

PREVENZIONE DEL *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* E RIDUZIONE DELLE FUMONISINE NELLA GRANELLA DI MAIS

A.M. MENNITI, R. GREGORI, F. NERI, D. MAZZONI

Criof-Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare - *Alma Mater Studiorum*
Università di Bologna - Viale Fanin, 46, 40127 Bologna
annamaria.menniti@unibo.it

RIASSUNTO

Sono stati valutati in postraccolta alcuni mezzi di prevenzione (pulitura, essiccazione e fumigazione con trans-2-esenale) verso *Fusarium verticillioides* e di riduzione delle fumonisine nella granella di mais. Su tre ibridi di mais (T 26, Kws e Mas 54 A) sono stati analizzati: umidità della granella, popolazione fungina e contenuto delle fumonisine (FB₁+FB₂). Il sistema di pulitura, che consisteva nell'allontanamento manuale di impurità, polveri, farine, spezzati e cariossidi infette, ha fornito i migliori risultati nella prevenzione delle infezioni di *F. verticillioides* e nella riduzione delle fumonisine. Anche il processo di essiccazione ha ridotto la popolazione del patogeno. È stata evidenziata una correlazione positiva fra la presenza del patogeno e il contenuto di umidità nelle cariossidi. Il trattamento con le fumigazioni di trans-2-esenale alla dose di 200 µl/L è risultato molto efficace (100%) nel contenere le infezioni di *F. verticillioides*, ma non ha ridotto il contenuto di FB₁+FB₂.

Parole chiave: *Fusarium verticillioides*, trans-2-esenale, fumonisine, mais

SUMMARY

CONTROL OF GROWTH AND FUMONISIN PRODUCTION BY *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* ON MAIZE GRAIN

Some means (cleaning, drying process and trans-2-hexenal fumigation) of controlling *Fusarium verticillioides* infection and fumonisin contamination were evaluated in stored maize grain. The grain moisture, fungal population and fumonisins (B₁+B₂) contents were evaluated after harvest in three maize hybrids T 26, KWS and Mas 54 A. The cleaning process, consisting in manual removal of impurities, powders, meals, broken and infected kernels, provided the best results in controlling *F. verticillioides* growth and fumonisins production. Also the drying process reduced pathogen population. A positive correlation between fungal population and the moisture content in the kernels was found. The results showed that postharvest fumigation with 200 µl/L of trans-2-hexenal was highly effective (100%) in *F. verticillioides* control, but not in fumonisins (FB₁+FB₂) reduction.

Keywords: *Fusarium verticillioides*, trans-2-hexenal, fumonisins, maize

INTRODUZIONE

Il *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg causa il marciume rosa della spiga del mais, può comportarsi anche da endofita e non presentare evidenti sintomi della malattia. Dal metabolismo secondario del *F. verticillioides* vengono prodotte le fumonisine, micotossine presenti nelle cariossidi anche in assenza di sintomi visibili di infezione (Bacon *et al.*, 1992; Munkvold *et al.*, 1997; Desjardins *et al.*, 1998). Le principali fumonisine sono le B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃). La FB₁ è associata al cancro dell'esofago nell'uomo e causa leucoencefalomalacia nei cavalli, edema polmonare e sindrome epatica nei suini, danni al fegato e cancro in animali da laboratorio (Gelderblom *et al.*, 1988; Ross *et al.*, 1990; Bacon *et al.*, 1992; Rheeder *et al.*, 1992). Di recente, nell'Unione Europea sono stati stabiliti i livelli

massimi ammissibili di fumonisine (B₁+B₂) a 1 mg/kg per mais destinato al consumo umano diretto e 4 mg/kg per mais non trasformato (Commissione Europea, 2007).

Le condizioni ambientali, quali umidità e temperatura giocano un ruolo importante nella crescita del *F. verticillioides* e nell'accumulo delle fumonisine prima e dopo la raccolta del mais (Miller, 2001; Ono *et al.*, 2002). Tuttavia, le buone pratiche agricole (fra queste l'anticipo della semina), volte a ridurre al minimo i fattori di rischio, possono prevenire entro certi limiti le infezioni da *Fusarium* spp. in campo. Adeguati mezzi di prevenzione in postraccolta sono comunque indispensabili per ridurre, durante la conservazione della granella, le nuove infezioni e quindi i rischi di contaminazioni di micotossine.

Di recente, sono stati condotti alcuni studi sull'attività antifungina di vari olii essenziali (origano, timo, cannella, chiodi di garofano) contro *F. verticillioides* del mais (Paster *et al.*, 1995; Juglai *et al.*, 2002; Velluti *et al.*, 2004). In prove condotte nel nostro Dipartimento è stata valutata l'attività del trans-2-esenale verso *Penicillium expansum* e *F. verticillioides* (Neri *et al.*, 2006a; Neri *et al.*, 2006b; Menniti *et al.*, 2010).

L'obiettivo della presente ricerca è stato quello di verificare in postraccolta gli effetti della pulitura, essiccazione e fumigazioni di trans-2-esenale verso *F. verticillioides* e sul contenuto di fumonisine nella granella di mais.

MATERIALI E METODI

Sono stati raccolti, in un campo sperimentale vicino Bologna, campioni di tre ibridi di mais: T 26, Kws e Mas 54 A (120 spighe per ogni ibrido di mais). Nello stesso giorno della raccolta, una metà del prodotto è stato essiccato a 40 °C per 48 ore fino a raggiungere un contenuto di umidità delle cariossidi ≤ al 15%, condizioni di umidità richieste generalmente durante il periodo di conservazione. L'altra metà (60 spighe) è stata conservata tal quale in magazzino a temperatura ambiente fino all'inizio delle prove. Per ciascun ibrido di mais, naturalmente contaminato da *Fusarium*, sono state messe a confronto le seguenti tesi: raccolta (no essiccazione), pulitura (no essiccazione), essiccazione, essiccazione e pulitura. Ogni tesi era costituita da tre ripetizioni di 500 g di granella.

La pulitura della granella consisteva nell'allontanamento manuale, mediante un setaccio, di impurità, polveri, farine, spezzati e cariossidi infette. L'umidità delle cariossidi è stata rilevata mediante un apparecchio automatico per la misura rapida dell'umidità di cereali (GAC 2100).

Per determinare la popolazione fungina e il contenuto delle fumonisine nelle cariossidi, la granella è stata macinata con apposito mulino e lo sfarinato è stato conservato a -20 °C in sacchetti di plastica fino all'inizio delle analisi. Il numero di Unità Formanti Colonie per grammo di sfarinato (UFC/g) è stato determinato con la tecnica delle diluizione seriali piastrate su patate dextrose agar (PDA, Oxoid) acidificato con acido lattico al 10%. La media dei valori di UFC/g è stata trasformata e riportata nella figura come log₁₀ UFC/g. Le colonie di *Fusarium* sono state identificate come *F. verticillioides* mediante osservazioni al microscopio (Nelson *et al.*, 1983) e PCR (Iotti e Zambonelli, 2006).

L'effetto delle fumigazioni di trans-2-esenale, aroma presente in numerosi ortofrutticoli e nell'olio di oliva, è stato valutato sull'ibrido di mais T 26 non essiccato con un contenuto di umidità delle cariossidi di 16,8%. Sono state poste a confronto le tesi testimone (non trattato) e trattata, costituite ciascuna da 500 g di granella. Prima del trattamento la granella è stata disinfettata in superficie in una soluzione di ipoclorito di sodio al 2% per 2 minuti e asciugata su carta sterile dopo 2 successivi risciacqui in acqua sterile. Il trattamento con trans-2-esenale è stato effettuato alla dose di 200 µl/L in un contenitore di plastica, a tenuta di gas della capacità di 10 L. La durata del trattamento è stata di 24 ore, alla temperatura di 25 °C.

Dopo 7 giorni di incubazione a 25 °C, poiché non erano comparsi esternamente i sintomi dell'infezione da *Fusarium*, 50 cariossidi sono state poste in 10 piastre Petri (5 cariossidi per piastra) contenenti 20 ml di PDA acidificato con acido lattico al 10% e messe a incubare a 25 °C per ulteriori 7 giorni. L'incidenza delle cariossidi infette è stata valutata dopo 14 giorni di incubazione. Le analisi delle FB₁ e FB₂ sono state determinate su campioni di due ripetizioni da 200 g di granella per ciascuna tesi, congelati a -20 °C prima delle analisi. Il campione (10 g) finemente omogeneizzato è stato estratto con una miscela formata da 100 ml di acqua acidificata con 0,4% di acido acetico, 50 ml di metanolo e 50 ml di aceto nitrile, in agitatore meccanico e in bagno ad ultrasuoni. Una porzione di estratto opportunamente filtrata è stata analizzata in cromatografia liquida e spettrometria di massa LCMS/MS.

Tutte le prove sono state ripetute due volte. I dati sono stati elaborati con l'analisi della varianza (Anova) ed il test LSD, per P=0,05.

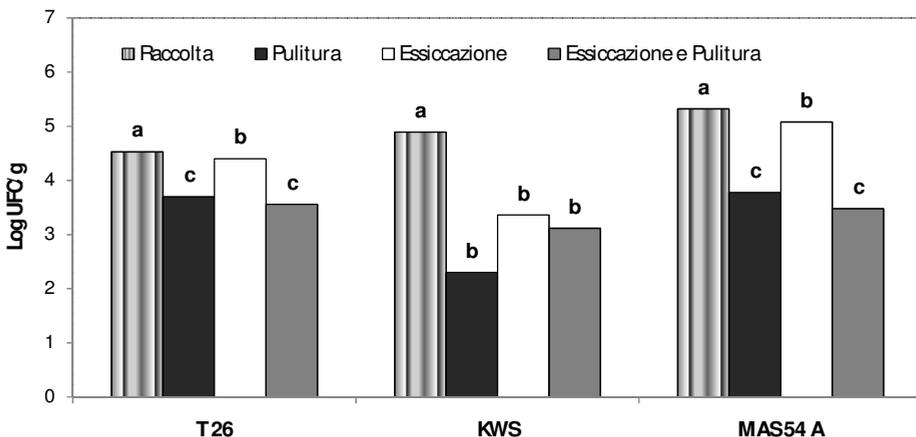
RISULTATI

Effetti della pulitura e/o essiccazione verso *F. verticillioides* e fumonisine

I valori medi di umidità della granella non essiccata erano di 19,5 17,1 e 22,1% rispettivamente per T 26, Kws e Mas 54 A, ridotti, nell'ordine, a 13,8 10,8 e 15,0% dopo l'essiccazione.

I funghi della specie *F. verticillioides* sono risultati prevalenti, con il più alto valore del log UFC/g (5,3) nella granella di Mas 54 con la più elevata umidità (22,1%), rispetto a *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Mucor* spp. I risultati hanno evidenziato che il metodo più efficace nella riduzione dell'infezione è stato quello della pulitura della granella, con l'allontanamento di spezzati e cariossidi infette. Anche l'essiccazione ha ridotto la popolazione di *F. verticillioides* in T 26 e Mas 54 A, con una maggiore riduzione riscontrata in Kws, dove il contenuto di umidità nella granella era il più basso (10,8%), permettendo di accertare una correlazione positiva ($r=0,715$) fra la popolazione di *F. verticillioides* e il contenuto di umidità nelle cariossidi. Inoltre l'essiccazione più la pulitura è risultata efficace quanto la sola pulitura (figura 1).

Figura 1. Influenza della pulitura e/o essiccazione sulla popolazione (log UFC/g) di *Fusarium verticillioides* nella granella di tre ibridi di mais T 26, Kws e Mas 54 A. Le medie con lettere differenti sono significativamente diverse fra di loro secondo il test LSD per P=0,05



La pulitura ha ridotto del 96,8 e del 79,4% le fumonisine (B₁+B₂) rispettivamente in T 26 e Mas 54 A; l'essiccazione più la pulitura ha fornito un risultato simile a quello della sola pulitura. Mentre l'essiccazione ha ridotto le FB₁+FB₂ del 90,9 e del 59,7% rispettivamente in Kws e Mas 54 A (tabella 1).

Tabella 1. Influenza della pulitura e/o essiccazione sulla produzione di fumonisine (B₁+B₂) nella granella di tre ibridi di mais T 26, Kws e Mas 54 A. Le medie con lettere differenti sono significativamente diverse fra di loro secondo il test LSD per P=0,05. <LQ = inferiore al limite di quantificazione (50µg/kg); nd = non determinato

TESI	T 26	KWS	MAS 54 A
	Fumonisine B ₁ +B ₂ (µg/kg)	Fumonisine B ₁ +B ₂ (µg/kg)	Fumonisine B ₁ +B ₂ (µg/kg)
Raccolta	1635 a	1750 a	1070 a
Pulitura	53 b	<LQ	220 c
Essiccazione	nd	160 b	431 b
Essiccazione e pulitura	73 b	<LQ	110 c

Effetti di trans-2-esenale su *F. verticillioides* e fumonisine

Il trattamento in postraccolta con le fumigazioni di trans-2-esenale alla dose di 200 µl/L è risultato molto efficace (100%) nel contenere le infezioni di *F. verticillioides* nella granella di mais. Mentre il trans-2-esenale non ha ridotto il contenuto di FB₁+FB₂ rispetto al testimone (tabella 2).

Tabella 2. Attività delle fumigazioni di trans-2-esenale sulle infezioni di *Fusarium verticillioides* e sul contenuto di fumonisine nella granella di mais T 26 dopo 14 giorni di incubazione a 25°C. Le medie con lettere differenti sono significativamente diverse fra di loro secondo il test LSD per P=0,05

Tesi	Dose (µl/L)	Cariossidi Infette (%)	Fumonisine B ₁ +B ₂ (µg/kg)
Testimone	0	98 a	920 a
Trans-2-esenale	200	0 b	950 a

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Alla luce di questi risultati, la pulitura e l'essiccazione della granella di mais in postraccolta possono ritenersi mezzi di prevenzione delle infezioni di *F. verticillioides* e di riduzione delle fumonisine. La pulitura della granella, con l'allontanamento di spezzati e cariossidi infette, ha fornito i migliori risultati nel controllo delle infezioni e nella riduzione delle fumonisine. Comunque l'eliminazione delle cariossidi infette non è sempre possibile perché il *F. verticillioides*, essendo un patogeno endofita, può infettare la granella senza manifestare sintomi esterni. Quindi l'essiccazione rimane il metodo di prevenzione più indicato in postraccolta per la riduzione delle infezioni e delle fumonisine. Dai nostri risultati emerge una

correlazione positiva fra la popolazione di *F. verticillioides* e il contenuto di umidità nelle cariossidi, in accordo con quanto è stato osservato da Orsi *et al.* (2000). Questi risultati indicano che questo patogeno, sebbene possa sopravvivere nella granella essiccata, cresce meglio in condizioni di maggiore umidità.

Recenti studi (Da Silva *et al.*, 2008), condotti sull'effetto che l'intervallo di tempo fra la raccolta e il processo di essiccazione manifesta sulla contaminazione di fumonisine, hanno evidenziato che il ritardo dell'essiccazione può aumentare i livelli di questa micotossina.

Il trans-2-esenale alla dose di 200 µl/L è risultato molto efficace (100%) nel contenere le infezioni di *F. verticillioides* nella granella di mais, ma non ha ridotto rispetto al testimone il contenuto di FB₁+FB₂. In accordo con i risultati di Marin *et al.* (2001) non è risultata nessuna correlazione fra l'inibizione della crescita del patogeno e la riduzione della micotossina. In particolare, studi condotti sugli effetti della interazione fra il contenuto di fumonisine e *Aspergillus parasiticus*, produttore di aflatossine, hanno evidenziato che la presenza di questo patogeno ha ridotto le infezioni di *F. verticillioides*, ma non ha influenzato la produzione di fumonisina. Inoltre alcuni studi indicano che la produzione e la riduzione delle fumonisine sono stati influenzati dal contenuto di umidità della granella (Velluti *et al.*, 2004). Infatti alcuni olii essenziali hanno inibito la crescita di *F. verticillioides*, mentre la produzione di fumonisina è stata ridotta solo nella granella con umidità di 0,99 a_w (acqua attiva).

Ringraziamenti

Lavoro svolto con il contributo RFO.

LAVORI CITATI

- Bacon C.W., Bennett R.M., Hinton D.M., Voss K.A., 1992. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Disease*, 76, 144-148.
- Commissione Europea, 2007. Regolamento N°1126, 28 settembre 2007. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 255, 14-17.
- Da Silva M., Garcia G.T., Vizoni E., Kwamura O., Hirooka E.Y., Ono E.Y.S., 2008. Effect of the time interval from harvesting to the pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn from the State of Paraná, Brazil. *Food, Additives and Contaminants*, 25, 642-649.
- Desjardins A.E., Plattner R.D., Lu M., Claflin L.E., 1998. Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production. *Plant Disease*, 82, 953-958.
- Gelderblom W.C., Jaskiewicz K., Marasas W.F., Thiel P.G., Horak R.M., Vlegaar R., Kriek N.P., 1988. Fumonisins-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1806-1811.
- Iotti M., Zambonelli A., 2006. A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizas by PCR. *Mycological Research*, 110, 60-65.
- Juglai S., Govinden R., Odhav B., 2002. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of Food Protection*, 65, 683-687.
- Marín S., Albareda X., Ramos J.A., Sanchis V., 2001. Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B₁ and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1060-1068.

- Menniti A.M., Gregori R., Neri F., 2010. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 304-309.
- Miller J.D., 2001. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environmental Health Perspectives*, 109 (Suppl 2), 321-324.
- Munkvold G.P., Hellmich R.L., Showers W.B., 1997. Reduced *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology*, 87, 1071-1077.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O., 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, 1-193.
- Neri F., Mari M., Menniti A.M., Brigati S., 2006a. Activity of trans-2-hexenal against *Penicillium expansum* in 'Conference' pears. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1186-1193.
- Neri F., Mari M., Menniti A.M., Brigati S., Bertolini P., 2006b. Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 101-108.
- Ono E.Y.S., Sasaki E.Y., Hashimoto E.H., Hara L.N., Corra B., Itano E.N., Sugiura T., Ueno Y., Hirooka E.Y., 2002. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. *Food, Additives and Contaminants*, 19, 1081-1090.
- Orsi R.B., Correa B., Possi C.R., Schammass E.A., Nogueira J.R., Dias S.M.C., Malizzi M.A.B., 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvest and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research.*, 36,75-87.
- Paster N., Menasherov M., Ravid U., Juven B., 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*, 58, 81-85.
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S., van Schalkwyk D.J., 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82, 353-357.
- 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 *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3225-3226.
- Velluti A., Sanchis V., Ramos A.J., Marín S., 2004. Effect of essential oils of cinnamon, clove, lemon grass, oregano and palmarosa on growth of and fumonisin B₁ production by *Fusarium verticillioides* in maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1141-1146.