilizzo della cartografia pedologica dell'area interessata per la pianificazione dei lavori di sistemazione e di lavorazione del suolo.

5.4. Avvicendamento colturale

Gli obiettivi della rotazione delle colture sono:

- Preservare la fertilità del suolo
- Limitare le problematiche legate alla sua stanchezza
- Limitare l'insorgenza di malattie specifiche e fitofagi
- Migliorare la qualità delle produzioni

In una rotazione quinquennale, ad esempio, con almeno tre colture differenti ed al massimo un ristoppio per ogni coltura, il mais può essere coltivato per un massimo di due volte. In altre situazioni si deve rispettare quanto previsto dalle norme tecniche generali.

5.5. Semina

Si deve adottare una semina tale da consentire da un lato il raggiungimento di rese adeguate e dall'altro di mantenere le piante in buono stato fitosanitario, ridurre l'impatto della flora infestante ed elevare l'efficienza di fertilizzanti, solitamente 70cm di distanza sull'interfila e 20cm sulla fila.

5.5.1. Alta densità, alta produttività

Le tecniche di semina ad alta densità, sviluppate da Syngenta, confermano le alte potenzialità per i maiscoltori (Syngenta Italia, 2014).

Fino agli Anni 50 si seminavano 4-5 piante mq, poiché la genetica non poteva sostenere una densità maggiore. Con il passare degli anni si arrivò fino alle 7-8 piante mq odierne, ma la genetica odierna non può più offrire incrementi produttivi significativi. Si deve quindi selezionare genetiche in grado di produrre molto di più, e Syngenta ha individuato nelle distanze 50x18 quella ottimale per la distribuzione della semente (Syngenta Italia, 2014). In questo modo il mais può sfruttare al meglio le risorse e non si trova in una situazione di stress. I trattamenti possono essere effettuati con normali trampoli attualmente in uso.

I terreni devono essere fertili e dotati di una buona disponibilità idrica. La semina deve essere, inoltre, anticipata in modo tale che la coltura possa sfuggire a momenti di stress idrico. Seminando precocemente, la fioritura avviene verso fine Giugno con condizioni di illuminazione ottime, quindi la produzione può mostrare incrementi del 15% in termini di granella e del 20% circa quanto a trinciato (Syngenta Italia, 2014).

5.6. Gestione del suolo

La gestione del suolo deve essere attuata con modalità idonee ad evitare fenomeni erosivi, favorire l'allontanamento delle acque in eccesso, aumentare e riserve idriche del suolo, ridurre i rischi di compattamento, migliorare la struttura e la fertilità del suolo.

È opportuno adottare tecniche di gestione del suolo conservative e poco dispendiose in termini energetici, fino ad attuare, dove possibile, la non lavorazione o la lavorazione minima.

Le operazioni di gestione del solo devono essere effettuate nelle opportune condizioni di tempera a seconda della granulometria, ed effettuare la lavorazione principale (aratura, ripuntatura) dei terreni pesanti, quando possibile, prima del gelo invernale per beneficiare dell'azione positiva della struttura (Regione Veneto, 2014).

5.7. Fertilizzazione

L'apporto degli elementi fertilizzanti deve mantenere e migliorare la fertilità del suolo, compensare le asportazioni delle colture e le perdite tecniche inevitabili.

In pre-semina, l'apporto di azoto (N) non può superare il 25% della dose complessiva ammessa. Si deve, inoltre, frazionare in almeno due interventi la quota azotata se superiore a 100 kg/ha; ed i concimi a lenta cessione possono essere distribuiti senza vincoli di frazionamento.

Per il fosforo (P_2O_5) ed il potassio (K_2O), la dose definita può essere superata nel caso di impiego di ammentanti organici, purché nel limite di rispetto dell'azoto (Regione Veneto, 2014).

5.8. Irrigazione

L'irrigazione deve soddisfare il fabbisogno idrico della coltura evitando di superare le capacità di campo, allo scopo di contenere lo spreco di acqua, la lisciviazione dei nutrimenti e lo sviluppo di avversità.

I volumi massimi da rispettare per intervento irrigua per ettaro sono:

- Terreno sciolto 350 mc/ha (35mm)
- Terreno medio impasto 450 mc/ha (45mm)
- Terreno argilloso 550 mc/ha (55mm)

5.9. Raccolta

Il momento della raccolta deve essere stabilito in relazione all'umidità della granella e all'andamento climatico (Regione Veneto, 2014).

6. GENETICA E MIGLIORAMENTO

6.1. Mais e genetica

La separazione delle infiorescenze maschili e femminili, detto anche monoicismo, predispone alla fecondazione incrociata e rende più agevole l'intervento dell'uomo per controllare l'impollinazione a suo piacimento (Belli, 2012). Il controllo dell'impollinazione da parte dell'uomo può essere finalizzato alla fissazione dei caratteri in linee pure omozigoti attraverso ripetute autofecondazioni, oppure alla produzione di ibridi attraverso l'incrocio forzato fra tipi contrapposti opportunamente scelti. Il mais offre una vasta gamma di caratteristiche che rispondono alle esigenze che Mendel segnalava come essenziale premessa per un proficuo svolgimento degli esperimenti genetici ossia l'esistenza di più forme del carattere, almeno due, le quali devono essere chiaramente distinguibili tra di loro, stabili nell'espressione e facili da riconoscere. Casi simili nel mais si possono trovare sia carico dell'architettura della pianta intera, per esempio altezza normale-nano, sia nell'aspetto dei suoi organi, ad esempio foglia verde uniforme-verde striato, cariosside con superficie liscia-grinzosa. Oltre alle caratteristiche sopra citate, il mais gode di ulteriori privilegi come materiale sperimentale. Il suo patrimonio cromosomico è costituito da un numero piuttosto basso di elementi, infatti il numero di base n=10 contro 14 e 21 dei frumenti duri e teneri, la cui osservazione al microscopio appare molto più facile che in altre importanti specie agrarie. Il patrimonio genetico contenuto all'interno dei cromosomi del mais

presenta dimensioni medie se paragonate ad altre specie vegetali. Infatti la dimensione del genoma varia da 2.3 a 3.3 miliardi di basi. Sia per riuscire a costruire le mappe sia per capire l'ereditarietà di un carattere, è indispensabile che per un gene si abbiano due forme alternative facilmente distinguibili tra di loro (Belli, 2012). Solitamente si contrappone la forma più comunemente conosciuta con le sue varianti meno diffuse. Sono diversi gli elementi a carico del materiale ereditario che portano alla comparsa delle mutazioni: possono riguardare un singolo o più nucleotidi a seconda della dimensione, o implicare rimaneggiamenti di vara ampiezza di uno o più nucleotidi. Le popolazioni potranno cambiare la loro composizione attraverso le generazioni in modo da corrispondere sempre al meglio alle esigenze di riprodursi e diffondersi in relazione alle difficoltà imposte dalle modificazioni ambientali (Lorenzoni, 2007).

6.2. Miglioramento genetico

Le scelte dell'uomo appaiono subito decise ed efficaci. Dall'inizio dell'addomesticamento del mais, le dimensioni della spiga sono aumentate e questo ci fa capire l'intento di un aumento della produttività, attuato dedicando alla riproduzione degli individui ritenuti migliori all'interno della popolazione coltivata. La scelta dei materiali va a cadere su materiali con una elevata variabilità genetica ed ereditaria. Per quanto riguarda il miglioramento genetico se avviene una autofecondazione, si promuove l'omozigosi e si può notare la manifestazione di effetti negativi di alleli recessivi. Solamente le linee migliori andranno a costituire la popolazione che nel complesso risulterà superiore rispetto a quella di origine come comportamento generale e per gli specifici caratteri oggetto di attenzione. Per quanto riguarda la cariosside, si è notato che questa è

molto sensibile alla selezione, in quanto si è verificato un aumento del contenuto in proteine.

Per quanto riguarda gli ibridi, la migliore evidenza delle potenzialità della selezione per linea pura emergerà quando si presenteranno sul mercato del seme di mais le varietà ibride. Fin dall'antichità si sapeva che l'incrocio tra tipi di origine diversa dà discendenti più robusti dei genitori. Nel mais in particolare, incrociando tra di loro linee pure, spesso si ottiene nella prima generazione filiale (F1) una manifestazione di lussureggiamento vegetativo molto evidente. L'impiego come genitori di linee pure, garantisce l'uniformità degli individui F1, in quanto questi hanno tutti lo stesso genotipo e si ha una massimizzazione del risultato produttivo. Successivamente, a seguito dell'autofecondazione si ha una depressione da incrocio e si hanno le generazioni da F2 a F8 (Fig. 2), le quali non avranno più una massimizzazione del risultato, ma si ha un calo continuo. Ad ogni ciclo la qualità complessiva della popolazione migliora e la probabilità di estrarne progenie migliori aumenta.

Figura 2 Effetto dell'eterosi e della depressione da incrocio del mais partendo da due linee pure (P_1 e P_2) fino ad arrivare alla generazione filiale F_8

7. PATOLOGIE DEL MAIS

Il mais può essere colpito da svariate malattie, ma quelle di maggior interesse agronomico sono dovute principalmente a funghi e Oomiceti, ed in misura minore da virus, sebbene anche batteri e fitoplasmi possono colpire la coltura.

Alcune tra le principali malattie del mais sono: fusariosi, ruggine, nanismo, mosaico, carbone e marciume.

7.1. Fusariosi della spiga

La fusariosi della spiga del mais è una sindrome causata da diverse specie fungine appartenenti ai generi *Fusarium* e *Microdochium.*

Sulla maggior parte delle piante ospiti, la comparsa dei sintomi avviene nel periodo compreso tra la spigatura e la maturazione latteo-cerosa. Piccole macchie brunastre compaiono su glume e talvolta sul rachide. L'alterazione può riguardare poche spighette che appaiono decolorate e disseccano precocemente. Le cariossidi sono striminzite e decolorate (Bugiani, 2013).

I danni causati dalla malattia sono molto vari, in quanto si possono avere: perdita di produzione dovuto al minor numero di cariossidi, peggioramento delle caratteristiche qualitative della granella (Fig. 3), diminuzione della germinabilità e del vigore dei semi ed infine un accumulo di micotossine (Bugiani, 2013).

Figura 3 Esempio di spiga affetta da Fusariosi

7.2. Ruggine (Fig. 4)

Vengono definite "ruggini" le malattie che comportano la comparsa su un ospite infetto di ammassi di spore di colore variabile. Gli agenti delle ruggini appartengono al *phylum Basidiomicota* e sono compresi nell'ordine *Uredinales.*

La ruggine determina la comparsa di pustole brunastre, che decorrono parallele alle nervature su entrambe le lamine fogliari. I sintomi compaiono su foglie, a volte precedute da una leggera clorosi, sulle glume, sui culmi e sulle lamine.

Le specie afferenti a tale ordine sono parassiti obbligati che presentano un ciclo vitale molto complesso, durante il quale possono differenziare su due piante ospiti tassonomicamente molto distinti l'una dall'altra (Belli, 2013)

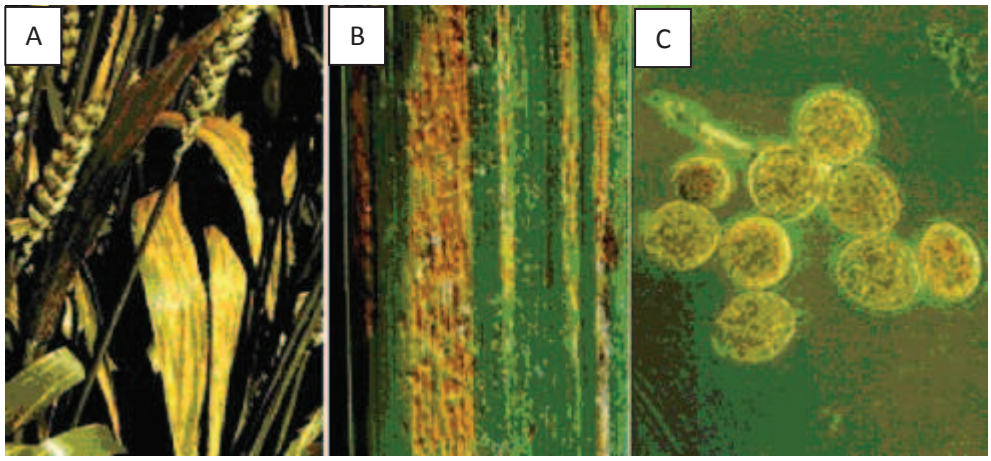

Figura 4 Ruggine del mais dovuta da Basidiomicota. Attacco a spiga di frumento (A), foglia di mais (B), e batterio isolato (C).

7.3 Nanismo

Il nanismo del mais è dovuto al virus chiamato MRDV (Maize rough dwarf virus). Questa è una patologia la quale fa si che le piante di mais rimangono nane e, soprattutto, sterili, con un prodotto finale pressoché uguale a zero (Fig. 5).

Le cause di questa malattia possono essere imputate al fatto che negli ultimi anni non sono più stati utilizzati neonicotinoidi, i quali sono una classe di insetticidi utilizzati per proteggere i semi da alcune malattie (Milne, 1977).

Figura 5 Differenza tra pinate affette da nanismo e piante sane (MRDV)

7.4. Mosaico

Il Mosaico è causato da un virus denominato SBWMV (Soil Borne Wheat Mosaic Virus).

Questo patogeno è in grado di colpire diverse graminacee. Oltre che infettare il frumento tenero e mais, lo si ritrova anche su specie affini al frumento.

Il sintomo della malattia è dato dall'irregolare distribuzione di aree gialle o clorotiche (Fig. 6), generalmente poco estese e più o meno tondeggianti,

frammiste ad aree normalmente verdi sull'intera lamina fogliare (Belli, 2012).

Figura 6 Foglie di mais affette da mosaico (SBMW)

7.5. Carbone

L'agente della malattia è il basidiomicete *Ustilago maydis.* È una malattia fungina che si manifesta su tutte le parti epigee della pianta con formazioni ipertrofiche (tumori) di forma e diametro assai variabili. Dapprima le masse tumorali appaiono bianche e carnose per poi assumere un colore violaceo e quindi nero (Fig. 7). Il carbone causa un minor sviluppo della pianta accompagnato da sterilità o da produzione di spighe di minori dimensioni e solo raramente si può arrivare alla morte della pianta (Donaldson et al., 2013).

Figura 7 Cariosside attaccata da carbone (Ustilago maydis)

7.6. Marciume dello stocco

Il marciume dello stocco è dato da *Fusarium graminearum.*

I sintomi tipici del marciume sono il rammollimento del culmo, soprattutto nella parte basale, e la sua disgregazione, i quali possono portare alla morte della pianta. Questo causa allettamenti e stroncature del culmo, spighe ridotte, cariossidi piccole e striminzite e formazione di muffa sulla spiga (Belli, 2012).

8. *ASPERGILLUS FLAVUS*

Il genere *Aspergillus* comprende più di 185 specie, raccolte in 18 gruppi, e quelle attualmente conosciute come agenti di infezioni nell'uomo sono circa 20. *Aspergillus* fu per la prima volta catalogato nel 1729 dal sacerdote e biologo italiano Pier Antonio Micheli.

Le specie appartenenti a questo genere sono fortemente aerobiche e crescono in quasi tutti gli ambienti ricchi di ossigeno, solitamente sulla superficie del substrato. Molte specie si sviluppano a danno di cibi ricchi di amido, come i cereali, semi di cotone, arachidi e noci.

Tutti gli *Aspergillus* sono caratterizzati dalla loro particolare modalità di riproduzione conidiale: presenza di un conidioforo terminante con un rigonfiamento denominati vescicola (Fig. 8); su quest'ultima si formano le fialidi. Ogni fialide produce una catena di spore ramificate. L'insieme della vescicola, delle fialidi e delle spore prende il nome di testa aspergillare. Le spore hanno un tallo e una morfologia tali da favorire sia la loro disseminazione sia il loro passaggio attraverso il tratto respiratorio fino agli alveoli polmonari, e questo in quanto le spore hanno una forma tondeggiante e rugosa.

L'*Aspergillus flavus* è il più famoso e studiato del suo genere, sia perché è il maggior produttore di aflatossine in fase di pre-raccolta che in post-

raccolta, sia perché è la causa di aspergillosi nell'uomo. È un patogeno di numerose specie vegetali e animali, compresi gli esseri umani e animali domestici.

L'infezione avviene attraverso le sete o le ferite delle cariossidi, quando l'umidità della granella scende al di sotto del 28%. La loro moltiplicazione avviene specialmente in condizioni di stress idrico.

Le colonie di *A. flavus* sono masse polverose di spore giallo-verde. *A. flavus* trova il suo sviluppo ideale a temperature calde, con un optimum tra i 32-36 °C, mentre il suo sviluppo risulta ridotto a temperature inferiori a 12 °C e superiori a 42 °C (Causin, 2006). Il parametro fondamentale per la sua crescita risulta essere l'umidità, dove trova la condizione ottimale nell'intervallo 0.86 e 0.96 di a_w (water activity) (Vujanovic et al., 2001).

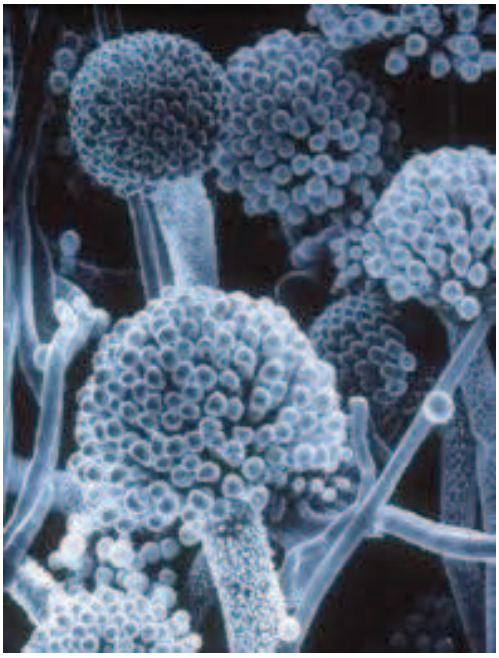

Figura 8 Testa conidiale di *A. flavus*

8.1. Importanza per l'uomo

Alcune specie di *Aspergillus*, in particolare *Aspergillus fumigatus* e *A. flavus*, possono produrre infezioni nell'uomo e negli animali, note con il nome di Aspergillosi. Queste infezioni colpiscono principalmente l'apparato respiratorio, dal quale, in particolari casi, possono estendersi ad altri organi.

L'*Aspergillus* può danneggiare una serie di alimenti che non vengono conservati sotto vuoto, soprattutto se ricchi di amidi (Fig. 9).

Il fungo produce aflatossine possono essere presenti nel latte animale. L'aflatossina, legata alla frazione proteica del latte, viene secreta dalle ghiandole mammarie dei bovini, ed è destinata inevitabilmente ad essere ingerita dall'uomo, sia con il latte che con i suo derivati, in quanto nessun trattamento è in grado di eliminarla. Pertanto, l'aflatossina responsabile di questo non è prodotta direttamente da *Aspergillus*, ma deriva dal metabolismo degli animali che si nutrono di alimenti contaminati da *Aspergillus* (Haouet et al., 2003). Infatti, sono stati effettuati studi sulla possibile insorgenza di micotossine in trinciati di mais coperti con film biodegradabili. Da questi studi è risultato che sia con l'utilizzo di teli biodegradabili sia con l'utilizzo di teli standard non si sono sviluppate aflatossine, mentre si sono sviluppate altre micotossine (Prelle A. et al., 2013)

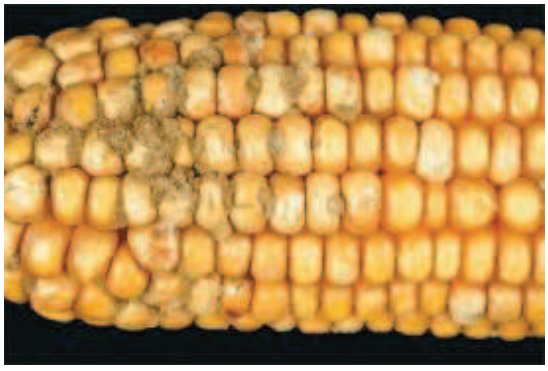

Figura 9 Cariosside visibilmente contaminata da *Aspergillus flavus*

8.2. Attacco fungino in Indiana, Missouri, Illinois e Tennessee a causa di condizioni climatiche estreme

L'anno 2013 è stato un anno molto caldo, il quale ha portato le piante di mais a stress idrici durante il periodo di fioritura e maturazione. Stress idrici e lesioni alla coltura sono le principali cause dell'attacco da parte di insetti e patogeni e una via d'accesso per funghi.

In Indiana, Illinois, Missouri e Tennessee, sono state trovate tracce di contaminazione da parte di patogeni, le quali causano una riduzione del rendimento della coltura e della qualità del mais (Harrington, 2013). A causa del rinvenimento di tracce di contaminazione, sono state effettuate analisi per verificare eventuali tracce di micotossine. Se vi sono tracce di queste e vi è la presenza di micelio superiore a 10.000 ufc/grammo riconducibile ad *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, è necessario effettuare uno screening delle micotossine.

Per prevenire lo sviluppo delle tossine, è necessario raccogliere il materiale con il 20% di umidità e farlo asciugare fino al raggiungimento del 15% di umidità. Inoltre, è importante anche l'essicazione del mais, in quanto porta a ridurre ulteriormente la proliferazione di muffe esistenti (Harrington, 2013).

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare la risposta di diverse inbred lines (linee pure) di mais all'attacco di *Aspergillus flavus*. Le linee prese in esame sono linee già studiate per quanto riguarda la resistenza/suscettibilità a *Fusarium verticilioides* e caratterizzate per proprietà nutraceutiche. Quindi, la scelta di valutare la risposta al fungo tossigeno *A. flavus* è stata effettuata al fine di individuare genotipi con una doppia resistenza e per tanto con una elevata qualità della granella. Questo fungo è presente nell'areale maidicolo italiano soprattutto nelle annate calde e siccitose.

A tal fine, il lavoro è stato suddiviso in due parti:

- Valutazione della risposta di quattordici linee pure all'attacco fungino *(A. flavus),* tramite inoculo artificiale in prove di campo
- Valutazione della contaminazione fungina interna delle cariossidi linee inbred prese in esame.

MATERIALI E METODI

1. PREPARAZIONE DEL CAMPO

Il campo di mais, sia dell'azienda di Bergamo che dell'azienda di Sant'Angelo Lodigiano, è stato suddiviso in sei parcelle, con densità di semina pari a 7 piante/m^2, replicate dieci volte per genotipo. L'intero perimetro del campo è stato circondato da due parcelle di bordo di contenimento costituito da un ibrido di mais di elevata altezza, utile per proteggere le linee inbred da eventuali venti laterali (Fig 10).

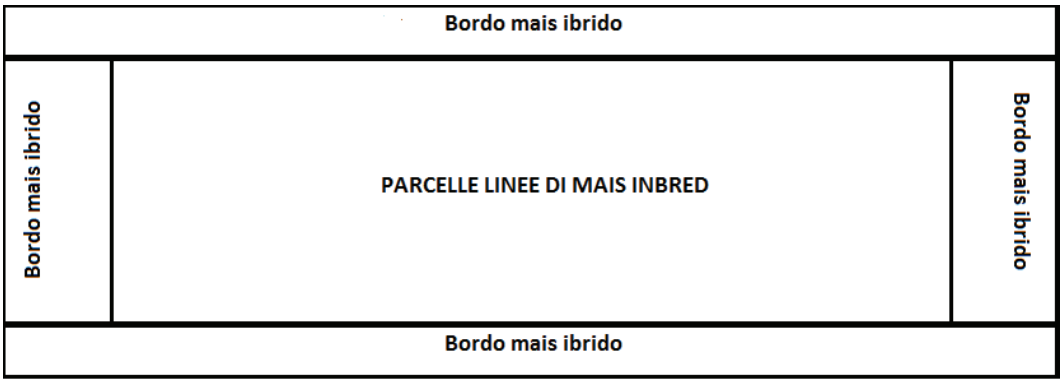

Figura 10. Organizzazione schematica del campo

Il campo di mais di Bergamo è costituito da un terreno di medio impasto con presenza di scheletro. La concimazione del terreno viene fatta attraverso l'utilizzo di: N=280u.f., P_2O_5=115u.f. e K_2O= 120u.f.. A Bergamo i trattamenti di diserbo vengono effettuati solitamente durante il periodo di pre-emergenza, ma in casi particolari vengono effettuati anche durante la post-emergenza. In questi terreni vengono effettuate circa sette irrigazioni utilizzando il metodo dell'infiltrazione laterale, inoltre viene effettuata anche la rincalzatura, ossia la rimozione del terreno dall'interfila. In questo campo vi è una rotazione annuale di mais con soia. La semina

dell'anno 2013 è avvenuta il 14 maggio, mentre la raccolta è avvenuta l'8 novembre.

Il campo Sant'Angelo Lodigiano, invece, è costituito da un terreno franco-limoso e le unità fertilizzanti per questo terreno sono: liquame di suino 50 t/ha, N=202u.f., P_2O_5=46u.f. e K_2O=54u.f.; i diserbi in questa località avvengono sia in pre-emergenza che in post-emergenza. Le irrigazioni vengono effettuate tre volte scorrimento; inoltre non si hanno rotazioni quindi si ha una monocoltura mais-mais. Il campo è stato seminato il 22 maggio 2013, e la raccolta è avvenuta l'11 novembre 2013.

2. MATERIALI UTILIZZATI

Per effettuare lo screening, oggetto di questa tesi, sono state utilizzate quattordici linee inbred provenienti dalla banca del germoplasma presente nell'Unità di Ricerca per la Maiscoltura (CRA-MAC): Lo18, Lo21, Lo43, Lo51 w, Lo186, Lo241, Lo295, Lo309, Lo387, Lo435, Lo577, Lo578, Lo863 e B73. Queste linee sono state seminate in due località Bergamo (BG) e Sant'Angelo Lodigiano in provincia di Lodi (SAL) nell'annata maidicola 2013, lasciando l'impollinazione libera. Le spighe primarie di questi genotipi sono state inoculate artificialmente avvalendosi di sospensioni di spore del ceppo tossigen di *Aspergillus flavus* in uso presso il laboratorio di patologia dell'Unità di Ricerca per la Maiscoltura.

Il materiale biologico utilizzato per l'inoculo, deriva da colture madri in cui il micelio è stato inoculato su terreno agar-acqua, e mantenuto ad una temperatura di 4 °C, in modo da evitare che esso possa espandersi in maniera incontrollata. Da queste madri si recuperano piccole porzioni di micelio per la preparazione di sottocolture.

Tutte le operazioni di manipolazione del fungo vanno eseguite sotto cappa bio-havard per evitare cross-contaminazioni.

2.1. Terreno agar-acqua

- 15g di agar per litro di acqua
- Imbottigliare e autoclavare per 20 minuti a 120 °C
- Piastrare con terreno ancora caldo in capsule Petri a 1\2 volume sotto cappa
- Lasciar raffreddare e quindi solidificare il terreno
- Conservare le piastre chiuse a 4 °C capovolte

Per quanto riguarda la preparazione di sottocolture di *Aspergillus flavus* bisogna prelevare dalle piastre Petri su cui è cresciuto il fungo un quadrato di circa 1 cm di micelio in attiva crescita, e trasferirlo mediante l'utilizzo di un bisturi, sterilizzato con l'ausilio di una fiamma libera, in una nuova piastra Petri contenente terreno PDA fertile. Dopo aver effettuato questa operazione, bisogna sigillare la piastra con parafilm e riporla in incubatore impostato a temperatura 26 °C, umidità 60%, 16 ore di luce su 24 per un minimo di 7 giorni. Infine osservare settimanalmente la crescita regolare del micelio.

2.2. Terreno PDA

- 39g di PDA per litro di acqua
- Imbottigliare e autoclavare per 20 minuti a 120 °C
- Piastrare con terreno ancora caldo in capsule Petri sotto cappa
- Lasciar raffreddare e quindi solidificare il terreno
- Conservare le piastre chiuse a 4 °C capovolte

3. METODI

3.1. Tecniche di inoculo fungino

Le tecniche di inoculo artificiale sono riconducibili a due tipi: tramite sete non invasiva spray e tramite sete invasiva siringa ed infine tramite cariossidi invasiva (Balconi et al., 2013).

Nella prima tecnica la sospensione di spore viene vaporizzata sulle sete della spiga primaria, 4-8 giorni dopo l'impollinazione; nella seconda tecnica, invece, la sospensione viene iniettata nel canale delle sete della spiga primaria 4-8 giorni dopo l'impollinazione. Infine nell'ultima modalità di inoculo la sospensione di spore viene veicolata alla spiga primaria tramite un'incisione di tre cariossidi 15-20 giorni dopo l'impollinazione. La gravità dell'attacco fungino viene valutata al momento della raccolta, tramite la scala di valutazione basata sulla percentuale di cariossidi contaminate, le quali portano segni visivi della contaminazione, assegnando un punteggio da 1 a 7 (Disease Severity Rating).

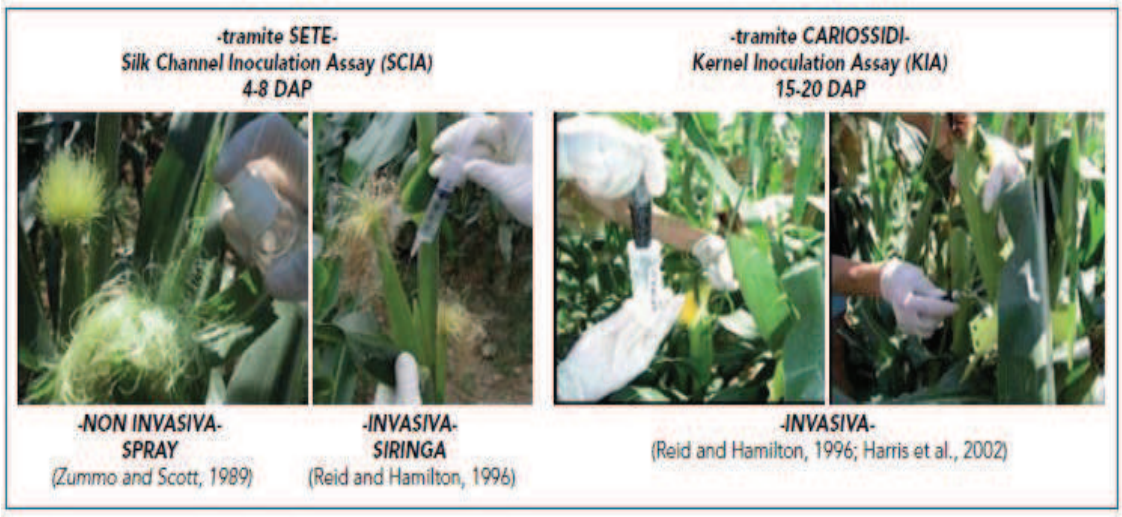

Figura 11 Tecniche di inoculo fungino. A sinistra abbiamo l'inoculo tramite sete (SCIA), mentre a destra quello tramite cariossidi (KIA) da Balconi et al., 2013

Per questi metodi di inoculo è necessario utilizzare una concentrazione nota di spore per limitare le possibili variabili (in questo caso è stata utilizzata una concentrazione di 10^6 spore/ml). Il metodo di inoculo utilizzato è stato il metodo invasivo KIA, in quanto simula un danno sulla spiga che permetterebbe l'ingresso del patogeno. Questi danni in natura possono essere causati da agenti atmosferici come la grandine o da insetti. L'inoculo è stato eseguito nella zona medio/basale della spiga evitando così di confondere l'inoculo artificiale da quello ambientale.

In questo lavoro sono stati considerati tre tipi di trattamenti:

- non inoculato (non-inoc) controllo ambientale
- acqua sterile (H_2O) controllo interno al metodo
- Aspergillus (inoc)

3.2. Preparazione del materiale

Ad avvenuta maturazione fisiologica, verificabile visibilmente rimuovendo una cariosside della spiga e controllando la presenza del cosiddetto "black layer", un piccolo punto nero che compare a livello del punto di connessione tra la cariosside ed il tutolo, la cui presenza determina la fine dell'apporto di nutrimenti di riserva diretti all'embrione. La raccolta è avvenuta manualmente, separando le spighe per genotipo e trattamento. Successivamente le spighe sono state private delle brattee.

3.3.Valutazione visiva della contaminazione da *Aspergillus flavus*

3.3.1. Stima della contaminazione ambientale (Visual Rating)

Esistono diversi metodi per valutare il grado di infezione fungina dopo l'inoculo. Il metodo utilizzato per stimare la contaminazione ambientale in questo lavoro di tesi, si avvale della scala di valutazione utilizzata da Balconi et al. (2014), la quale permette lo screening di un grande numero di genotipi. Tale scala di valutazione è basata sulla percentuale di cariossidi con visibili sintomi di infezione, come ad esempio la crescita di marciumi e micelio (Fig. 12).

Punteggio relativo all'area di estensione del micelio sulla spiga:

DSR (Disease Severity Rating)

1 = 0% della superficie della spiga presenta infezione fungina

2 = 1-3% della superficie della spiga presenta infezione fungina

3 = 4-10% della superficie della spiga presenta infezione fungina

4 = 11-25% della superficie della spiga presenta infezione fungina

5 = 25-50% della superficie della spiga presenta infezione fungina

6 = 51-75% della superficie della spiga presenta infezione fungina

7 = 76-100% della superficie della spiga presenta infezione fungina

DSR

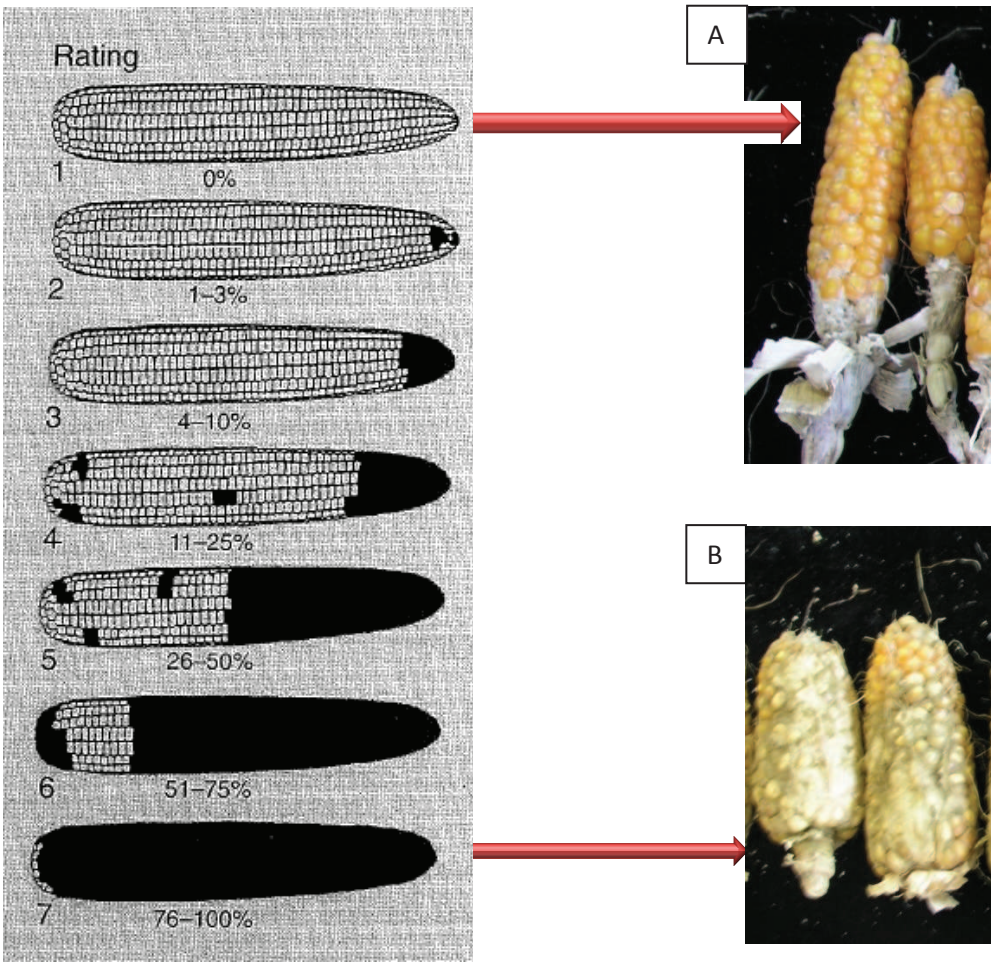

Figura 12 Scala di Visual Rating con classificazione da 1 (0% di infezione) a 7 (76-100% di contaminazione). Nella figura A è riportato un esempio di contaminazione pari al valore 1 nella scala, nella figura B è riportato un esempio di cariossidi contaminate al grado 7.

4. VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE AL PUNTO DI INOCULO (NIK)

Per valutare la contaminazione causata dall'inoculo artificiale, sono state contate le cariossidi che presentavano sintomi visaibili di un attacco da parte dell'*A. flavus* (Number of Infected Kernels) (Fig. 13).

Una volta eseguite le valutazioni visive sulle spighe, questi materiali vengono posti in essiccatoio per sette giorni, in modo da ridurre l'umidità delle cariossidi al 13%.

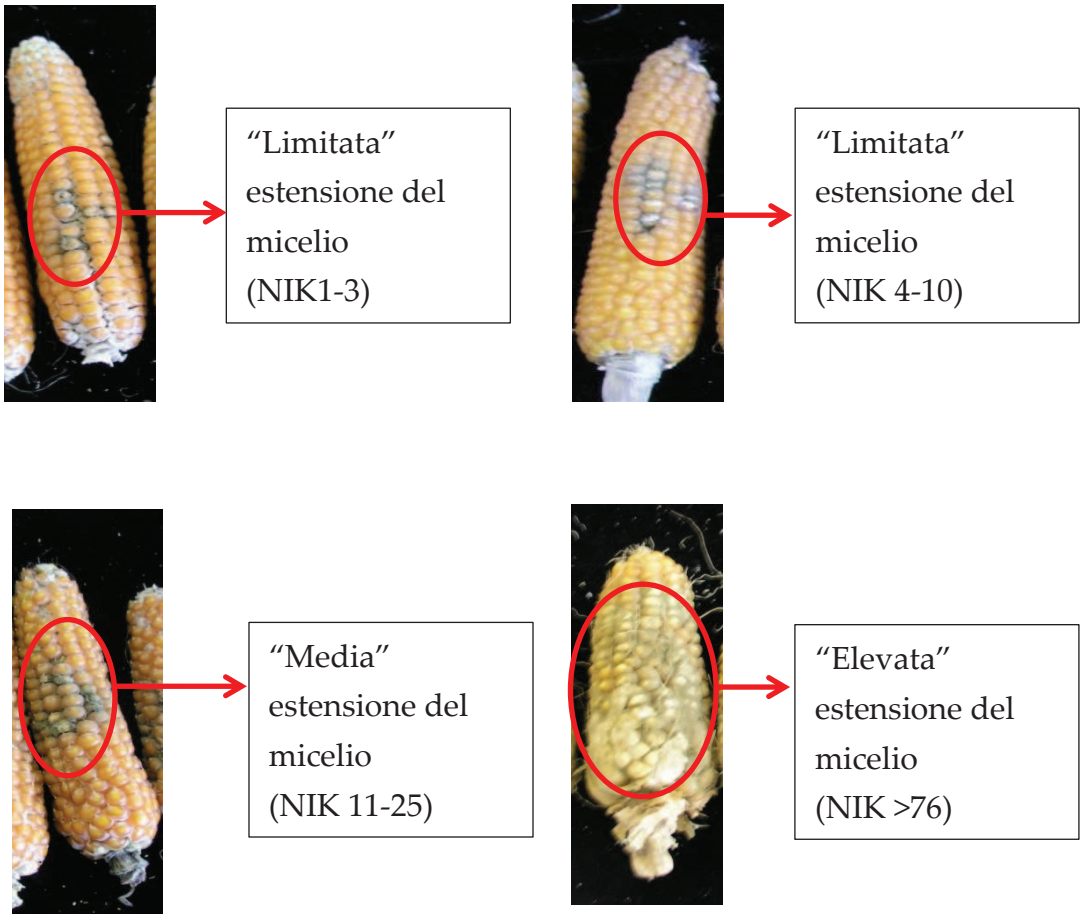

Figura 13. Esempi di contaminazione differenziale al punto di inoculo (NIK)

5. SAGGIO DI VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE INTERNA

Il test permette di vedere se cariossidi che apparentemente non presentano una contaminazione visibile, sono contaminate internamente.

- Sgranare le spighe
- Preparare le piastre con il terreno DRBC – agar (Dichloran-Rose Bengal-Chloramphenicol)
- Scegliere casualmente un numero di cariossidi per ogni genotipo divise per trattamento
- Prendere le cariossidi che si vogliono testare e avvolgerle in garze sterili
- Sterilizzarle superficialmente nelle seguenti tre fasi:
    - Immergere per due minuti in ipoclorito di sodio al 2%
    - Sciacquare per due minuti in una soluzione al 90% di etanolo
    - Lavare con acqua sterile più volte
- Coprire la base della cappa con carta assorbente sterile
- Aprire le garze e fare asciugare le cariossidi per almeno un'ora
- Mettere cinque cariossidi per tipo in ogni piastra incastrandole nel terreno tenendo l'embrione verso l'alto, il tutto replicato cinque volte
- Sigillare le piastre con parafilm e mettere in camera di incubazione a 26 °C al 60% di umidità per sette giorni con 16 ore di luce su 24

Per questo tipo di test sono state preparate cinque piastre con cinque cariossidi per piastra per ogni genotipo e trattamento

Preparazione terreno DRBC-agar

Peptone	5g/l
Glucosio	10g/l
KH_2PO_4	1 g/l
$MgSO_47H_2O$	0,5 g/l
Agar	15 g/l
MES	½ cucchiaio – tampone per stabilizzare il pH

- Portare il pH a 5.6, autoclavare la soluzione per 15 min a 121 °C. raffreddare e aggiungere:

Dichloran	0.002 g/l
Rose-Bengal	0.025 g/l
Chloranphenicolo	0.1 g/l

- Miscelare e piastrare velocemente

Al termine di queste operazioni le piastre vengono osservate sotto piastra e vengono registrate le cariossidi che presentano una contaminazione da *A. flavus.*

A

B

Figura 14. Nella fotografia A si vede la preparazione delle terreno colturale DRBC; nella figura B si vedono piastre Petri con terreno colturale

RISULTATI

1. VALUTAZIUONE VISIVA DELLA CONTAMINAZIONE DA *ASPERGILLUS FLAVUS*

La valutazione visiva è stata effettuata attraverso due parametri: il DSR (Disease Severity Rating), per la stima della contaminazione ambientale ed il NIK (Number of Infected Kernels) per la stima della contaminazione al punto di inoculo.

Per valutare la contaminazione ambientale dei genotipi presi in esame, è stata effettuata una stima di quest'ultimo utilizzando una scala di visual rating (Balconi et al. 2014), la quale fa riferimento alla percentuale di spiga contaminata. La scala è formata da sette valori (da uno a sette) corrispondenti rispettivamente a 0% e 76%-100% di copertura della spiga da parte del micelio visibile (come riportato in materiali e metodi).

La valutazione della contaminazione al punto di inoculo è stata effettata tramite la conta diretta delle singole cariossidi che presentano sintomi visibili riconducibili ad una infezione da *A. flavus.*

1.1. Valutazione contaminazione ambientale nelle due località

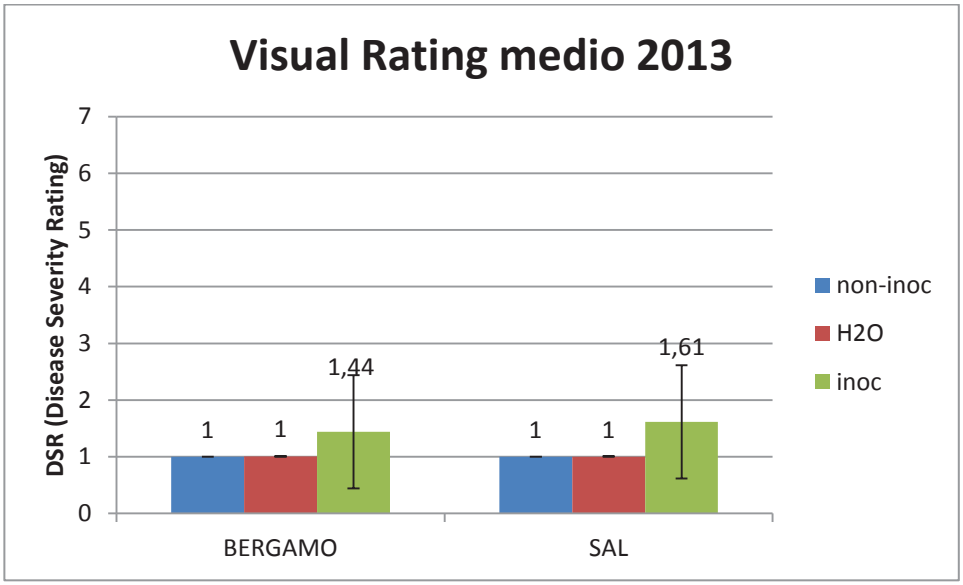

Figura 15. Valori medi delle due località, Bergamo e Sant'Angelo Lodigiano, relativo al DSR per tutti e tre i trattamenti.

Il grafico riportato in Fig. 15 riporta sull'asse delle ordinate la scala di DSR (Disease Severity Rating) con i valori da 1 a 7 relativi alla percentuale dell'area della spiga con sintomi visibili di contaminazione; mentre l'asse delle ascisse riporta le due località. L'andamento medio dei tre trattamenti è riportato nel grafico attraverso barre di colore blu per il non inoculato, di colore rosso per l'inoculo con acqua e di colore verde per l'inoculo con *A. flavus.* Dal grafico si può notare che l'andamento medio per il non inoculato, sia per Bergamo che per Sant'Angelo Lodigiano, è pari a uno che sulla scala di rating indica una contaminazione ambientale pari a 0%. Questo accade anche per le spighe inoculate con acqua, che in entrambe le località mostrano un valore di uno.

Per quanto riguarda, invece, i campioni inoculati con il fungo tossigeno *A. flavus*, si può notare che la contaminazione maggiore è avvenuta a Sant'Angelo Lodigiano con un valore di 1.61, mentre per Bergamo risulta

un valore medio di 1.44; questi valori, per entrambe le località, indicano una contaminazione ambientale fino al 3% della superficie della spiga.

1.2. Valutazione contaminazione ambientale nella località di Bergamo

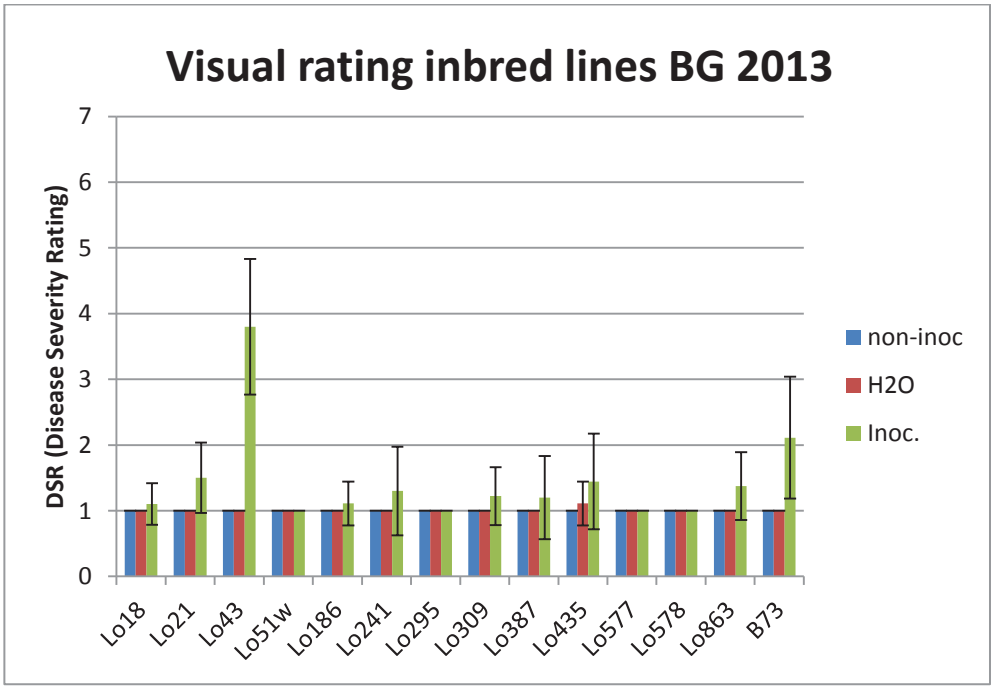

Figura 16. Grado di contaminazione dei genotipi presi in esame

Nel grafico di Fig. 16 vengono riportati sull'asse delle ascisse tutti i genotipi oggetto di studio nella località di Bergamo, mentre sulle ordinate è riportata la scala di rating con valori da 1 a 7.

In questo grafico possiamo notare che per tutti i diversi genotipi non inoculati la contaminazione ambientale è risultata pari a 0%, quindi pari a 1 nella scala DSR. Gli stessi valori si hanno anche per quelli inoculati con acqua. Per quelli inoculati con il fungo si nota un andamento più o meno costante attorno ad uno, tranne che per due genotipi. Questi genotipi sono Lo43 con un valore molto elevato, di circa quattro, (ossia una contaminazione ambientale che varia dall'11% al 25%) e B73 dove si ha

una contaminazione poco superiore a due, corrispondente ad una contaminazione ambientale tra l'1% e il 3%.

1.3. Valutazione contaminazione ambientale nella località si Sant'Angelo Lodigiano

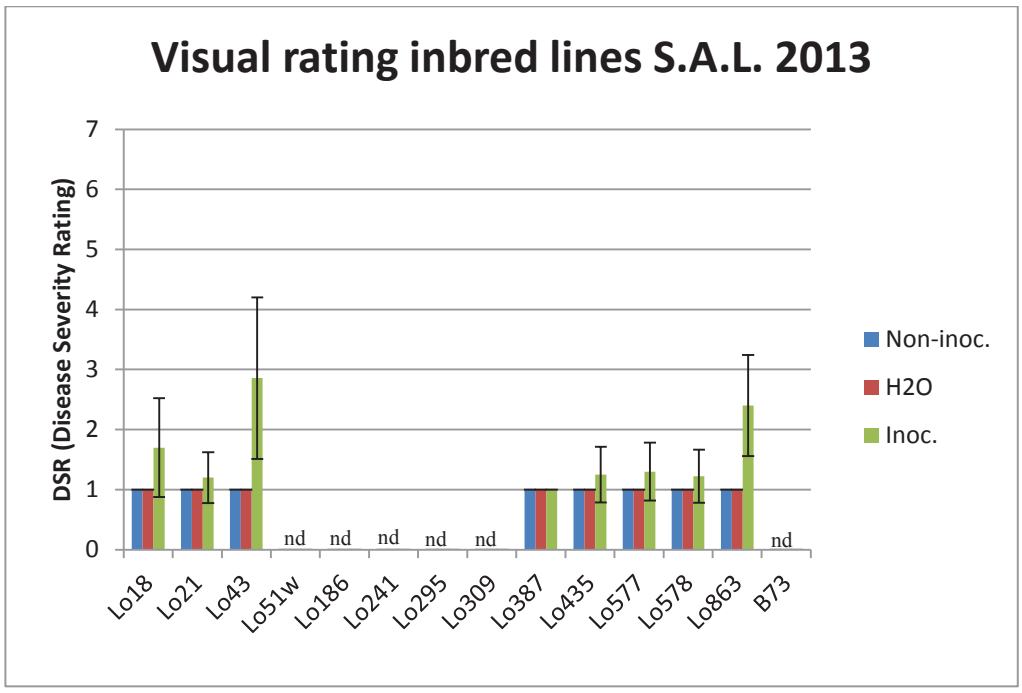

Figura 17. Grado di contaminazione dei genotipi presi in esame (nd: materiale non disponibile

Nel grafico di Fig. 17 sull'asse delle ordinate ancora la scala rating, mentre sull'asse delle ascisse i genotipi presi in esame nella località di Sant'Angelo Lodigiano. Si nota subito che molti genotipi sono mancanti (nd), questo è dovuto a problematiche ambientali legate all'annata maidicola 2013 che non ha permesso, per alcuni genotipi il raggiungimento della maturazione fisiologica e conseguentemente l'ottenimento di materiale necessario per effettuare le valutazioni. Dal grafico si può notare che i genotipi non inoculati non hanno avuto una contaminazione ambientale e quindi hanno

ottenuto un valore pari a uno; analogamente, i materiali inoculati con acqua non hanno subito contaminazione. Riguardo ai genotipi inoculati con il fungo tossigeno *A. flavus*, possiamo notare che la maggior parte non presenta una contaminazione, tranne alcuni: Lo18 con un punteggio di all'incirca 2; Lo 43 con un valore di circa 3, assimilabile a 3-10% di contaminazione, e Lo863 con un valore poco superiore a 2, indicativo quindi di una estensione da 1% a 3% di micelio sulla spiga.

1.4. Confronto tra le due località di tutti i genotipi presi in esame

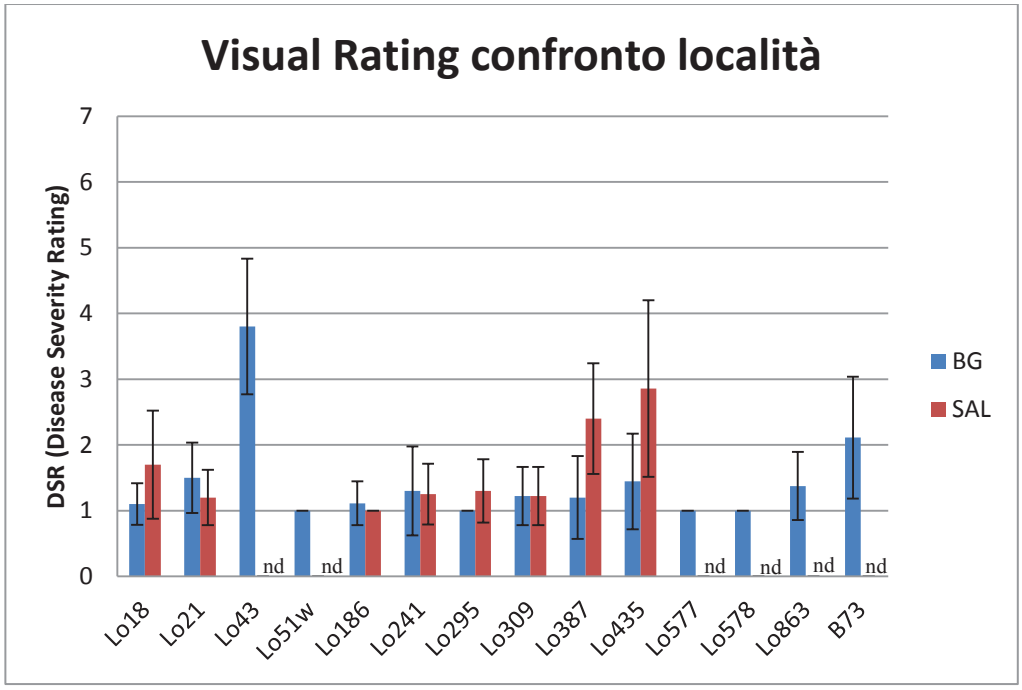

Figura 18. Confronto tra Bergamo e Sant'Angelo Lodigiano per tutti i genotipi presi in esame (nd: materiale non disponibile)

Nel grafico di Fig.18, sono riportati sull'asse delle ordinate i valori del Disease Severity Rating; sull'asse delle ascisse tutti i genotipi sotto studio nelle due località di sperimentazione. Si può notare che i genotipi non si

differenziano molto tra le due località, dove è possibile effettuare il confronto. Gli unici genotipi che presentano una sostanziale differenza tra le due località sono Lo387 e Lo435, i quali presentano un punteggio maggiore a Sant'Angelo Lodigiano, rispettivamente di 2.4 (4-10%) e 2.85 (4-10%), rispetto a Bergamo dove hanno un punteggio di 1.2 (1-3%) e 1.44 (1-3%).

1.5. Valutazione contaminazione media al punto di inoculo nelle due località

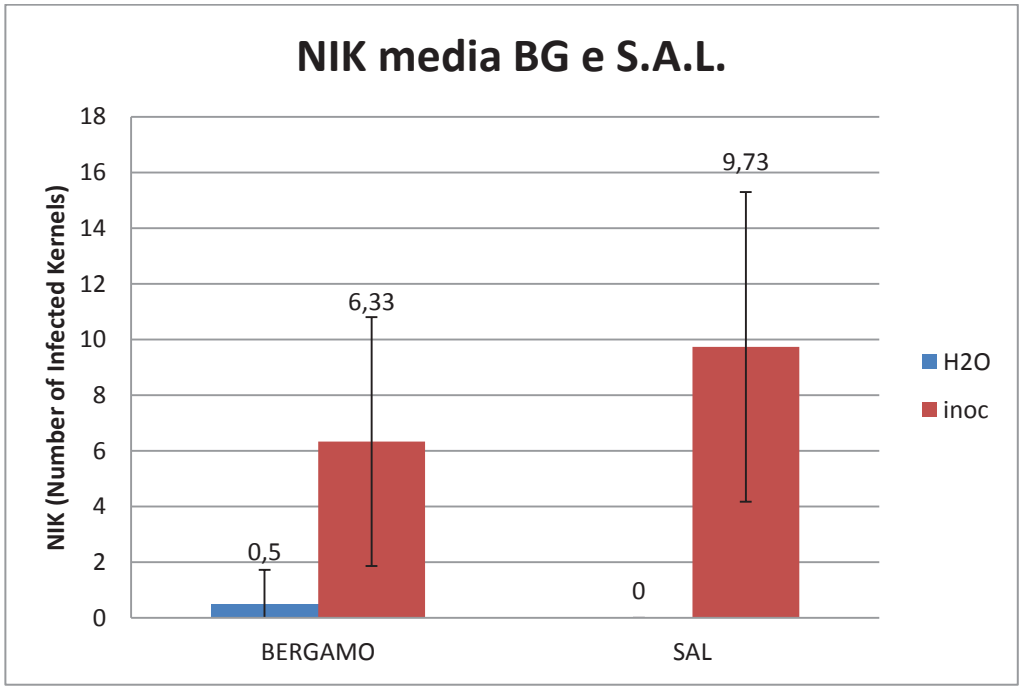

Figura 19. Grafico di confronto tra le due località riguardo al numero di cariossidi contaminate al punto di inoculo

Nel grafico di Fig. 19, è riportato sull'asse delle ordinate il NIK (Number of Infected Kernels), mentre sull'asse delle ascisse sono riportati i trattamenti di inoculo con acqua e *A. flavus* nelle due località. Dal grafico

si può notare che, per quanto riguarda i genotipi inoculati con acqua, a Sant'Angelo Lodigiano non è stata registrata alcuna contaminazione, mentre a Bergamo si ha un piccolo numero di cariossidi infette. Per quanto concerne i genotipi inoculati con *A. flavus*, possiamo notare la contaminazione maggiore a Sant'Angelo Lodigiano dove si ha circa una media di dieci cariossidi infette per genotipo, mentre a Bergamo si nota una media inferiore, che si aggira intorno a sei cariossidi infette.

1.6. Valutazione contaminazione al punto di inoculo di Bergamo

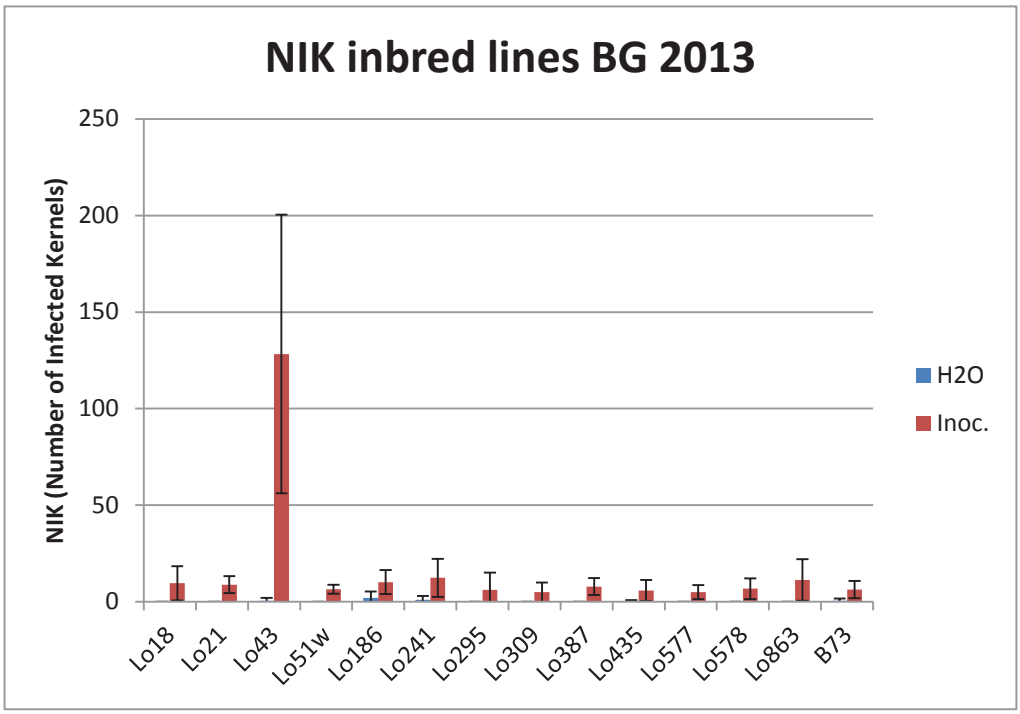

Figura 20. Rappresentazione del numero di cariossidi contaminate per i genotipi inoculati con acqua e per quelli inoculati con il fungo

Il grafico (Fig. 20) sull'asse delle ordinate è riportato il NIK ossia il numero di cariossidi contaminate, mentre sull'asse delle ascisse troviamo i

genotipi oggetto di studio. Dal grafico si può notare che la contaminazione interna delle cariossidi inoculate con acqua risulta pressoché nulla. Per quanto riguarda i genotipi inoculati con il fungo, possiamo notare che quasi tutti i genotipi hanno una contaminazione delle cariossidi al punto di inoculo molto bassa, tranne un genotipo Lo43, il quale risulta avere un numero di cariossidi infette molto elevato, pari a 128.

1.7. Valutazione contaminazione al punto di inoculo di Sant'Angelo Lodigiano

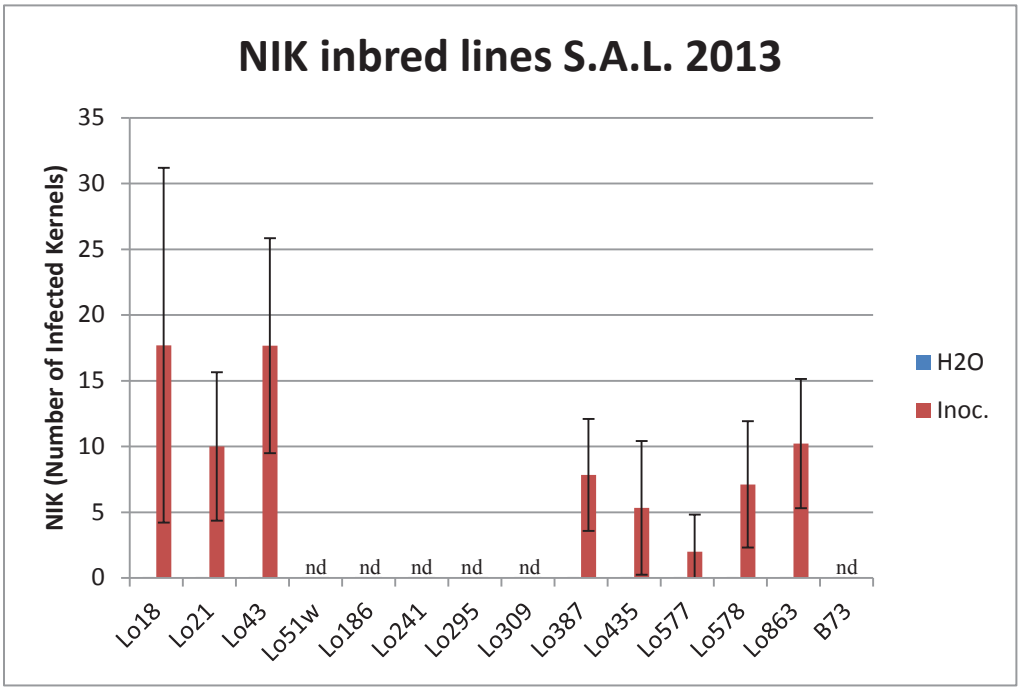

Figura 21. Rappresentazione del numero di cariossidi contaminate per i genotipi inoculati con acqua e per quelli inoculati con il fungo (nd: materiale non disponibile)

Nel grafico (Fig. 21) sull'asse delle ascisse sono riportati i genotipi oggetto di studio, mentre sull'asse delle ordinate il NIK. Osservando il grafico possiamo notare che, per quanto riguarda i genotipi inoculati con acqua,

non sono presenti cariossidi contaminate, mentre per quelli inoculati con il fungo sono stati registrati, in particolare, due genotipi con un maggior numero di cariossidi contaminate rispetto agli altri, e un genotipo che ha un minor numero di cariossidi infette. Questi genotipi sono: Lo18 e Lo43 con un totale di 17 cariossidi contaminate, mentre per Lo577 sono state contate solamente 2 cariossidi infette.

1.8. Confronto genotipi inoculati nelle due località

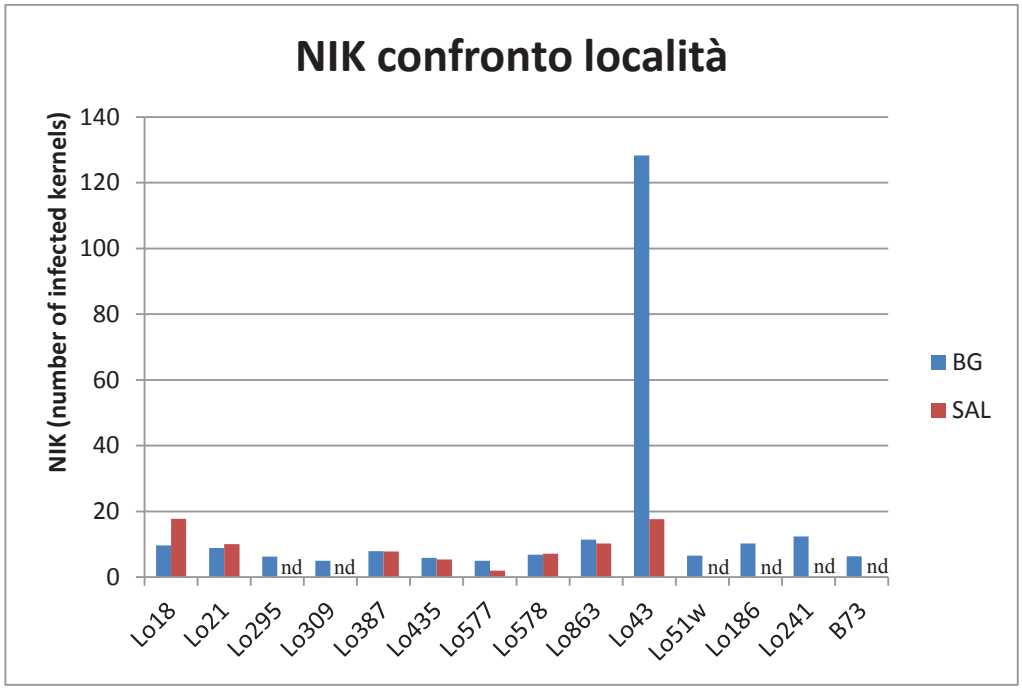

Figura 22. Confronto dei diversi genotipi tra le due località riguardo al numero di cariossidi contaminate (nd: materiale non disponibile)

Nel grafico (Fig. 22), sull'asse delle ordinate il numero di cariossidi contaminate al punto di inoculo e sull'asse delle ascisse i diversi genotipi inoculati con spore fungine, a Bergamo in blu e a Sant'Angelo Lodigiano in rosso. Si può affermare che in generale sia a Bergamo che a Sant'Angelo Lodigiano il numero di cariossidi è pressoché simile, infatti il numero di

cariossidi contaminate non raggiunge il valore di 20. L'unico genotipo che si distingue tra gli altri è Lo43: a Bergamo il numero di cariossidi infette è superiore a 120, mentre a Sant'Angelo Lodigiano si attesta intorno a 20.

2. SAGGIO DI VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE INTERNA

In aggiunta alla valutazione visiva la risposta all'inoculo artificiale di *A. flavus*, è stata stimata attraverso la presenza di contaminazione interna per i campioni sotto analisi.

2.1. Confronto contaminazione interna nelle due località

	BG	S.A.L.
Non-inoc	71,69%	78,5%
H2O	75,14%	91,5%
Inoc	78%	90,5%

Figura 23. Confronto nelle due località della percentuale di contaminazione interna media, principalmente *Fusarium verticilliodes*, in tutti e tre i diversi tipi di trattamenti

Nella tabella di Fig. 23 sono riportati i dati relativi alla contaminazione interna delle cariossidi per i tre diversi tipi di trattamento (non inoculato, inoculato con acqua e inoculato con *A. flavus*), nelle due diverse località (Bergamo e Sant'Angelo Lodigiano).

Generalmente si osserva che la contaminazione interna è maggiore a Sant'Angelo Lodigiano: per il non inoculato si ha una contaminazione del

78.5%, per quello inoculato con acqua del 91.5% e per quelli inoculati con il fungo del 90.5%; a Bergamo, invece, si ha rispettivamente una contaminazione del 71.69%, 75.14% e 78% per il non inoculato, per l'acqua e l'inoculato con il fungo.

2.2. Contaminazione interna media di *A. flavus* nelle due località

	BG	S.A.L.
Non-inoc	2%	5%
H2O	10%	9%
Inoc	35%	22%

Figura 24. Confronto nelle due località della percentuale di contaminazione interna di *A. flavus* presente nei tre i diversi tipi di trattamenti

I dati riportati in tabella (Fig. 24) indicano che la percentuale di contaminazione interna di *A. flavus* risulta a Bergamo (BG), per il non inoculato il 2%, mentre a Sant'Angelo Lodigiano (SAL) il 5%. Per i materiali inoculati con acqua risulta un 10% per BG, mentre per SAL un 9%. Per linee inoculate con il fungo si ha una contaminazione maggiore nella località di Bergamo con 35%, mentre nella località di Sant'Angelo la contaminazione si attesta al 22%.

2.3. Confronto campioni inoculati con *Aspergillus flavus* nelle due località

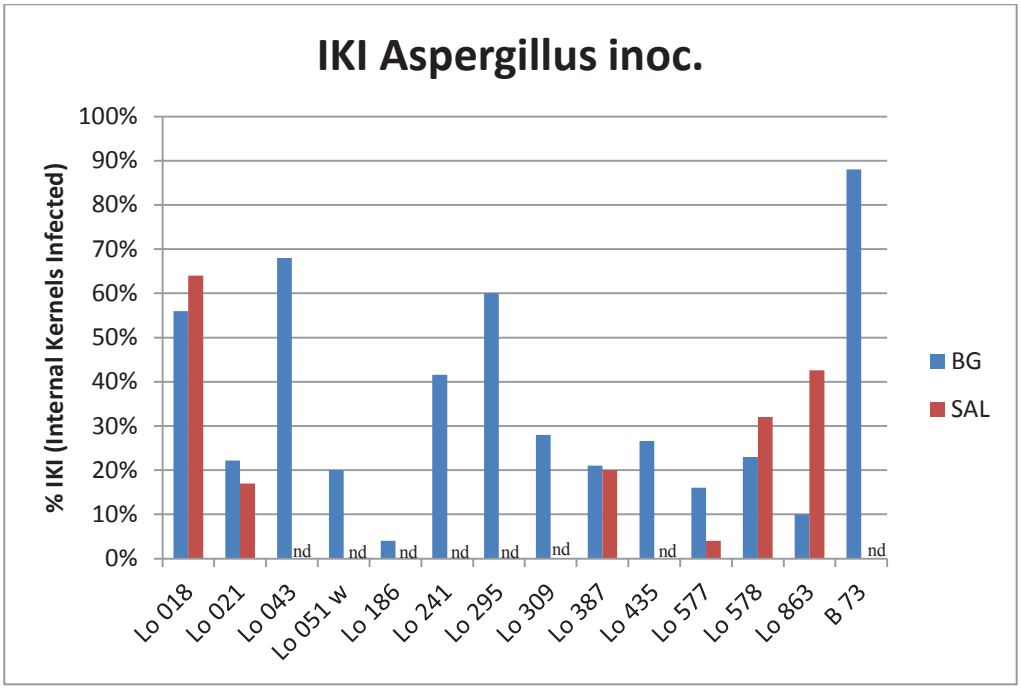

Figura 25. Contaminazione interna delle cariossidi da *Aspergillus* dei diversi genotipi (nd: materiale non disponibile)

Nel grafico (Fig. 25) è riportata sull'asse delle ordinate la percentuale di cariossidi con contaminazione interna di *A. flavus,* mentre sull'asse delle ascisse troviamo i singoli genotipi sotto studio. Dal grafico si nota che per la località di Bergamo è presente un'alta variabilità all'interno dei genotipi inoculati con il fungo tossigeno *A. flavus,* particolarmente interessante risulta il genotipo B73, caso in cui la percentuale di contaminazione interna arriva quasi all'80%. La linea Lo186, invece, presenta una bassa percentuale di contaminazione da *A. flavus*, circa il 3%. In media, a Sant'Angelo Lodigiano, la percentuale di contaminazione interna del fungo è simile per tutti i genotipi; in modo particolare per il genotipo Lo18 è poco superiore al 60%, viceversa il genotipo Lo577, presenta una contaminazione interna pari al 4%.

DISCUSSIONE

Il mais è continuamente esposto all'attacco di patogeni, e per questo deve essere in grado di crearsi barriere protettive o di attivare sistemi in grado di arrestare ed eliminare il patogeno. I patogeni che attaccano il mais sono numerosi tra cui: batteri, nematodi, virus e funghi.

Il miglioramento genetico porge l'attenzione soprattutto verso possibili linee resistenti in grado di dare alla pianta una maggiore capacità di contrastare attacchi di patogeni. Inoltre, il miglioramento genetico mira ad una maggior produzione di granella e ad un contenuto di proteine elevato, quindi ad un incremento della qualità del prodotto.

L'Unità di Ricerca per la Maiscoltura di Bergamo conserva una banca del germoplasma, tra le più grandi d'Europa, con oltre 5000 accessioni, all'interno del quale è quindi possibile trovare potenziali risorse genetiche come fonte di resistenza ai patogeni.

Il lavoro di tesi si è soffermato sullo studio di un fungo patogeno per il mais, l'*A. flavus*, molto aggressivo durante le stagioni calde e secche; inoltre, il fungo tossigeno, attraverso la produzione di aflatossine trasmesse via via dal mais lungo la catena alimentare, può provocare gravi danni alla salute animale e umana. Pertanto è stato effettuato uno screening di diversi genotipi del germoplasma maidicolo Italiano, tramite inoculo artificiale in prove di campo, al fine di individuare fonti genetiche di resistenza ad *A. flavus.*

- **Valutazione della risposta di quattordici linee pure all'attacco fungino (*A. flavus)***

Le valutazioni delle quattordici linee inbred sotto studio sono state effettuate su materiali coltivati in campo e inoculati artificialmente con spore di *A. flavus* attraverso il metodo di inoculo KIA. Su questi materiali sono stati effettuati rilievi riguardanti contaminazione ambientale, utilizzando la scala di rating proposta da Reid et al. (1996). Oltre a queste stime sono state effettuate anche valutazioni al punto di inoculo per tutti e tre i diversi tipi di trattamento (non inoculato, inoculato con acqua e inoculato con il fungo).

In entrambe le località, Bergamo e Sant'Angelo Lodigiano, si nota che i controlli (non inoculati e inoculati con acqua) hanno ottenuto un punteggio di uno sulla scala rating, quindi, questo evidenzia che nelle spighe dei controlli non è avvenuta contaminazione ambientale.

Non ci sono sostanziali differenze tra i singoli genotipi inoculati con *A. flavus* in entrambe le località, tranne che per le linee Lo387 e Lo435, le quali hanno mostrato a Sant'Angelo Lodigiano un valore rispettivamente di 2.4 e 2.85, mentre a Bergamo di 1.2 e 1.44.

Per quanto riguarda la contaminazione al punto di inoculo, non sono state rilevate evidenti differenze di NIK tra le due località, questo suggerisce che i genotipi rispondano all'inoculo artificiale in maniera simile a prescindere dal luogo di semina; inoltre la contaminazione ambientale non inficia lo sviluppo del fungo al punto di inoculo rendendo possibile, pertanto, indagare sui singoli genotipi.

In entrambe le località, vi è una evidente differenza tra le linee inoculate con acqua e quelle inoculate con *Aspergillus.* Infatti nel primo caso la contaminazione è risultata nulla, mentre per le linee inoculate con il fungo

notiamo che i genotipi hanno diverse reazioni a quest'ultimo, quindi si può affermare che il metodo di inoculo è uno strumento utile all'analisi dei singoli genotipi per evidenziare comportamenti differenziali in risposta all'attacco fungino. In particolare, la linea Lo577, la quale a Bergamo presenta un numero medio di cariossidi infette (NIK) pari a 5, mentre a Sant'Angelo Lodigiano si registrano solo 2 cariossidi contaminate e risulta essere la linea con minor numero di cariossidi infette. Inoltre, anche la linea Lo435 risulta essere una linea con un basso numero di cariossidi infette in entrambe le località, con valore medio di 5.88 cariossidi a Bergamo e 5.33 cariossidi a Sant'Angelo Lodigiano. Un caso particolare viceversa, è Lo43, dove si ha una sostanziale differenza tra Bergamo in cui sono state registrate 128.3 cariossidi contaminate, e Sant'Angelo Lodigiano in cui sono state contate 17.66 cariossidi contaminate al punto di inoculo.

- **Valutazione della presenza di contaminazione fungina interna delle cariossidi.**

Nella stima della contaminazione interna (piastratura cariossidi su terreno sterile DRBC) si è notato la presenza di una contaminazione interna generale molto elevata (maggiore del 75%) per tutti e tre i trattamenti ed in entrambe le località. Di questa percentuale l'*A. flavus* copre, nella località di Bergamo il 2%, il 10% e il 35% rispettivamente, per il non inoculato, l'inoculo con acqua e l'inoculo con il fungo tossigeno. A Sant'Angelo Lodigiano si ha rispettivamente una contaminazione interna da *A. flavus* del 5%, 9% e 22%. Dai dati ottenuti si nota che esiste una grande differenza tra i controlli e i trattati, dato che conferma la validità del metodo di

inoculo artificiale nell'indurre contaminazione anche nel corso di annate con scarsa incidenza di contaminazione naturale.

Osservando i singoli genotipi in entrambe le località, si nota il genotipo Lo577, il quale risulta essere quello con minore contaminazione interna, presentando una percentuale di contaminazione da *Aspergillus* nella località di Bergamo del 16% ed in Sant'Angelo Lodigiano del 4%. Altri genotipi tolleranti all'attacco del fungo sono risultati Lo21 e Lo387, i quali presentano valori simili tra loro, infatti, il genotipo Lo21 a Bergamo presenta una contaminazione interna del 22%, a Sant'Angelo Lodigiano una contaminazione del 17%; il genotipo Lo387 presenta una contaminazione interna rispettivamente per le località di Bergamo e di Sant'Angelo Lodigiano del 21% e 20%.

A Bergamo, però, il genotipo Lo186 è risultato avere una contaminazione interna da *A. flavus* pari al 4%; il dato non è verificabile per Sant'Angelo Lodigiano per la mancanza del campione. Viceversa il genotipo Lo18 è risultato essere il più contaminato internamente da *A. flavus* con una percentuale di contaminazione a Bergamo pari al 56%, ed a Sant'Angelo Lodigiano pari al 64%.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

In generale, ciò che è emerso da questo lavoro di tesi, è una valutazione di fonti genetiche utili per la resistenza ad *A. flavus*, attraverso lo studio dei quattordici genotipi presi in esame.

Dalle valutazioni effettuate, si può affermare che dopo l'inoculo artificiale, tra i diversi genotipi esiste una grande variabilità e questo conferma il ruolo di grande importanza che riveste lo screening nei programmi di miglioramento genetico.

Un buon candidato che potrebbe essere utilizzato per approfondire la resistenza a patogeni, è il genotipo Lo577 il quale ha ottenuto una bassa valutazione sia nelle valutazioni visive, sia nella valutazione della contaminazione interna alla cariosside.

A completamento dell'indagine relativa alla ricerca di un potenziale genotipo resistente da introdurre in un programma di breeding, risulta importante l'indagine relativa al contenuto di micotossine accumulate nella granella. Inoltre, la valutazione dei genotipi resistenti ad altri patogeni o insetti in aggiunta al controllo della resa agronomica, i quali costituiscono punti basilari per l'utilizzo di questi materiali nell'attuare progressi in programmi di miglioramento a resistenze.

Inoltre, per validare tutte le ipotesi di potenziali genotipi resistenti, è necessario effettuare le stesse modalità di screening in più annate.

BIBLIOGRAFIA

- Belli G., Piccin 2012, "Elementi di Patologia Vegetale", Cap. 1 p. 3-20, Cap. 5 p.83-98, Cap. 7 p.147-154, Cap. 8 p. 177-198, Cap. 12 p. 375-381

- Bottrell D. R., 1979, " Integrated Pest Management", Integrated Pest Management, Cap. 15, pag. 120

- Bugiani R., 2013, "Fusariosi della spiga sempre più diffusa", Terra e Vita, Vol.10

- Cousin R., 2006, "Funghi e micotossine. Mais e sicurezza alimentare", Veneto agricoltura, p.11-29

- Donaldson M. E., Meng S., Gagarinova A., Babu M., Lambie S. C., Swiadek A. A., Saville B. J., September-October 2013, "Investigating the *Ustilago maydis*/*Zea mays* pathosystem: Transcriptional responses and novel functional aspects of a fungal calcinerium regulatory B subunit", Fungal Genetics and Biology, Vol. 58-59, p. 91-104

- Ferrari A., Balconi C., 2010 "Tecniche di inoculo fungino per la valutazione di genotipi di mais", dal Seme, Vol. 1, p.8

- Gallagher K. D., 2000, "Community study programmes for integrated production and pest management: Farmer Field

Schools" ,Human Resources in Agricoltural and Rural Development (FAO), pag. 60-67

- Haouet M. N., Altissimi M. S., Febbraio 2003, "Micotossine negli alimenti e micotossici animale e umana", Webzine Sanità Pubblica Veterinaria, Vol. 18

- Harrington J., September 2014, "Potential for Corn Ear Molds This Year Due to Weather Extremes", DuPont Pioneer news

- Harris L. J., Zagory D., Gorny J., 2002, "Postharvest Technology of Horticultural Crops", Safety factors. IN: A. Kader (ed.), Division of Agricolture and Natural Resources, University of California

- King A. D., Hocking A. D., Pitt J. I.,May 1979, "Applied and environmental microbiology", p. 959-964 Vol. 37, No. 5

- Litsinger JA., Moody K., October 1976, " Integrated pest and production management", pag. 293-316

- Lorenzoni, Bayern 2007, "Il mais coltura e cultura", p.1-40

- Milne R. G., Lovisolo O., 1977, Advances in Virus Research, Vol.21, p.267-341

- Moratö J., Mir J., Codony F., Mas‡ J., Ribas F., 2003, "Microbial response to disinfectants", Handbook of Water and Wastewater Microbiology, p.657-693

- Palmero D., Rubio-Moraga A., Galvez-Patón L., Nogueras JJ., Abato C., Gómez-Gómez L., Ahrazem O., November 2014, "Pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium* oxysporum isolates from corns of Crocus sativus", Indusrial Crops and Products, Vol. 61, p. 186-192

- Prelle A., Pugliese M., Borreani G., 2013, "Confronto sull'utilizzo di teli biodegradabili e non sulla presenza di micotossine in insilati di mais", Protezione delle Colture, pag. 108-109

- Regione Veneto, 2014, "disciplinary Produzione Integrata: Tecniche Agronomiche, Anno 2014", p.143-145

- Reid L.M. and Hamilton R.I., 1996, "Screening Maize for Resistance to Gibberella Ear Rot", Eastern Cereal and Oilseed Research Centre

- Syngenta Italia, Settembre 2014, "Alta densità, alta produttività", Syngenta Mais Expert Campus 2014, Agronotizie

- Takács A., Horvát J., Gáborjányi R., Kazinczi G., Mikulas J., 2014, "Host and non-host in plant virology and the effects of plant viruses on host plants", Plant virus, Cap. 5 p. 105-124.

- Taylor T.N., Krings M., Taylor E.L., 2014, "Bacteria and Fungus-Like Organism", Fossil Fungi, p.261-282

- Thompson B., 2014, "Genetic and Hormonal Regaulation of Maize Infibrescence Development", Advances in Botanical Research, Vol. 72, Cap. 9, p. 263-296

- Vujanovic V., Smoragiewicz W., Krzysztyniak K., 2001, "Airbone fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air", Environ toxicol, Vol. 16, p. 1-8

- Zummo N., Scott G. E., 1989, "Evaluation on field inoculation tecniques for screening maize genotypes against kernel infections by *Aspergillus flavus* in Mississippi", Plant Dis. 73: 313-316

Ringraziamenti

Un grazie speciale va alla mia famiglia, la quale mi ha sempre sostenuto ed incoraggiato durante questi tre anni a Edolo.

Grazie anche a Davide il quale mi ha sopportato in questi anni e mi ha sempre incoraggiato anche nei momenti più difficili.

Un ringraziamento lo devo al Dott. Alessio Torri e alla Dott.ssa Carlotta Balconi i quali mi hanno seguito durante il periodo di tirocinio e aiutato durante la stesura della tesi; grazie anche al Professor Stefano Bocchi, il quale ha permesso lo svolgimento di questo lavoro.

Si ringrazia il progetto MICOPRINCEM, finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali per aver supportato i materiali utilizzati durante lo svolgimento del progetto.