

EFFICACIA DI TRATTAMENTI DI CONCIA DEL MAIS NEI CONFRONTI DI *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

G. VENTURINI, G. ASSANTE, A. VERCESI
DI.PRO.VE., sez. Patologia Vegetale, Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2, 20133 Milano
giovanni.venturini@unimi.it

RIASSUNTO

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg su mais è in grado di provocare marciume della spiga, della radice e del germinello, nonché di dar luogo all'accumulo di fumonisine. Trattamenti di concia al seme potrebbero ridurre l'incidenza di marciumi radicali e del germinello e limitare la colonizzazione endofitica della pianta. Nelle prove effettuate inoculando sperimentalmente tre ceppi del patogeno, prothioconazole, sia da solo sia in miscela con fluoxastrobin e tebuconazole, ha ottenuto i migliori risultati, seguito da fludioxonil e difenoconazole, mentre limitatamente efficaci sono stati fenbuconazole e cyprodinil.

Parole chiave: fumonisine, marciume radicale, marciume del germinello

SUMMARY

EFFECT OF CORN SEED TREATMENT AGAINST *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg is the causal agent of head blight radicle decay and seedling rot on corn and is able to accumulate fumonisin in kernels. Seed treatments could reduce the incidence of the different diseases caused by the pathogen and limit the endophytic colonization of corn. In the experimental assays carried out with three fungal strains, prothioconazole, alone or in mixture with fluoxastrobin and tebuconazole obtained the best results, followed by fludioxonil and difenoconazole, while fenbuconazole and cyprodinil were less efficient.

Keywords: fumonisin, radicle decay, seedling rot

INTRODUZIONE

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg è ritenuto il principale responsabile del marciume rosa della spiga di mais e causa alterazioni litiche sul seme, il germinello e lo stocco e raramente su foglia (Logrieco *et al.*, 2002). I danni più considerevoli si registrano su spiga, infettata sia attraverso le setole, considerate la via di penetrazione più frequentemente utilizzata dal patogeno, sia attraverso le lesioni dovute agli insetti ed in particolare ad *Ostrinia nubilalis* o contaminata dal micelio sviluppatosi endofiticamente nella pianta a partire dal seme contaminato (Murillo-Williams e Munkvold, 2008). Ancor oggi è oggetto di dibattito la frequenza con la quale *F. verticillioides* utilizza le diverse vie di penetrazione, nessuna delle quali può tuttavia essere trascurata nell'intento di limitare al massimo il rischio di infezione della cariosside. Il fungo infatti provoca perdite dovute non solo al marciume della spiga, ma anche alla sua capacità di produrre fumonisine, micotossine in grado di provocare l'insorgere di gravi malattie negli equini e nei suini ed associate all'incremento dell'incidenza di cancro esofageo in Sud Africa, Cina ed Italia nord orientale (Marasas *et al.*, 2000). La fumonisina più diffusa in natura, la fumonisina B₁, secondo recenti disposizioni comunitarie, non può superare in mais non trasformato i 4000 ng/g (Regolamento CE, No 1126/2007). L'accumulo di fumonisine può verificarsi anche in cariossidi apparentemente sane (Venturini, 2009). Attualmente vengono consentiti su mais solo interventi volti a contenere danni dovuti a vari

insetti: in particolare nel corso della stagione vegetativa vengono applicati uno - due interventi per ridurre le infestazioni di *O. nubilalis* e di conseguenza l'incidenza di lesioni che *F. verticillioides* potrebbe utilizzare per insediarsi sulla spiga. Dato il frequente ritrovamento di elevati livelli di fumonisina B₁ all'interno di partite italiane di mais, è parso opportuno valutare l'efficacia di varie sostanze attive, applicate quali concianti, di contenere la colonizzazione della piantina di mais da parte di ceppi di *F. verticillioides*.

MATERIALI E METODI

Le prove sperimentali sono state effettuate su cariossidi dell'ibrido H6, coltivato presso la sede del CRA di Sant'Angelo Lodigiano (LO), sterilizzate mediante immersione in candeggina al 6% di NaOCl per 20 minuti e successiva incubazione in acqua distillata sterile per 4 ore a 25 °C ed infine a 60 °C per 10 minuti.

Le inoculazioni sperimentali sono state effettuate utilizzando tre ceppi di *F. verticillioides*, GV 838, GV 858 e GV 894, isolati da plantule di mais (Growth Stage 13). L'identificazione dei ceppi è stata eseguita utilizzando sia criteri morfologici sia ricorrendo all'accoppiamento su CA (Carrot Agar, Leslie e Summerell, 2006) con ceppi tipo di opposta polarità sessuale, forniti dalla Kansas State University (USA). La produzione di fumonisine da parte dei suddetti ceppi è stata saggiata coltivando per 7 giorni a 27 °C ciascun micete su 2,5 g di cariossidi spezzate di mais esenti dalla micotossina, idratate con 1,5 ml di acqua distillata sterile e sterilizzate in autoclave a 120 °C per 30 minuti. Le cariossidi sterili sono state inoculate con 1,5 ml di sospensione conidica di ciascun ceppo alla concentrazione di $2,5 \times 10^7$ conidi/ml. Al termine del periodo di incubazione, gli estratti metanolici di ogni coltura sono stati saggiati per la presenza di fumonisina B₁ usando il kit ELISA Ridascreen® Fumonisin (R-Biopharm AG, Darmsatdt, HEL, Germany).

La valutazione dell'efficacia delle sostanze attive elencate in tabella 1 è stata effettuata in piastra. Colture dei tre ceppi di *F. verticillioides* sono state allestite in piastre Petri di 9 cm di diametro contenenti WPDA (Weak Potato Dextrose Agar, 3,9 g/L PDA Difco, 10 g/L agar) addizionato con 200 mg/L di streptomina solfato, 50 mg/L di tetraciclina e 120 mg/L neomicina solfato, distribuendo 1,5 ml di una sospensione di conidi (1×10^6 spore/ml) sulla superficie del terreno culturale. Dopo 4 giorni di incubazione a 25 °C, 10 semi sterilizzati sia trattati sia non trattati sono stati posti in ciascuna piastra, riposti in termostato a 20 °C per 9 giorni. I formulati elencati in tabella 1 sono stati utilizzati per la concia a 10 g di sostanza attiva (s.a.)/100 kg di seme con le sole eccezioni di quelli contenenti fludioxonil e cyprodinil, usati rispettivamente a 46 g s.a./100 kg di seme e 2,5 g s.a./100 kg di seme.

Tabella 1. Fungicidi utilizzati per la concia dei semi di mais

Tesi	Sostanza attiva	Formulato
1	prothioconazole (100 g/L)	Redigo® (Bayer)
2	prothioconazole (37,5 g/L) fluoxastrobin (37,5 g/L) tebuconazole (5 g/L)	Scenic® (Bayer)
3	fludioxonil (230 g/L)	Scholar® (Syngenta)
4	cyprodinil (50 g/L)	Chorus® (Syngenta)
5	difenoconazole (250 g/L)	Score® (Syngenta)
6	fenbuconazole (50 g/L)	Simitar® (Dow-Agroscience)

Per ognuno dei formulati in prova e per il testimone non trattato (TNT) la prova è stata effettuata prendendo in considerazione 30 semi e ripetendo l'esperienza due volte. I risultati sono stati valutati stimando l'entità della colonizzazione del seme, il marciume della radice e del germinello secondo la seguente scala: 0 = nessun sintomo d'infezione; 1 = superficie sintomatica dell'organo interessato compresa tra 0,1 e 25%; 2 = superficie sintomatica compresa tra 25 e 50%; 3 = superficie sintomatica compresa tra 50 e 75%; 4 = superficie sintomatica compresa tra 75 e 100%. Il corrispondente indice percentuale d'infezione (I%I) è stato calcolato mediante la formula di Townsend e Heuberger (1943). I dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza ed al successivo test di Tukey.

RISULTATI

I caratteri morfologici dei ceppi GV 838, 858 e 894 hanno determinato la loro identificazione come *F. verticillioides*, confermata dai risultati dell'accoppiamento con individui di opposta polarità sessuale appartenenti alla stessa specie. Questi ultimi, individuati dalla Kansas State University come ceppi tipo, hanno dato luogo, a seguito di accoppiamento con GV 838, 858 e 894, alla formazione di periteci fertili, dimostrando in modo incontrovertibile l'appartenenza di questi ultimi alla specie *F. verticillioides*. I tre ceppi hanno dato luogo all'accumulo di notevoli quantità di fumonisin B₁, variabile dai 59 ppm prodotti da GV 838 ed i 32 ppm sintetizzati da GV 894. Molto simili alla quantità di micotossina isolata dagli estratti colturali di GV 838 sono risultati i 56 ppm di fumonisin B₁ prodotti da GV 858. I risultati delle prove sperimentali effettuate utilizzando i tre ceppi di *F. verticillioides* sono riportati in tabella 2. La modalità di sterilizzazione adottata ha determinato la quasi completa eliminazione di funghi contaminanti dalle cariossidi dell'ibrido H6: colonie fungine sono state osservate solo sull'1-2% dei semi sterilizzati ed incubati a 20 °C per 9 giorni si sono sviluppate (dati non riportati).

Tabella 2. Indici % d'infezione relativi alla colonizzazione del seme, marciume della radice e del germinello indotti da tre ceppi di *F. verticillioides* su cariossidi trattate e non trattate

Tesi	I%I Colonizzazione del seme			I%I Marciume della radice			I%I Marciume del germinello		
	894	838	858	894	838	858	894	838	858
Prothioconazole	2 f	0 e	0 e	13 f	11 e	10 e	2 c	1 e	0 e
Prothioconazole + fluoxastrobin + tebuconazole	1 f	2 e	1 e	12 f	10 e	7 e	3 c	0 e	0 e
Fludioxonil	32 e	42 c	31 d	34 e	39 d	26 d	2 c	3 e	4 d
Cyprodinil	74 b	64 b	76 b	87 b	82 b	89 a	73 a	55 b	79 b
Difenoconazole	40 d	42 c	31 d	51 d	37 d	43 c	8 c	9 d	7 d
Fenbuconazole	60 c	67 b	69 c	63 c	43 c	57 b	37 b	19 c	45 c
TNT	91 a	91 a	96 a	96 a	87 a	93 a	74 a	76 a	84 a

Lettere differenti indicano differenze significative (P < 0,05, test di Tukey)

Dai dati riportati in tabella 2, è evidente la capacità dei ceppi utilizzati di colonizzare i semi, che ciononostante hanno germinato regolarmente, e di indurre un esteso marciume a livello della radice, mentre minore è l'entità del marciume rilevato sul germinello.

È possibile rilevare come i trattamenti effettuati con prothioconazole da solo e con la miscela di prothioconazole + fluoxastrobin + tebuconazole abbiano riportato di gran lunga i

risultati migliori, in particolare per quanto concerne la colonizzazione del seme ed il marciume del germinello, mentre leggermente superiori sono risultati gli I%I relativi al marciume radicale. Fludioxonil hanno mostrato un'efficacia analoga a quella di prothioconazole e della miscela prima citata nel contenere l'insorgenza del marciume del germinello determinata da i ceppi 894 e 838. Difenconazole è risultato significativamente meno efficace di fludioxonil nel ridurre la colonizzazione del seme dovuta al ceppo 894, il marciume della radice indotta dai ceppi 894 e 858 e il marciume del germinello causato dal ceppo 838. Ancor meno efficace è risultato fenbuconazole la cui protezione è stata tuttavia superiore rispetto a quella assicurata da cyprodinil.

DISCUSSIONE

L'attribuzione degli isolati di *Fusarium* spp. ad una data specie nell'ambito della sezione *Liseola* è molto difficoltosa: per quanto riguarda *F. verticillioides* il ricorso all'accoppiamento con i corrispondenti ceppi tipo di opposta polarità sessuale appare ancor oggi il metodo più affidabile per una corretta identificazione. I ceppi di *F. verticillioides* utilizzati in questa sperimentazione hanno prodotto elevate quantità di fumonisina B₁ e sono stati in grado di dar luogo a elevati I%I. Va sottolineato come la colonizzazione della cariosside non abbia limitato la capacità germinativa del seme, mentre la radichetta e la parte basale del germinello sono stati compromessi, con insorgenza di marciume prima ed estese necrosi in seguito. Prothioconazole, da solo e in miscela con fluoxastrobin e tebuconazole, ha limitato in modo estremamente efficace lo sviluppo del micete, come d'altra parte anche fludioxonil e difenconazole limitatamente al marciume del germinello causato dal ceppo 894 e, per il solo fludioxonil, dall'isolato 838. Minore efficacia è stata dimostrata da fenbuconazole, mentre molto limitata è stata l'attività di cyprodinil. L'inclusione di quest'ultima s.a. nella prova è stata motivata dall'efficacia dimostrata nei confronti di *F. verticillioides* agente di un marciume su fico. La prevenzione di marciumi precoci su mais determinati da *F. verticillioides*, oltre alla riduzione di eventuali fallanze, può contribuire alla diminuzione dell'inoculo derivante dalla sporulazione del patogeno sui germinelli colonizzati, inoculo eventualmente responsabile di contaminazioni della spiga, e può inoltre limitare il rischio di contaminazione delle cariossidi dovuta allo sviluppo endofitico del micete.

LAVORI CITATI

- Leslie J.F., Summerell B.A., 2006. Media - Recipes and preparation. In: *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell, Oxford, UK, 5-14.
- Logrieco A., Mulè G., Moretti A., Bottalico A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 597-609.
- Marasas W.F.O., Miller J.D., Visconti A. 2000. Fumonisin B₁. *Environmental Health Criteria*, 219, 1-150.
- Murillo-Williams A., Munkvold G.P., 2008. Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plant grown under three temperature regimes. *Plant Disease*, 92, 1695-1700.
- Townsend G.R., Heuberger I.W., 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter*, 27, 340-343.
- Venturini G., 2009. Detection, fumonisin production, pathogenicity and mating behaviour of *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg associated with *Zea mays* L. Tesi di Dottorato, Università degli Studi di Milano, 87-88.