

CONTROLLO DELLE TOSSINE T2-HT2 SU FRUMENTO MEDIANTE IMPIEGO DI FUNGICIDI

A. REYNERI¹, M. BLANDINO¹, G. ALVISI², C. CRISTIANI², A. MORETTI³

¹DISAFA - Università degli Studi di Torino – Largo Braccini, 2, 10095 Grugliasco (TO),

² Consorzio Agrario dell'Emilia ³ CNR-ISPA, Bari

amedeo.reyneri@unito.it

RIASSUNTO

L'entrata in vigore della Raccomandazione 2013/165/UE che definisce i tenori ammessi delle tossine T2 e HT2 nei cereali riguarda il frumento tenero e duro per la sensibilità di queste colture verso i funghi tossigeni *Fusarium langsethiae* e *F. sporotrichioides*. Nell'ambito del progetto MIPAAF–MICOPRINCEM è stata valutata l'efficacia del controllo di tali tossine con l'applicazione alla spigatura-floritura di strobilurine, azoli o della loro miscela. Il confronto è stato effettuato nel triennio 2011-2013 a Dugliolo (BO) su frumento duro cv. S. Carlo secondo uno schema a blocchi randomizzati e 4 ripetizioni. Sono stati confrontate 5 tesi che prevedevano l'impiego di formulati a base di axoxystrobin, metconazolo, protioconazolo, tebuconazolo + azoxystrobin, oltre ad un testimone; tutte le tesi sono state soggette o meno a inoculazione artificiale alla fioritura con una miscela di *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides*. Sono stati valutati i sintomi della fusariosi della spiga, la produzione e la presenza delle tossine in oggetto. Nelle parcelle inoculate gli isolamenti hanno sempre evidenziato una forte prevalenza di *F. sporotrichioides*. I livelli di contaminazione di T2 e HT2 sono risultati maggiori nelle parcelle inoculate, con valori anche superiori a 1.000 µg/kg nei testimoni non difesi, mentre nel testimone non inoculato i valori sono risultati inferiori a quelli indicati nella raccomandazione (100 µg/kg). La difesa con fungicidi azolici soli o in miscela con la strobilurina ha ridotto in modo sempre significativo la presenza delle due tossine.

Parole chiave: Fusariosi della spiga, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*!!

SUMMARY

T2-HT2 TOXINS CONTROL THROUGH FUNGICIDE APPLICATION ON WHEAT

The application of Recommendation 2013/165/UE concerning the mycotoxins T2-HT2 in cereals involves particularly the small cereals among which common and durum wheat are more prone to *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides*. The aim of this research, part of the MIPAAF – MICOPRINCEM Project, was the evaluation of the azole and strobilurin fungicides applied at T3 (heading-anthesis) in controlling these mycotoxins. The research was carried out in the period 2011-2013 at Dugliolo, in Northern Italy, on durum wheat cv. S. Carlo following a full randomizing block experimental design with 4 repetitions. 5 fungicide treatments were compared: untreated, axoxystrobin, metconazole, protioconazole, tebuconazole + azoxystrobin. For all of the treatments, the artificial inoculation at anthesis with *F. langsethiae* and *F. sporotrichioides* mixtures was compared with natural inoculation. *Fusarium* head blight (FHB) severity and incidence, grain production and T2-HT2 concentration were considered. In the inoculated plots *F. sporotrichioides* was always more diffuse than *F. langsethiae*. The contamination of T2-HT2 was always higher with the artificial inoculation, with concentration even above 1000 µg kg⁻¹ for the untreated check. Under natural inoculation, the T2-HT2 contaminations were always below the recommended level of 100 µg kg⁻¹. The fungicides with azole or azole + strobilurin a.i. proved to reduce significantly FHB and T2-HT2 contamination.

Keywords: Fusarium Head Blight, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*

INTRODUZIONE

Il quadro delle micotossine soggette a normativa comunitaria si è esteso alle tossine T2 e HT2 (Raccomandazione 165/2013) a seguito della valutazione del rischio intrinseco (tossicità) del contaminante e l'esposizione al rischio dei consumatori, anche in relazione al parere dell'Agenzia europea per la sicurezza alimentare del 2011 (EFSA Journal 2011;9(12):2481).

La loro tossicità si esplica negli animali superiori e nell'uomo inibendo la sintesi proteica; in particolare l'azione principale riguarda il sistema immunitario che ne risulta indebolito (Caloni e Nebbia, 2009; Schuhmacher-Wolz *et al.*, 2011). La tossina T2 e la forma deacetilata HT2, sono le più tossiche tra tutti i tricoteceni; pertanto i limiti della raccomandazione risultano assai minori rispetto a quelli di altri tricoteceni quali il deossinivalenolo (DON). Dai dati raccolti queste tossine sono presenti in tutti i principali cereali (escluso il riso) in Europa, con una maggiore frequenza in avena e orzo in centro e nord Europa, poiché interessano soprattutto i cereali a paglia in semina primaverile (Edward *et al.*, 2009; Orlando *et al.*, 2010).

Queste tossine possono venir prodotte durante la maturazione in campo soprattutto da *Fusarium langsethiae* e *F. sporotrichioides*: il primo presenta una maggiore termofilia (ottimo termico 28°C), mentre il secondo una capacità di svilupparsi e produrre tossine a valori di umidità del substrato inferiori (Kokkonen *et al.*, 2012 a e b).

In Italia, T2-HT2 sono state individuate in cariossidi di frumento duro, frumento tenero, e mais nell'ambito delle ricerche svolte nel Progetto MICIPRINCEN-MIPAAF.

Alla luce di queste considerazioni lo scopo del lavoro è stato quindi quello di valutare nelle nostre prevalenti condizioni climatiche, le possibilità di controllare la produzione di queste tossine nel frumento, analizzando l'efficacia di diversi fungicidi al fine mettere a punto, anche per queste micotossine, i percorsi produttivi più opportuni.

MATERIALI E METODI

La prova ha avuto luogo nelle campagne di raccolta 2012-13 in località Dugliolo (BO) su una coltura di frumento duro cv San Carlo in successione a patata dopo aratura su di un suolo argilloso-franco.

I trattamenti, oltre ad un testimone non trattato, hanno confrontato quattro diversi fungicidi o miscele di essi, sempre con un'unica distribuzione a fine spigatura (tabella 2). I trattamenti sono stati eseguiti con una irroratrice a quattro ugelli (T-Jeet 110/04) con una pressione di esercizio di 324 KPa. Metà delle parcelle sono state inoculate con spore di *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae* ad una concentrazione di 10^6 conidi/mL di sospensione, con intervento di inoculo eseguito ad inizio fioritura (BBCH62). Complessivamente sono stati confrontati 10 trattamenti adottando uno schema a blocchi randomizzati con quattro ripetizioni in parcelle di 15 m². I rilievi condotti su ogni parcella, hanno riguardato: l'incidenza e la severità dell'attacco della fusariosi della spiga (FHB) secondo una valutazione visuale alla maturazione cerosa e impiegando la scala di Parry; la produzione di granella mediante mietitrebbia parcellare, l'analisi micologica delle specie fungine nelle parcelle testimone in condizioni di inoculo artificiale e naturale e la relativa quantificazione con metodica PCR-RT del contenuto di DNA di *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides*; il contenuto totale in tossine T2-HT2. Quest'ultimo è stato analizzato partendo da un campione di granella macinata di 2 kg per parcella e impiegando la metodica ELISA (Kit Neogen Veratox[®] T2+HT2, con intervallo di quantificazione 25 - 250 µg/kg, applicando un intervallo di 200 - 2.000 µg/kg nelle parcelle inoculate artificialmente adottando le opportune diluizioni). L'analisi statistica dei dati (Anova) è stata effettuata in accordo con lo schema sperimentale e adottando il test post-hoc di confronto multiplo di Ryan-Einot-Gabriel-Welsh F (REGWF).

La prova, impostata dal Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA) dell'Università di Torino, è stata condotta dal Centro di saggio del Consorzio agrario dell'Emilia, così come le analisi quali-quantitative della produzione; le analisi sulla contaminazione da tossine T2 e HT2 sono state condotte presso il DISAFA. L'inoculo, costituito da una miscela di *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae*, è stato prodotto presso l'Istituto di Scienze delle produzioni alimentari (ISPA) del CNR a Bari, che ha eseguito anche le analisi micologiche.

Tabella 1. Tesi sperimentali a confronto

N°	Sostanza attiva	Dose f.c. L-kg/ha	Epoca di applicazione	Inoculo
1	Testimone non trattato	-	-	artificiale
2	Azoxistrobin	1	Inizio fioritura	artificiale
3	Metconazolo	1	Inizio fioritura	artificiale
4	Protioconazolo	0,8	Inizio fioritura	artificiale
5	Tebuconazolo + azoxistrobin	2	Inizio fioritura	artificiale
6	Testimone non trattato	-	-	naturale
7	Azoxistrobin	1	Inizio fioritura	naturale
8	Metconazolo	1	Inizio fioritura	naturale
9	Protioconazolo	0,8	Inizio fioritura	naturale
10	Tebuconazolo + azoxistrobin	2	Inizio fioritura	naturale

Prodotti impiegati: Amistar® (azoxystrobin, 250 g/L); Caramba® (metconazolo, 90 g/L); Proline® (protioconazolo, 250 g/L); Amistar Plus® (azoxystrobin + tebuconazolo, 75+125 g/L), tutti alle dosi di etichetta.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel biennio in condizioni di infezione naturale le specie fungine maggiormente ritrovate nella granella raccolta sono state *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* e *F. poae*, con un'incidenza media inferiore al 5% delle cariossidi analizzate. L'analisi sulle granelle raccolte da parcelle inoculate (T1), ha evidenziato lo sviluppo di *F. sporotrichioides*, (infezione media del 28% delle cariossidi, mentre *F. langsethiae*, seppur inoculato, non ha trovato le condizioni per svilupparsi.

La severità e l'incidenza di FHB sono risultate in entrambi gli anni maggiori nelle parcelle soggette all'inoculazione artificiale e, come atteso, nei testimoni non trattati (T1, T6) (tabella 2). Tutti i fungicidi distribuiti hanno significativamente ridotto i sintomi di infezione della spiga, ma con evidenti differenze di efficacia. In entrambe le condizioni di infezione, con o senza inoculo artificiale, i trattamenti a base di protioconazolo (T4, T9) hanno presentato le minori percentuali di severità e incidenza; intermedio ma comunque rilevante è stato il controllo esercitato da metconazolo (T3, T8) e dalla miscela tebuconazolo + azoxystrobin (T5, T10), mentre quest'ultimo p.a. da solo (T2, T7) non ha consentito di ottenere un controllo analogo.

La produzione di granella, al contrario non ha dato origine a differenze significative tra le tesi a confronto, sebbene la produzione di granella a seguito dell'inoculazione artificiale sia risultata in media inferiore del 5% e del 4%, rispettivamente nei due anni.

Tabella 2. Effetto dei trattamenti fungicidi su severità e incidenza della fusariosi della spiga

N°	Sostanza attiva	Severità (%)				Incidenza (%)			
		2012		2013		2012		2013	
1	Testimone non trattato	13,6	a*	11,85	a	90,2	a	80,2	a
2	Azoxistrobin	6,1	b	5,15	b	71,4	ab	51,4	bc
3	Metconazolo	4,8	bc	1,73	c	57,7	b	47,5	c
4	Protiokonazolo	3,6	cd	0,68	c	46,1	b	27,4	d
5	Tebuconazolo + azoxistrobin	5,1	bc	1,93	c	56,4	b	43,7	c
6	Testimone non trattato	5,9	b	7,88	b	46,1	b	67,4	b
7	Azoxistrobin	2,4	d	3,53	bc	21,4	c	46,2	c
8	Metconazolo	1,8	de	2,08	c	22,8	c	36,5	cd
9	Protiokonazolo	1,2	e	1,30	c	17,9	c	24,8	d
10	Tebuconazolo + azoxistrobin	1,7	de	2,18	c	26,0	c	35,4	cd

*Lettere diverse nella stessa colonna indicano differenze significative per P (F) < 0,05 al test REGWF

La concentrazione di tossine T2-HT2 nella granella ha, come atteso, rispecchiato quanto rilevato per l'attacco di FHB. Come si può osservare, l'effetto dell'inoculo è stato sempre significativamente maggiore nel testimone con concentrazioni pari a 1.750 e 896 µg/kg rispettivamente nei due anni (tabella 3).

In entrambe le condizioni di inoculo, la protezione riscontrata a seguito dei trattamenti fungicidi è risultata proporzionale ai sintomi sulla spiga, tuttavia le differenze tra loro non sono state quasi mai significative. Più in dettaglio la concentrazione delle due tossine è risultata in media inferiore nella tesi con la distribuzione di protioconazolo (T4, T9) seguita poi dalla miscela tebuconazolo + azoxistrobin (T5, T10) e dal metconazolo (T3, T8). Per quanto riguarda il trattamento a base di azoxistrobin (T2, T7), si sono riscontrate concentrazioni nel primo anno simili al testimone non trattato nelle condizioni di inoculo artificiale.

In conclusione l'applicazione dei fungicidi ordinariamente impiegati per il controllo della fusariosi della spiga del frumento (FHB) è stata in grado di contenere l'infezione operata da *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides*, e in particolare di quest'ultima specie che è apparsa in grado di svilupparsi maggiormente nelle condizioni della prova.

Le s.a. con attività DMI (*Demethylation Inhibitor*) quali i triazoli impiegati o la miscela tra questi e la s.a. con attività QoI (*Quinone Outside Inhibitor*) quale la strobilurina, confermano anche verso questi patogeni e nel controllo di queste micotossine una rilevante efficacia, paragonabile a quella manifestata verso *F. graminearum* e *F. culmorum* nei confronti di DON (Blandino *et al.*, 2012).

L'applicazione della sola strobilurina si conferma meno efficace in condizioni di elevata pressione quale quella riscontrata in presenza di inoculo artificiale. Infine, sebbene le indagini siano ancora poco numerose, i dati raccolti in condizioni di inoculo naturale evidenziano che negli areali granicoli del Nord Italia nelle annate favorevoli all'attacco di FHB la presenza delle tossine T2-HT2 possa essere significativa, ma comunque inferiore a quella indicata nella raccomandazione (100 µg/kg).

Tabella 3. Effetto dei trattamenti fungicidi e dell'inoculo sulla concentrazione di tossina T2-HT2

N°	Sostanza attiva	T2-HT2 (µg/kg)			
		2012		2013	
1	Testimone non trattato	1.750	a*	896	a
2	Azoxistrobin	1.643	a	209	b
3	Metconazolo	1.184	ab	202	b
4	Protiocanazolo	606	b	142	b
5	Tebuconazolo + azoxistrobin	976	ab	360	b
6	Testimone non trattato	53	c	70	c
7	Azoxistrobin	< Lq	c	27	c
8	Metconazolo	< Lq	c	36	c
9	Protiocanazolo	< Lq	c	56	c
10	Tebuconazolo + azoxistrobin	11	c	32	c

*Vedi tabella 2

Lq: valore inferiore al limite di quantificazione

LAVORI CITATI

- Blandino M., Haidukowski M., Pascale M., Plizzari L., Scudellari D., Reyneri A., 2012. Integrated strategies for the control of Fusarium head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crops Research*, 133, 139-149.
- Caloni F., Nebbia C., 2009. *Micotossine*. In «Residui di fitofarmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali». Ed. Carlo Nebbia, EdISES, Napoli:453-480.
- Edwards S.G., Barrier-Guillot B., Clasen P.E., Hietaniemi V., Pettersson H., 2009. Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. *World Mycotoxin Journal*, 2, 173-179.
- Kokkonen M., Jestoi M., Laitila A., 2012a. Mycotoxin production of *Fusarium langsethiae* and *Fusarium sporotrichioides* on cereal-based substrates. *Mycotoxin Research*, 28(1), 25-35.
- Kokkonen M., Medina A., Magan N., 2012b. Comparative study of water and temperature relations of growth and T-2/HT-2 toxin production by strains of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *World Mycotoxin Journal*, 365-372.
- Orlando B., Barrier-Guillot B., Gourdain E., Mourmené C., 2010. Identification of agronomic factors that influence the levels of T-2 and HT-2 toxins in barley grown in France. *World Mycotoxin Journal*, 3, 169-174.
- Schuhmacher-Wolz U., Heine K., K. Schneider K., 2010. Scientific report submitted to EFSA. Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins. (CT/EFSA/CONTAM/2010/03).

