

## SPECIE DI *FUSARIUM* TOSSIGENE E RELATIVE MICOTOSSINE NELLE SPIGHE DI MAIS CON "MARCIUME ROSATO", IN SARDEGNA

P. CORDA<sup>1</sup>, A. BOTTALICO<sup>1</sup>, A. LOGRIECO<sup>2</sup>, F. MARRAS<sup>1</sup>, G. RANDAZZO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Istituto di Patologia vegetale, Università degli Studi, Via E. De Nicola - 07100 Sassari

<sup>2</sup> Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti vegetali, CNR, Via L. Einaudi, 51 - 70125 Bari

<sup>3</sup> Dipart. Scienza degli Alimenti, Univ. degli Studi "Federico II", Parco Gussone - 80055 Portici (Napoli)

### Riassunto

Le indagini condotte nel triennio 1992-94 sugli agenti causali del "marciume rosato" della spiga di mais in diverse aree della Sardegna (Cagliari, Oristano, Sassari), hanno consentito di accertare un'elevata presenza di *F. proliferatum* assieme a quella predominante di *F. moniliforme*. In alcuni campioni di spighe infette è stata riscontrata anche la presenza di *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. graminearum* e *F. chlamydosporum*. Le spighe infette da *F. moniliforme* e da *F. proliferatum* sono risultate contaminate da fumonisin B<sub>1</sub> e da beauvericina. Come gli isolati di *F. moniliforme*, anche quelli di *F. proliferatum* sono risultati produttori di fumonisin B<sub>1</sub>, nonché di più elevate concentrazioni di beauvericina e di moniliformina. L'elevata presenza nelle spighe di mais affette da "marciume rosato" di isolati tossigeni di *F. proliferatum*, assieme a quelli di *F. moniliforme* e alle loro micotossine, suggerisce un importante ruolo sia fitopatologico sia micotossicologico anche di *F. proliferatum* in questa malattia.

**Parole chiave:** mais, marciume rosato, *Fusarium* spp., micotossine.

### Summary

#### TOXIGENIC *FUSARIUM* SPECIES AND MYCOTOXINS IN MAIZE AFFECTED BY EAR ROT, IN SARDINIA (ITALY)

Surveys carried out in 1992-94 on the causal *Fusarium* species of pre-harvest maize ear rot in several areas of Sardinia (Cagliari, Oristano, Sassari), showed high occurrence of *F. proliferatum*, together with the predominant presence of *F. moniliforme*. *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, and *F. chlamydosporum* were also present, to a lesser extent, in some infected samples. Maize ear samples infected by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* were found contaminated by fumonisin B<sub>1</sub> (8/8 samples, up to 250 mg/kg), and beauvericin (6/8, up to 30 mg/kg). The responsible isolates of *F. proliferatum* were able to produce fumonisin B<sub>1</sub> (20/20, up to 2,000 mg/kg), beauvericin (19/20, up to 200 mg/kg), and moniliformin (10/20, up to 5,300 mg/kg) on autoclaved corn; whereas those of *F. moniliforme* produced higher amount of fumonisin B<sub>1</sub> (13/13, up to 3,750 mg/kg), but only traces of beauvericin (3/13, up to 5 mg/kg), and were not able to produce moniliformin. The high occurrence of toxigenic isolates of *F. proliferatum* together with *F. moniliforme* in pre-harvest corn ear rot, associated with their mycotoxins, suggests an important pathogenic and toxigenic role of *F. proliferatum* in this disease.

**Key words:** maize, ear rot, *Fusarium* spp., mycotoxins.

## Introduzione

*Fusarium moniliforme* Sheld., assieme ad altre specie fungine del genere *Fusarium*, sono responsabili, in diverse parti del mondo (Booth, 1971) ed anche in Italia (Bottalico *et al.*, 1989), di gravi attacchi alle coltivazioni di mais, su cui causano marciumi del culmo e della spiga.

Accanto alle loro capacità patogeniche, questi funghi per altro esplicano una marcata attività tossigenica, non solo a carico delle piante (Cole *et al.*, 1973) ma soprattutto verso gli animali, a causa della produzione e dell'accumulo nelle piante infette di potenti micotossine. Particolare interesse rivestono gli attacchi di isolati di *F. moniliforme* e di *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, produttori di fumonisina B<sub>1</sub>, beauvericina e monilliformina. La fumonisina B<sub>1</sub> è una micotossina dotata di attività cancerogena, responsabile di leucoencefalomalacia negli equini (ELEM), di edema polmonare nei suini (PPE) (Ross *et al.*, 1990), di neurotossicità nei bovini (Faifer *et al.*, 1992), ed è fortemente sospettata quale causa di cancro dell'esofago nell'uomo (Marasas, 1995).

Osservazioni preliminari effettuate in diverse aree della Sardegna hanno consentito di accertare una vasta diffusione del "marciume rosato" delle spighe di mais causato da specie di *Fusarium*. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la relativa incidenza delle varie specie di *Fusarium* e di verificare la loro capacità di produrre micotossine, come pure quello di determinare la naturale presenza di queste ultime nelle spighe di mais prima della raccolta.

## Materiali e metodi

*Raccolta dei campioni.* Le spighe di mais, manifestamente colpite da marciume e mostranti vari tipi di micelio fungino, sono state prelevate all'epoca della raccolta in diverse aree irrigue della Sardegna (Cagliari, Oristano e Sassari) negli anni 1992, 1993 e 1994. Di tali spighe sono stati ottenuti dei campioni rappresentativi (costituiti da 4-5 spighe ciascuno) che, chiusi in sacchetti sterili, sono stati portati in laboratorio e conservati a 4°C fino al momento delle analisi.

*Isolamento e identificazione dei funghi.* Da ogni campione sono state prelevate 100 cariossidi (20-25 per spiga) visibilmente infette che, opportunamente sterilizzate in superficie con ipoclorito di sodio e tagliate in due parti, sono state poste in piastre Petri con un substrato contenente PCNB, selettivo per *Fusarium* (Nelson *et al.*, 1983). Dopo una settimana di incubazione al buio a 25°C, le colonie di *Fusarium* sviluppatesi sono state trapiantate su piastre con PDA e incubate a 25°C per 10 giorni sotto lampade fluorescenti e a luce UV (2700 lux), con fotoperiodo di 12 h. Per l'identi-

ficazione delle specie di *Fusarium* è stato seguito il sistema tassonomico di Nelson *et al.* (1983). Colture monoconidiche ottenute su PDA e su CLA (carnation leaf agar) sono state poi utilizzate per le osservazioni morfologiche e per gli studi di tossigenicità. Per preservare le colture, micelio e conidi dei ceppi allevati su CLA sono stati trasferiti asetticamente in fiale contenenti 1 ml di una soluzione sterile al 18% di glicerolo e congelati a  $-75^{\circ}\text{C}$ . Gli isolati sono stati depositati nella collezione dell'Istituto Tossine e Micotossine da parassiti vegetali del CNR di Bari.

*Produzione di micotossine.* Isolati monoconidici da ogni campione sono stati accresciuti su cariossidi di mais "Plata" (50 g), portati prima al 45% di umidità in matracci da 250 ml e poi sterilizzati in autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$  per 30 min. Le colture, inoculate con 2 ml di sospensione acquosa contenente circa  $10^7$  conidi per ml, sono state incubate al buio a  $25^{\circ}\text{C}$  per 4 settimane. Il materiale colturale è stato disseccato in stufa a circolazione forzata a  $60^{\circ}\text{C}$  per 48 h, poi macinato finemente e conservato a  $4^{\circ}\text{C}$  sino al momento delle analisi.

*Analisi delle micotossine.* Subcampioni di spighe di mais naturalmente infette da *Fusarium* e materiale colturale di diversi isolati sono stati sottoposti ad analisi in accordo con le procedure rispettivamente di Shephard *et al.* (1990) per la fumonisina B<sub>1</sub>, di Logrieco *et al.* (1993) per la beauvericina, e di Bottalico *et al.* (1989) per la moniliformina. Le analisi chimiche sono state effettuate mediante TLC e HPTLC per la fumonisina B<sub>1</sub>, HPLC e HPTLC per la beauvericina e TLC per la moniliformina.

*Saggi biologici.* La tossicità degli estratti colturali con metanolo di isolati di *Fusarium* è stata saggiata su larve di *Artemia salina* L. secondo il metodo di Harwing e Scott (1971), valutando la percentuale di mortalità in piastre di coltura dopo incubazione a  $27^{\circ}\text{C}$  per 24 h (4 replicazioni per ogni ceppo).

## Risultati

*Incidenza delle specie di Fusarium.* Le tabelle 1 e 2 mostrano l'incidenza delle varie specie di *Fusarium* agenti di marciumi delle spighe di mais rispettivamente nel 1992-93 e nel 1993-94 in Sardegna. La specie predominante è risultata *F. moniliforme*, che è stata isolata da tutti i campioni esaminati. Dopo *F. moniliforme*, la specie più diffusa è risultata *F. proliferatum*, che nel 1993 è stata isolata da 9/15 campioni e sempre assieme a *F. moniliforme*. In misura inferiore sono stati isolati anche *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. oxysporum* (Schlechtend.) Snyder et Hans., *F. chlamydosporum* Wollenw. et Reink., *F. graminearum* Schwabe e *F. culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc.

Tab. 1 - Presenza di specie di *Fusarium* e relative micotossine in spighe di mais affette da "marciume rosato".

Campione	<i>Fusarium</i> spp. <sup>a</sup> (%)		Micotossine (mg/kg)	
			Fumonisina B <sub>1</sub>	Beauvericina
<b>1992</b>				
SS 1	<i>F. moniliforme</i>	(100)	150	10
	<i>F. proliferatum</i>	(42)		
SS 2	<i>F. moniliforme</i>	(100)	175	5
SS 3	<i>F. moniliforme</i>	(100)	125	5
SS 4	<i>F. moniliforme</i>	(100)	250	—
SS 5	<i>F. moniliforme</i>	(100)	250	10
	<i>F. proliferatum</i>	(30)		
SS 6	<i>F. moniliforme</i>	(100)	175	—
<b>1993</b>				
SS 29	<i>F. moniliforme</i>	(48)	200	30
	<i>F. proliferatum</i>	(100)		
CA 40	<i>F. moniliforme</i>	(52)	250	10
	<i>F. proliferatum</i>	(96)		

<sup>a</sup> Percentuale su 100 cariossidi per campione

*Presenza di micotossine nelle spighe naturalmente infette.* Nella tabella 1 sono riportati i risultati sulla presenza di micotossine, in relazione all'incidenza di *F. moniliforme* e di *F. proliferatum*, nelle spighe di mais affette da marciumi in pre-raccolta nel 1992-93 in Sardegna. Tutti i campioni sono risultati contaminati da fumonisina B<sub>1</sub> (fino a 250 mg/kg) e, eccetto due, anche da beauvericina (fino a 30 mg/kg).

*Produzione di micotossine.* I risultati sulla produzione di micotossine da parte di isolati di *F. moniliforme* e di *F. proliferatum* sono riportati rispettivamente nelle tabelle 3 e 4. Dalla tabella 3 si rileva che tutti gli isolati saggiate di *F. moniliforme* hanno prodotto fumonisina B<sub>1</sub> (da 750 a 3750 mg/kg), mentre solo tre di essi hanno prodotto anche beauvericina (5 mg/kg). Per quanto riguarda *F. proliferatum*, la tabella 4 mostra che anche gli isolati di questa specie sono risultati tutti produttori di fumonisina B<sub>1</sub> (da 1000 a 2500 mg/kg), nonché 19/20 isolati anche di beauvericina (da 5 a 200 mg/kg), mentre dieci di essi hanno prodotto pure moniliformina (da 150 a 5300 mg/kg).

In tabella 4 sono riportati anche i risultati riguardanti la tossicità di estratti colturali, ottenuti con metanolo, di isolati di *F. proliferatum* verso larve di *A. salina*. Tale attività si riferisce quindi soltanto alla presenza di beauvericina, in quanto le altre due micotossine sono state allontanate con la fase acquosa. Dall'esame di questa tabella è possibile osservare che tutti gli estratti degli isolati produttori di beauvericina hanno mostrato una elevata attività verso le larve di *A. salina*. L'attività di alcuni estratti non contenenti beauvericina potrebbe indicare la presenza di micotossine non ancora identificate.

Tab. 2 - Presenza di specie di *Fusarium* in spighe di mais affette da "marciume rosato", nel 1993-94, in Sardegna<sup>a</sup>.

Campione	<i>Fusarium moniliforme</i> %	<i>Fusarium proliferatum</i> %	<i>Fusarium equiseti</i> %	Altre %
<b>1993</b>				
SS 28	98	—	—	—
SS 29	48	100	—	—
SS 36	39	9	—	—
SS 37	100	2	—	—
SS 38	54	61	—	—
SS 39	98	—	—	—
CA 30	100	—	23	5 ( <i>F. chlamyosporum</i> )
CA 31	50	79	18	—
CA 32	96	—	26	—
CA 33	98	34	4	2 ( <i>F. culmorum</i> )
CA 34	76	34	—	5 ( <i>F. chlamyosporum</i> )
CA 35	100	—	—	—
CA 40	52	96	—	—
CA 41	100	—	—	—
CA 42	67	45	6	3 ( <i>F. graminearum</i> )
<b>1994</b>				
SS 43	100	28	—	—
SS 45	53	42	—	9 ( <i>F. oxysporum</i> )
SS 46	100	—	—	—
SS 410	100	—	15	—
OR 412	100	—	—	—
OR 414	85	—	—	38 ( <i>F. oxysporum</i> )

<sup>a</sup> Percentuali su 100 cariossidi per ogni campione.

### Discussione

Le specie di *Fusarium* più frequentemente isolate da spighe di mais con "marciume rosato" in Sardegna sono risultate *F. moniliforme* e *F. proliferatum*. Questi risultati, mentre confermano il ruolo predominante di *F. moniliforme* in questa malattia, mettono in risalto la significativa presenza di *F. proliferatum*. Tale presenza rafforza l'opinione su un ruolo di *F. proliferatum* nella stessa malattia, come indicherebbero le — anche se scarse — segnalazioni di questo patogeno sia nelle cariossidi sia in parti vegetative del mais in diverse altre aree maidicole del mondo (Logrieco *et al.*, 1990). Inoltre, come *F. moniliforme*, anche *F. proliferatum* è presente all'interno delle cariossidi e dovrebbe quindi essere capace di attuare infezioni sistemiche, oltre alle infezioni localizzate sulle piante da parte di inoculo presente nell'aria.

Le spighe di mais infette da *F. moniliforme* e da *F. proliferatum* sono risultate contaminate da elevate concentrazioni di fumonisina B<sub>1</sub>, nonché da beauvericina. Mentre

Tab. 3- Produzione di fumonisina B<sub>1</sub> e di beauvericina da parte di isolati di *F. moniliforme* da spighe di mais affette da "marciume rosato" prima della raccolta, nel 1992, in Sardegna.

Campione	Isolato ITEM <sup>b</sup>	Micotossine (mg/kg) <sup>a</sup>	
		Fumonisin B <sub>1</sub>	Beauvericina
SS 1	1777	3750	—
SS 2	1755	1000	5
SS 2	1757	750	—
SS 2	1758	1700	—
SS 2	1759	2125	—
SS 3	1745	2250	—
SS 3	1746	1700	5
SS 3	1747	1250	5
SS 4	1721	2500	—
SS 4	1744	3750	—
SS 5	1776	2250	—
SS 6	1173	2500	—
SS 6	1774	2500	—

<sup>a</sup> Isolati accresciuti a 25°C per 4 settimane su cariossidi di mais sterilizzate in autoclave.

<sup>b</sup> Numero della Collezione dell'Istituto Tossine e Micotossine da parassiti vegetali del CNR, Bari.

è da ritenere scontato l'accumulo di tale tossina da parte di *F. moniliforme*, è da presumere che a tale accumulo abbia contribuito anche *F. proliferatum*, come dimostrano le prove di tossigenicità condotte sugli isolati di questa specie. Inoltre, la presenza di più significative quantità di beauvericina nelle spighe colonizzate da entrambe le suddette specie di *Fusarium*, a confronto con quelle colonizzate solo da *F. moniliforme*, è giustificata dalla maggiore potenzialità di *F. proliferatum* di produrre beauvericina, come risulta dalle prove di tossigenicità condotte *in vitro*.

Per quanto riguarda la tossigenicità di queste due specie di *Fusarium*, e cioè la capacità di produrre micotossine, i risultati ottenuti indicano una maggiore tossicità da parte di *F. proliferatum*. Infatti, a differenza degli isolati di *F. moniliforme*, quelli di *F. proliferatum*, oltre ad altrettanto significative concentrazioni di fumonisina B<sub>1</sub>, hanno prodotto non solo più elevate concentrazioni di beauvericina, ma anche moniliformina, non prodotta invece da *F. moniliforme*. Inoltre, i saggi di tossicità condotti con gli estratti colturali di *F. proliferatum*, oltre a confermare l'attività della beauvericina nei confronti delle larve di *A. salina*, hanno anche indicato la presenza negli estratti organici di metaboliti diversi dalla beauvericina ma con analoga attività. A tal riguardo merita ricordare che negli estratti colturali di altri isolati di *F. proliferatum* è stata recentemente identificata un'altra micotossina, denominata fusaproliferina (Bottalico *et al.*, 1993).

Tab. 4 - Produzione di micotossine da parte di ceppi di *F. proliferatum* isolati da spighe di mais nel 1993 e tossicità degli estratti colturali verso larve di *A. salina*.

Campione	Isolato ITEM <sup>a</sup>	Micotossine (mg/kg)			Tossicità estratti <sup>b</sup> %
		Fumonisin B <sub>1</sub>	Beauvericina	Moniliformina	
SS 1	1494	1500	90	—	—
SS 1	1506	2500	40	—	—
SS 5	1750	1750	175	—	—
SS 5	1751	1750	150	—	—
SS 29	1725	1875	150	150	100
SS 29	1726	1500	150	200	100
SS 29	1727	2000	125	150	100
SS 29	1728	1750	125	4000	100
SS 38	1719	2000	100	650	100
SS 38	1720	2000	150	5300	100
CA 31	1762	1750	150	330	100
CA 31	1763	1000	5	250	91
CA 31	1764	1000	—	—	65
CA 33	1752	2000	200	—	100
CA 33	1761	1875	5	—	92
CA 34	1748	1750	150	—	100
CA 34	1749	1750	125	—	100
CA 40	1722	1750	10	—	76
CA 40	1723	2000	100	3300	89
CA 40	1724	1500	125	4650	100

<sup>a</sup> Numero della Collezione dell'Istituto Tossine e Micotossine da parassiti vegetali del CNR, Bari.

<sup>b</sup> Percentuale di mortalità delle larve.

In conclusione, i risultati epidemiologici e tossicologici sulla presenza di *F. proliferatum* nelle spighe di mais con "marciume rosato" suggeriscono implicazioni di carattere sia fitopatologico sia micotossicologico da parte di questo patogeno, da valutare congiuntamente al ruolo già accennato di *F. moniliforme* nella stessa malattia.

#### Ringraziamenti

Si ringrazia la dott. A. Marcello, dell'Istituto di Patologia vegetale dell'Università di Sassari, per la collaborazione tecnica.

#### Lavori citati

- BOTH C. (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK, 237 pp.  
 BOTTALICO A., LOGRIECO A., VISCONTI A. (1989). *Fusarium* species and their mycotoxins in infected cereals in the field and in stored grains. In: *Fusarium - Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (J. Chelkowski edit.). Elsevier, Amsterdam, NL, 85-119.

- BOTTALICO A., FOGLIANO V., LOGRIECO A., MANNINA L., MORETTI A., RANDAZZO G., RITIENI A., ROSSI E., SCARALLO A., SEGRE A. (1993). Una nuova micolossina da colture di *F. proliferatum* su mais. In : XXI Conv. Naz. Divisione di Chimica organica, Palermo, 28/9-2/10, 223.
- COLE R.J., KIRKSEY J.W., CUTLER H.G., DOUPNIK B.L., PECKHAM J.C. (1973). Toxin from *Fusarium moniliforme*: effect on plant and animals. *Science*, 179, 1324-1326.
- FAIFER G., VELAZCO V., CARLETTI S., SALVAT A., GODOY H. (1992). Fumonisin-producing potential of *Fusarium moniliforme* isolated from a corn sample suspected of producing cattle toxicity. VIII. Intern. Symposium on Mycotoxins and Phytotoxins, Mexico City, Mex., November 6-13, 39.
- HARWING J., SCOTT P.M. (1971). Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system of fungal toxins. *Applied Microbiology*, 21, 1011-1016.
- LOGRIECO A., BOTTALICO A., RICCI V. , (1990). Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal grains from some Mediterranean countries. *Phytopathologia Mediterranea*, 29, 81-89.
- LOGRIECO A., MORETTI A., RITIENI A., CHELKOWSKI J., ALTOMARE C., BOTTALICO A., RANDAZZO G. (1993). Natural occurrence of beauvericin in preharvest *Fusarium subglutinans* infected corn ears in Poland. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41, 2149-2152.
- MARASAS W.F.O. (1995). Fumonisin: their implications for human and animal health. *Natural Toxins*, 3, 193-198.
- NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., MARASAS W.F.O. (1983). *Fusarium* Species – An illustrated manual for identification. University Park, Pennsylvania State Univ. Press, 193 pp.
- ROSS P.F., NELSON P.E., RICHARD J.L., OSWEILER G.D., RICE L.G., PLATTNER R.D., WILSON T.M. (1990). Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3225-3226.
- SHEPARD G.S., SYDENHAM E.W., THIEL P.G., GELDERBLUM W.C.A. (1990). Quantitative determination of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13, 2077-2087.