

RISULTATI DI UN PROGETTO DI RICERCA TRA ISTITUZIONI PUBBLICHE E PRIVATE

# Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento

**La fusariosi della spiga del frumento rappresenta una delle principali fonti di contaminazione da micotossine, in particolare da deossinivalenolo (DON), e quindi una problematica di rilievo anche in termini di sicurezza alimentare. Di interesse pratico potrebbe essere il modello di previsione del rischio agronomico in quanto permetterebbe di agire durante la coltivazione per contenere e stimare il livello di contaminazione da DON**

C. Campagna, M. Haidukowski, D. Pancaldi, M. Pascale, S. Ravaglia, M. Silvestri, A. Visconti

In questi ultimi anni si sta ponendo sempre maggiore attenzione ai temi legati alla sicurezza alimentare, sia a livello nazionale che internazionale. La presenza di micotossine, in particolare di deossinivalenolo (DON), nei frumenti e derivati, segnalata in varie indagini condotte nell'ambito di progetti europei e internazionali, oltre a costituire un argomento prioritario in termini di sicurezza alimentare, rappresenta un importante problema di campo associato alla fusariosi della spiga. Da secoli il frumento è alla base dell'alimentazione umana e animale e la presenza di micotossine può rappresentare sia un potenziale rischio per la salute pubblica, sia un concreto impedimento alla sua commercializzazione.

Rischio reale o prudenza esagerata? Poco importa, perché se il consumatore non è assicurato, qualunque sia la realtà, l'esistenza stessa delle micotossine e soprattutto approcci scandalistici o superficiali da parte dei media possono sicuramente far correre un grave rischio alla filiera cerealicola.

Questa considerazione e la prospettiva di una imminente regolamentazione europea sui limiti di tolleranza di alcune micotossine prodotte da funghi del genere *Fusarium* in cereali e prodotti derivati fanno sì che questo problema debba essere affrontato in maniera esaustiva.

Quattro anni fa è iniziato un progetto di collaborazione trasversale che ha coinvolto istituzioni pubbliche e private interessate alla filiera cerealicola (Syngenta Crop Protection; Dipartimento di protezione e valorizzazione agroalimentare dell'Università di Bologna; Istituto di scienze delle produzioni alimentari, CNR di Bari; Società italia-

na sementi; Barilla G.&R. Fratelli; Consorzio agrario di Bologna e Modena; Consorzio agrario di Ravenna) con lo scopo di maturare le adeguate conoscenze sull'argomento prima di essere costretti da un'emergenza di carattere igienico-sanitario a farlo individualmente, come già avvenuto in altri settori o per altre micotossine (emergenza aflatossine, autunno 2003).

Si è preferito così sfruttare l'opportu-



Spighe di frumento con tipici sintomi della fusariosi della spiga

## Tabella 1 - Principali specie fungine associate alla fusariosi della spiga e micotossine prodotte

Specie	Micotossine
<i>Fusarium graminearum</i>	DON, AcDON, NIV, FUS, ZEN
<i>Fusarium culmorum</i>	DON, AcDON, NIV, ZEN, ZOH
<i>Fusarium avenaceum</i>	MON, BEA, enniatine
<i>Fusarium poae</i>	DAS, NIV, FUS, T-2
<i>Microdochium nivale</i>	

DON = deossinivalenolo; AcDON = 13- o 15- acetildeossinivalenolo; NIV = nivalenolo; FUS = fusarenone X; ZEN = zearalenone; ZOH = zearanelolo; MON = moniliformina; BEA = beauvericina; DAS, diacetossiscirpenolo, T-2 = tossina T-2,

nità di fare avanzare insieme le diverse figure impegnate nella filiera cerealicola italiana, cominciando dai produttori, per proporre ai consumatori un'alimentazione di qualità sempre superiore.

Le forti sinergie attivate ci hanno permesso di ottenere un quadro esaustivo delle fonti di rischio e, soprattutto, delle azioni preventive di controllo che, se correttamente implementate, possono trasformare un potenziale problema in un forte vantaggio competitivo per la produzione nazionale. Si sono, infatti, acquisiti gli elementi conoscitivi e gli strumenti utili per la gestione del rischio da contaminazione di deossinivalenolo nel frumento circa due anni prima dell'entrata in vigore a pieno regime della legislazione in materia prevista nel 2006.

Nelle pagine seguenti vengono riassunti i risultati di questi quattro anni di attività, illustrati agli operatori della filiera anche nel corso di un incontro organizzato a S. Lazzaro di Savena (Bologna) il 5 ottobre 2004. Nella consapevolezza che tutto il lavoro svolto non possa essere condensato in così poco spazio, rinviamo per maggiori dettagli ad articoli sui singoli aspetti che abbiamo già pubblicato su riviste specializzate o che stiamo di pubblicare nei prossimi mesi.

## Diffusione e importanza delle micotossine da *Fusarium* nel frumento

Le micotossine sono prodotti tossici del metabolismo secondario di varie specie fungine, in particolare del genere *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. La presenza di micotossine in prodotti di origine vegetale destinati sia all'alimentazione umana che animale è continuamente segnalata in indagini condotte in tutto il mondo, anche a concentrazioni tali da indurre intossicazioni alimentari (micotossicosi) (Bottalico, 1998).

Le micotossine che con più frequenza sono ritrovate nel frumento, sia tenero che duro, sono le tossine prodotte da funghi del genere *Fusarium*, in particolare *F. graminearum* e *F. culmorum*, principali responsabili della cosiddetta fusariosi della spiga (tabella 1), una sindrome che colpisce vari

cereali causando disseccamenti parziali o totali della spiga con conseguenti ripercussioni sulla resa in granello. Inoltre, le cariossidi infette determinano seri problemi di sicurezza alimentare, poiché diverse specie di *Fusarium*, in condizioni ambientali favorevoli, possono produrre micotossine che si accumulano nelle cariossidi.

In particolare *F. graminearum* e *F. culmorum* producono il deossinivalenolo (DON), detto anche vomitossina, una micotossina che nei mammiferi può causare effetti neurotossici e immunotossici ed è responsabile di sindromi emetiche e anoressiche negli allevamenti zootecnici (Rotter *et al.*, 1996). Una recente indagine condotta dalla Commissione congiunta di esperti di additivi alimentari (Jecfa) dell'Organizzazione mondiale della sanità (WHO) e della FAO ha mostrato come il DON sia un comune contaminante del frumento in tutto il mondo (il 57% degli 11.022 campioni analizzati è risultato contaminato da DON a livelli fino a 30 ppm). Anche in Europa un'indagine condotta nell'ambito del progetto Scoop per la valutazione del rischio per l'uomo dovuto a esposizione a tossine prodotte da *Fusarium* ha mostrato che il 61% dei 6.358 campioni di frumento analizzati era contaminato da DON (FAO/WHO, 2001; Schothorst e Van Egmond, 2004).

La contaminazione di cereali e prodotti derivati da deossinivalenolo è quindi un problema di rilevanza internazionale, con gravi ripercussioni socio-economico-sanitarie, anche in vista degli imminenti limiti di legge che la Commissione europea sta fissando.

Le prime indagini condotte in Italia per valutare l'eventuale presenza di DON in campioni di cariossidi di frumento duro e tenero prodotto in Emilia-Romagna e in diverse regioni meridionali risalgono all'annata agraria 1994-95 (Lops *et al.*, 1998). Queste indagini, condotte dall'Istituto tossine e micotossine da parassiti vegetali del Cnr di Bari (oggi Istituto di scienze delle produzioni alimentari - Ispa) in collaborazione con il Dipartimento di protezione e valorizzazione agroalimentare (Diproval) dell'Università di Bologna, evidenziarono una diffusa contaminazione da DON nei campioni provenienti dall'Emilia-Romagna, talvolta anche a concentrazioni superiori a 1 ppm (mg/kg), mentre i campioni provenienti dalle regioni meridionali risultarono non contaminati. La contaminazione da DON era da attribuire soprattutto a *Fusarium graminearum*, per il quale è stata osservata una buona correlazione tra i valori percentuali di infezione osservati in campo e i livelli di tossina nelle cariossidi di frumento duro. Inoltre si è riscontrata una maggiore suscettibilità all'infezione fungina e una maggiore contaminazione da DON nei campioni di frumento duro rispetto a quelli di frumento tenero.



La fusariosi della spiga può colpire singole spighe

Da allora abbiamo condotto ulteriori indagini su frumento e su altri cereali e oggi sono disponibili maggiori informazioni sulla relazione tra clima, sviluppo della fusariosi della spiga e accumulo di DON nelle cariossidi (Pascale *et al.*, 2000; 2001; 2002). In particolare, l'incidenza e la gravità della malattia e la frequenza e i livelli di contaminazione di DON nelle cariossidi dipendono fortemente dalla quantità di inoculo presente sui residui colturali del terreno e dalle condizioni climatiche (alta temperatura, elevata umidità, piogge) che si verificano nel periodo tra la spigatura e la maturazione latteo-cerosa delle cariossidi. Ciò spie-

**Tabella 2 - Livelli di DON rilevati in frumento prodotto in Italia dal 1998 al 2004**

Annata	Frumento tenero			Frumento duro		
	campioni positivi (%)	valore medio (ppm)	valore massimo (ppm)	campioni positivi (%)	valore medio (ppm)	valore massimo (ppm)
1997-98	30	0,14	1,00	92	0,20	1,54
1998-99	61	0,22	0,96	83	0,25	1,20
1999-2000	38	0,61	3,00	61	1,10	6,42
2000-01	50	0,15	0,48	28	0,09	0,25
2001-02	100	0,59	1,86	79	0,42	3,90
2002-03	16	0,18	0,35	5	0,08	0,11
2003-04	4	0,11	0,11	5	0,17	0,85

Analizzati in totale 945 campioni (1998: 155; 1999: 268; 2000: 88; 2001: 109; 2002: 154; 2003: 89; 2004: 82).

ga la maggior frequenza con cui la tossina viene individuata nei campioni di frumento provenienti da areali dell'Italia settentrionale, dove le condizioni agroclimatiche sono più favorevoli allo sviluppo dei funghi tossigeni, rispetto a quelli provenienti dall'Italia centro-meridionale. Inoltre è stata dimostrata una stretta associazione tra fusariosi della spiga e presenza di DON nelle cariossidi. Negli anni e nelle

prove sperimentali in cui l'attacco della malattia è più elevato, infatti, si osserva sia una maggiore frequenza, sia un livello superiore di contaminazione da DON nelle cariossidi. Successivamente all'annata 1995, livelli anche elevati di DON sono stati ritrovati in campioni di frumento coltivato in Lombardia nel 2000 e in Emilia-Romagna nel 2002, due annate in cui la fusariosi della spiga è risultata particolarmente diffusa negli areali cerealicoli italiani (tabella 2).

## La fusariosi della spiga

### Patogeni coinvolti

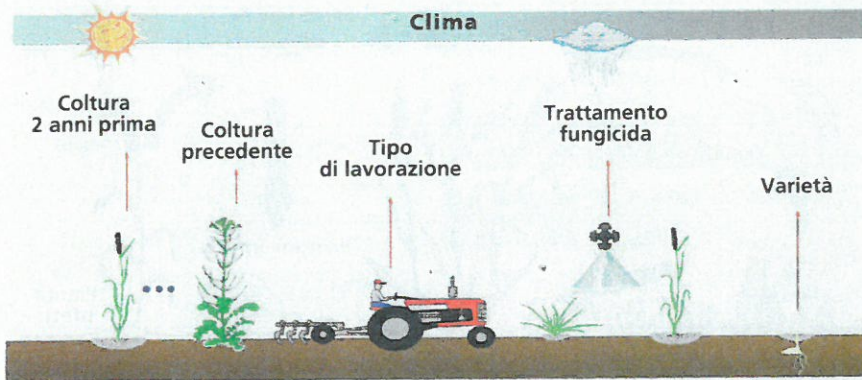
La fusariosi della spiga è una sindrome causata da diverse specie fungine appartenenti al genere *Fusarium* e *Microdochium* che, oltre a colpire il frumento, interessa gran parte delle specie cerealicole appartenenti alla famiglia delle graminacee, come orzo, avena, segale, triticale, riso, mais, sorgo, nonché graminacee spontanee appartenenti al genere *Bromus* e *Festuca*. La malattia è diffusa in tutte le aree del mondo in cui si coltivano cereali. Almeno una ventina di specie di *Fusarium* è stata associata a questa malattia, sebbene quattro siano le specie predominanti a livello mondiale: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* e *Fusarium poae*; a esse va aggiunto il *Microdochium nivale*. Sulla spiga queste specie possono coesistere o avvicinarsi in rapida successione.

In Italia, oltre alle 5 specie citate, ben altre 14 specie di *Fusarium* sono state associate, anche se con minor importanza, a questa malattia.

### Diffusione

Nel nostro Paese la fusariosi della spiga è conosciuta fin dal 1900, ma solo a partire dal 1995 si è diffusa in modo significativo. Nel periodo compreso tra il 1995 e il 2004 si è generalmente notata una maggior incidenza della fusariosi nelle regioni settentrionali monitorate (Emilia-Romagna e Lombardia) e centrali (Toscana, Umbria,

Figura 1 - Fattori che influenzano il livello di DON su frumento



Lazio e Abruzzo); nelle regioni meridionali, invece, la malattia è risultata spesso assente a causa delle condizioni climatiche (precipitazioni e temperatura) meno favorevoli allo sviluppo degli agenti causali, che si sono verificate nel periodo compreso tra la fine della spigatura e l'inizio della fioritura.

### Organi colpiti

Dopo la fioritura sulla spiga si evidenziano disseccamenti parziali o totali (a seconda della gravità dell'attacco fungino) dovuti all'invasione, da parte del micete, dei tessuti conduttori del rachide.

Le spighe, infatti, sono più sensibili agli attacchi dei miceti durante l'antesi, dato che è il polline che fornisce le sostanze nutritive (betaina e colina) che stimolano la germinazione delle spore di *Fusarium*.

Il patogeno penetra nel fiore seguendo i filamenti degli stami o arrivando direttamente nei tessuti fiorali, causando così il disseccamento della spighetta (disseccamento parziale). Quando il micete poi, proseguendo la sua colonizzazione, invade i tessuti conduttori del rachide, causa il disseccamento di vaste porzioni (sono interessate più spighette) o dell'intera spiga.

In presenza di periodi umidi o piovosi si può riscontrare la presenza di un feltro micelico rosa-arancione (sporodochi) tra le spighette infette.

Le infezioni della spiga sono anche la causa, a seguito della colonizzazione più o meno profonda dei tessuti della cariosside, della produzione di seme infetto, il quale rappresenta uno dei principali mezzi di diffusione della fusariosi del frumento, nonché l'organo in cui si accumulano maggiormente le micotossine.

In certi casi la cariosside, pur essendo infetta, non mostra i classici sintomi della fusariosi, per cui solo con una approfondita analisi micologica si può

fugare ogni dubbio e identificare i diversi agenti eziologici della malattia.

### Danni

La fusariosi della spiga è causa di danni quantitativi e qualitativi alla resa in granella.

**Danni quantitativi.** Consistono nella riduzione del peso di 1.000 semi e del peso ettolitrico, nella perdita di produzione, che in presenza di attacchi gravi può variare dal 30 al 70%. Si può citare in tal senso l'esperienza di un vasto territorio coltivato con grani primaverili nel Nord America (Red River Valley del Nord Dakota, Minnesota e Manitoba), la cui cerealicoltura è stata letteralmente messa in ginocchio dall'esplosione di epidemie di fusariosi della spiga succedutesi nel corso degli anni Novanta (Stack, 2000).

**Danni qualitativi.** Sono rappresentati da produzione di semente infetta; produzione di granella con un ridotto contenuto di proteine e glutine, con conseguenti ripercussioni sull'attitudine panificatoria e pastificatoria degli sfarinati; produzione di granella contaminata da micotossine (DON in particolare), che possono indurre stati patologici negli animali e nell'uomo.

### Fonti di inoculo e condizioni predisponenti le infezioni

La manifestazione della fusariosi della spiga è legata sia all'inoculo (ascospore, conidi) persistente sui residui colturali in campo, sia alla presenza della malattia sulle parti basali della pianta (fusariosi del piede), nonché a particolari condizioni ambientali (temperature relativamente alte, elevata umidità, abbondanti precipitazioni, vento) che si verificano a partire da fine spigatura alla maturazione latteo-cerosa delle cariossidi. Queste condizioni favoriscono la produzione e la diffusione sulle spighe dell'inoculo. Il momento di massima sensibilità della pianta alla malattia è l'inizio della fioritura (10-20% di antere visibili).

### Difesa

Il controllo della fusariosi della spiga va inserito in un progetto di lotta integrata che passa attraverso l'individuazione di aree a rischio (a causa di particolari condizioni climatiche), la scelta varietale, il tipo di agrotecnica da adottare (precessione colturale, corretta gestione dei residui colturali, semina, concimazione) e, infine, l'impiego di fungicidi a inizio fioritura (10-20% antere visibili). Riguardo a quest'ultimo aspetto, diverse esperienze condotte sia in Italia che in alcuni Paesi d'oltralpe hanno messo in evidenza che l'impiego di fungicidi IBS (inibitori della biosintesi degli steroli) ha un'efficacia che si aggira mediamente attorno al 40-70% e determina un'equivalente riduzione dei livelli di DON nella granella (35-60%).

### Monitoraggio

A partire dal 1995, anno in cui la fusariosi della spiga nel nostro Paese è comparsa in forma epidemica, e fino al 2002 è stato effettuato un monitoraggio tendente a individuare i principali agenti patogeni coinvolti.

Da questo studio è emerso che:

- *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* in tutti gli anni di sperimentazione sono risultati fra gli agenti causali della malattia, il primo particolarmente presente negli anni 1996, 1998, 2000 e 2002, il secondo nel 1997 e 2001;

- *Fusarium poae* ha fatto la sua comparsa a partire dal 1996 ed è stato particolarmente presente nel 2000 e 2001;
- *Fusarium avenaceum* nel 1998 è stato, dopo *F. graminearum*, il principale agente eziologico della malattia;

- *Fusarium equiseti* come patogeno corresponsabile della fusariosi è stato isolato nel 1997, 1999, 2001 e 2002;

- *Microdochium nivale* è stata la specie maggiormente responsabile della patologia nel 1995.

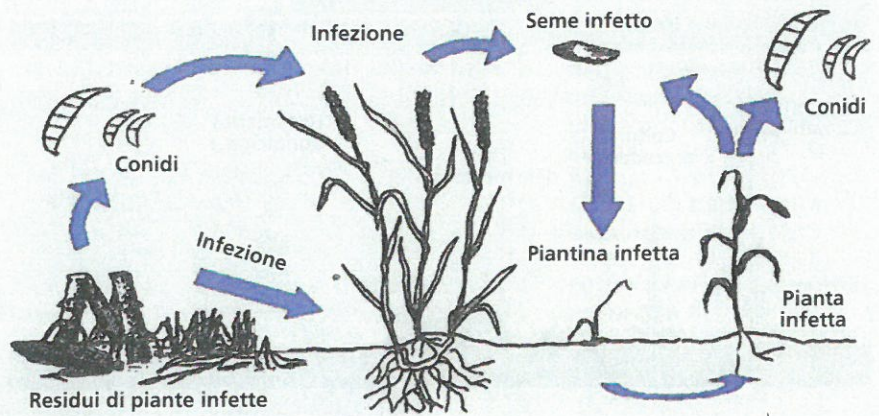
### Fattori che influenzano la fusariosi della spiga e l'accumulo di DON nella granella

La presenza di DON nella granella deriva fondamentalmente dalla combinazione di 3 fattori: in primo luogo un clima favorevole allo sviluppo della fusariosi della spiga, poi un forte potenziale di inoculo (in genere dai residui della coltura precedente) e, infine, la sensibilità intrinseca della varietà coltivata. Questi fattori sono stati analizzati e pesati singolarmente in numerose ricerche condotte in tutto il mondo, ma solo recentemente sono stati avviati studi sulle interazioni fra questi e l'influenza della difesa fitosanitaria sui livelli di DON nella granella (figura 1). Un lavoro specifico iniziato nel 1999 in Francia (oltre 3.000 analisi so-



Anche solo danni parziali alla spiga possono indurre la fusariosi

Figura 2 - Ciclo biologico di *Fusarium*



lo nelle annate 2000-01-02) e in Italia nel 2001 (oltre 40 prove sperimentali in totale con almeno 6 regioni/anno coinvolte, per un totale di oltre 800 analisi) ha permesso di quantificare l'effetto dei diversi fattori che influenzano la fusariosi della spiga, in particolare il clima, la coltura precedente, il tipo di lavorazione, la sensibilità varietale e la difesa fitosanitaria.

Di seguito si riportano sinteticamente i principali risultati di questi studi integrati con quelli di studi analoghi condotti da altre organizzazioni.

### Influenza del clima

Il clima è sicuramente il fattore principale ed è di fatto predominante sul rischio agronomico, infatti il potenziale di contaminazione si manifesta solo se si ha un andamento climatico favorevole alla maturazione dell'inoculo, all'infezione e al successivo sviluppo dei funghi.

Pioggie accompagnate da una temperatura superiore a 10 °C nel periodo precedente la fioritura favoriscono la produzione e la maturazione dei periceti. Al contrario lunghi periodi di siccità, o periodi molto freddi, limitano la loro produzione e/o la loro maturazione. Successivamente, durante la fioritura, è necessaria almeno una pioggia perché vi sia contaminazione delle spighe da parte del *Fusarium*, il cui ciclo biologico è riportato in figura 2, e quindi l'inizio dell'infezione, il cui sviluppo è ottimale con clima umido e assenza di eccessivi sbalzi termici.

Dai lavori da noi effettuati risulta che passando da situazioni caratterizzate da condizioni climatiche sfavorevoli allo sviluppo del *Fusarium* a situazioni meteorologiche favorevoli allo stesso, il contenuto medio di DON nella granella passa da 0,24 a 1,25 ppm, con un

Tabella 3 - Valori di DON (ppm) rilevati nelle prove varietali condotte in Italia nel triennio 2002-2004

Anno	Area geografica	Numero località	Coltura	Totale varietà	Non trattato		Trattato in fioritura (ciproconazolo+procloraz)	
					estremi	media	estremi	media
2002	Centro-sud	5	grano duro	12	0,04 - 0,84	0,44	nd - 0,54	0,13
2003	Centro-sud	5	grano duro	13	nd - 0,12	0,04	nd - 0,07	0,02
2004	Centro-sud	6	grano duro	11	nd - 0,22	0,09	nd - 0,13	0,01
2002	Nord	4	grano tenero	5	0,11-1,86	0,76	0,02-1,28	0,51
2003	Nord	5	grano tenero	6	nd - 0,38	0,12	nd - 0,23	0,09
2004	Nord	4	grano tenero	6	nd - 1,24	0,31	nd - 0,94	0,21

nd = non rilevabile (< 0,02 ppm).

fattore di moltiplicazione pari a 5,2.

### Influenza della coltura precedente

La coltura precedente è sicuramente il fattore agronomico a maggior peso specifico che influenza il livello di DON. Gli studi effettuati hanno chiaramente messo in evidenza che il mais e il sorgo (che sono i substrati su cui meglio si perpetua e si sviluppa il *Fusarium*), quando precedono il frumento nella rotazione, possono portare al raggiungimento di valori molto alti di DON nella granella. È stato dimostrato che fra il mais da granella o il sorgo e tutte le altre colture esiste un fattore di moltiplicazione di 4,7 (in media 1,02 ppm di DON con precessione di mais da granella o sorgo, 0,52 ppm con mais da foraggio e 0,22 ppm con tutte le altre colture). Altre due importanti informazioni emerse sono che il frumento, a differenza di quanto ritenuto da alcuni autori, come coltura precedente non influenza significativamente il livello di DON nella granella; inoltre quando si asportano i residui colturali della coltura dell'anno precedente (ad esempio mais per trinciato), sicuramente si ha un forte calo dell'influenza di questa, in quanto viene a mancare il substrato su cui si trasmette e si sviluppa l'inoculo. Dati analoghi sono stati prodotti da uno studio pluriennale in Germania (Muller *et al.*, 1997) e

da indagini specifiche condotte da Arvalis in Francia (AA.VV. 2003; 2004).

### Influenza della lavorazione

Quando il *Fusarium* è presente nel mais alla raccolta in autunno, si conserva nei residui fino alla primavera successiva. È stato dimostrato, inoltre, che l'interramento dei residui stessi a 5 cm di profondità consente di ridurre di oltre il 90% la vitalità di

specie di *Fusarium* dopo 6 mesi e, conseguentemente, anche il potenziale di inoculo (Gilbert, 2002). In assenza di aratura, anche tecniche quali la frantumazione, che favorisce la decomposizione degli stocchi, possono avere un effetto considerevole nell'abbassare sensibilmente il potenziale di inoculo, anche se l'efficacia complessiva è sicuramente inferiore all'interramento.

Dalle esperienze francesi risulta che i livelli di DON osservati sono circa la metà quando i residui sono stati frantumati in autunno rispetto a quando si effettua la semina con lavorazione minima o su sodo senza frantumazione. Per quanto riguarda l'influenza delle lavorazioni questa ha un fattore di moltiplicazione pari a 5; infatti negli oltre 3.000 casi monitorati il valore medio di DON nella granella passa da 0,30 ppm negli appezzamenti in cui è stata effettuata un'aratura (interramento dei residui colturali) a 1,51 ppm in quelli con semina su sodo o minima lavorazione.

### Influenza della varietà

I diversi genotipi hanno sicuramente suscettibilità diversa agli agenti causali della fusariosi della spiga. In particolare le varietà di frumento tenero hanno evidenziato livelli e variabilità di tolleranza più accentuati, mentre minori sono le differenze fra quelle di frumento duro. Lo stato attuale delle conoscenze per-

Figura 3 - Valutazione del rischio agronomico

Coltura precedente	Tipo lavorazione	Sensibilità varietale a <i>Fusarium</i>		
		Poco sensibile	Mediamente sensibile	Sensibile
Altre	Tutte	I	I	II
		I	II	III
Mais	Aratura	I	II	III
	Minima lavorazione-sodo	III	III	IV
	Foraggio Granella	III	IV	IV

Grado di rischio: I = basso; II = medio-basso; III = medio-alto; IV = alto.



Situazione a più alto rischio: semina su sodo con presenza di residui colturali di mais

mette di distinguere alcuni processi che spiegano le differenze di suscettibilità agli agenti eziologici responsabili della fusariosi della spiga. La resistenza varietale a questa malattia è sicuramente il fattore principale, poiché si mettono in gioco meccanismi biochimici di difesa che rendono più difficile sia l'inoculo fungino che il successivo sviluppo dei patogeni sulla spiga. È comunque molto difficile stabilire esattamente una scala di sensibilità in quanto la variabile agronomica e quella climatica sono sicuramente preponderanti rispetto a quella genetica. Una classificazione varietale attendibile, in funzione del tenore di DON rilevabile nella granella, oltre che della sensibilità alle diverse specie di *Fusarium*, è estremamente complessa da ottenere e attualmente è stata ufficializzata solo in Germania, si sta rendendo disponibile in Francia, malgrado tutto il lavoro effettuato in detto Paese, mentre in Italia sono utilizzabili solo poche e limitate esperienze in materia.

Prendendo in considerazione tutte

le analisi effettuate, se si dividono comunque le varietà saggiate in 3 gruppi (bassa, media e alta suscettibilità al *Fusarium*), si passa da un livello medio di DON nella granella di 0,16 ppm delle meno suscettibili a 0,53 ppm di quelle a maggiore suscettibilità, con un fattore di moltiplicazione di 3,7. Alcune varietà sono dunque da privilegiare, ma attenzione; la sola scelta di una varietà tollerante non può sicuramente essere considerata sufficiente per porsi completamente al riparo dal rischio di contaminazione da DON.

### Influenza della difesa fitosanitaria

Per quanto riguarda i trattamenti fungicidi, prove sperimentali hanno confermato che le sole sostanze attive registrate in Italia efficaci sulla fusariosi sono: procloraz, tebuconazolo e bromuconazolo. L'efficacia del trattamento, quando effettuato tempestivamente fra l'inizio della fioritura e il 20% di antere visibili, va dal 40 al 70% sulla fusariosi,

con una conseguente riduzione del DON dal 35 al 60%. La finestra ottimale di intervento è però di circa 3 giorni, quindi la riduzione di DON ottenuta nelle prove sperimentali, nella realtà di campagna, con le note problematiche di tempestività di applicazione, scende al 15-45% (mediamente su un comprensorio circa il 30%). La difesa fitosanitaria è quindi uno strumento fondamentale, in quanto una riduzione del 30% a livello di comprensorio è un dato sicuramente importante, ma non ci permette di gestire efficientemente i picchi massimi della malattia dovuti alla concomitanza di più fattori predisponenti lo sviluppo della fusariosi della spiga.

Citiamo solo due esperienze fra le diverse effettuate: uno studio triennale di base condotto in Emilia-Romagna dagli autori del presente lavoro e i campi varietali sperimentali organizzati da SIS e Syngenta dal 2002 al 2004. I risultati di quest'ultima sperimentazione parzialmente pubblicati (Ravaglia e Campagna, 2003) sono riportati in tabella 3 e confermano quanto affermato precedentemente.

L'esperienza triennale (2002-04) condotta in Emilia-Romagna su frumento duro e tenero ha messo in evidenza che nel 2002 l'impiego a inizio fioritura di ciproconazolo+procloraz o tebuconazolo+azoxystrobin, in presenza di una forte infezione di fusariosi indotta artificialmente con inoculi di *F. graminearum* e *F. culmorum*, ha consentito di ridurre la gravità della malattia mediamente del 30-70% rispetto al testimone non trattato, ha favorito un aumento medio della produzione di granella di 2-3,2 t/ha e ha consentito una riduzione media di DON nelle cariossidi del 38-87% (Haidukowski *et al.*, in stampa).

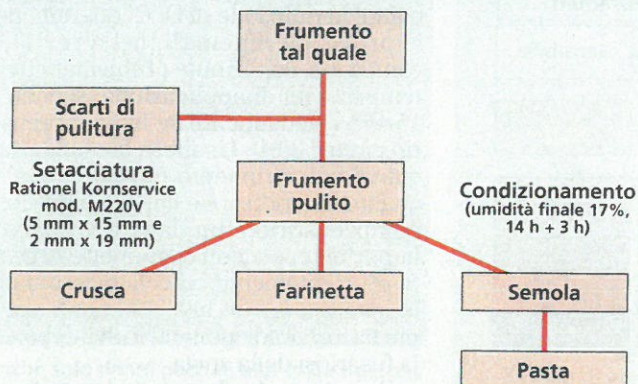
Nel 2003 (campo inoculato artificialmente), anche se in presenza di una sporadica infezione da *Fusarium* (per condizioni climatiche sfavorevoli allo sviluppo della malattia), si è avuto, con l'impiego degli stessi fungicidi nella medesima epoca, una riduzione media di DON nelle cariossidi del 47-70%.

Nel 2004, pur in presenza di un'infezione fungina naturale esigua (non quantificabile) al punto da non permettere di valutare l'efficacia dei fungicidi, sulla granella delle tesi testimoni è stata riscontrata, ugualmente, una quantità di DON variabile da 0,20 a 1,34 ppm.

I trattamenti con ciproconazolo+procloraz o tebuconazolo+azoxystrobin hanno ridotto significativamente il contenuto di DON nelle cariossidi (fino al 70%) rispetto al testimone non trattato.

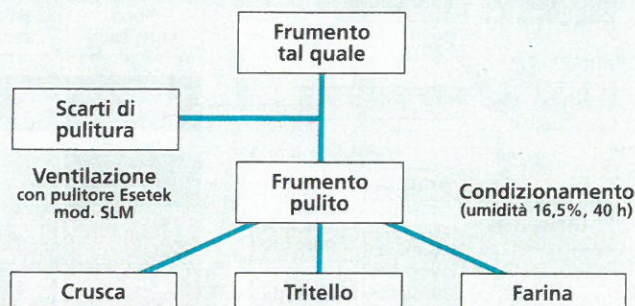
Queste esperienze ci hanno confermato, da un lato, che il cerealicoltore può disporre di fungicidi in grado di

**Figura 4 - Prodotti e sottoprodotti della molitura del grano duro**



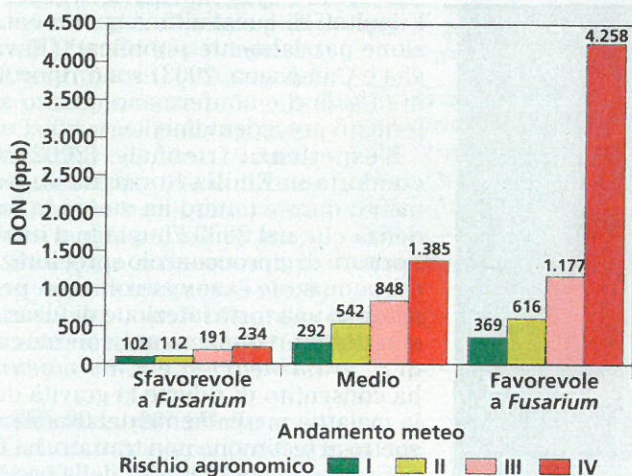
Mulino Bühler modello MLU 202.

**Figura 5 - Prodotti e sottoprodotti della molitura del grano tenero**



Mulino modello Chopin CD1.

**Grafico 1 - Interazione fra il rischio agronomico e l'andamento meteo nel triennio 2000-2002**



(\*) 1.000 ppb = 1 ppm (1 mg/kg).



Spighe con esiti di un attacco di fusariosi

contenere la fusariosi della spiga e di ridurre i livelli di DON nelle cariossidi e, dall'altro, che, anche in presenza di infezioni non ben conclamate, vi è la possibilità di riscontrare DON nelle cariossidi.

Si riconferma quindi che la fusariosi della spiga è una malattia a eziologia ed epidemiologia molto complessa, influenzata da molti fattori, e il suo controllo va inserito in un programma di lotta integrata in cui l'impiego di fungicidi è uno dei mezzi da sfruttare nei momenti di maggior rischio.

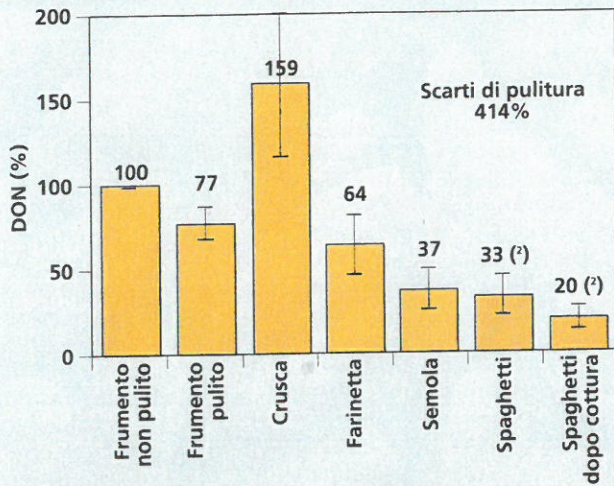
**Quali azioni intraprendere per limitare i rischi**

Il lavoro effettuato in questi anni ci ha permesso di quantificare, come abbiamo visto, il peso di ogni singolo fattore, ma soprattutto ha consentito di valutare correttamente le loro interazioni e il rischio potenziale nelle diverse situazioni. Inoltre le conoscenze acquisite sulla problematica consentono di attuare una

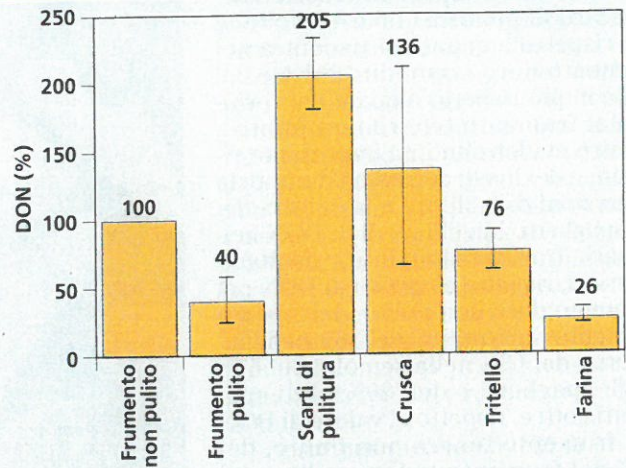
gestione più mirata da parte degli operatori agricoli che si trovano ad affrontare situazioni di rischio significativamente diversificate. Anche intuitivamente è chiaro che seminare frumento su sodo dopo mais predispone a un maggior rischio di contaminazione da DON delle cariossidi rispetto all'interramento degli stocchi prima della semina. Dall'analisi e dall'elaborazione della mole di dati prodotti è stato possibile realizzare una tabella di rischio potenziale (figura 3) con una chiave di valutazione che prevede 4 livelli di Rischio Agronomico. Tale chiave è stata poi validata utilizzando i risultati dei lavori effettuati direttamente in questi anni, correlati anche dalle informazioni sull'andamento meteorologico.

Emerge chiaramente che in condizioni climatiche sfavorevoli allo sviluppo della fusariosi in tutte le situazioni agronomiche non vi sono problemi particolari, mentre le situazioni a più alto rischio agronomico diventano

esplosive in caso di andamento meteo favorevole. Nel grafico 1 possiamo sinteticamente affermare che in situazione di Rischio Agronomico I e II, anche in presenza di condizioni climatiche particolarmente favorevoli alla malattia, ben difficilmente le cariossidi di frumento risulteranno contaminate da DON a livelli superiori ai valori previsti dalla legge. Viceversa in condizioni di Rischio Agronomico IV, anche in presenza di trattamento fungicida, se si hanno piogge in fioritura, difficilmente si riuscirà a rimanere entro i futuri limiti di legge. In campo l'obiettivo fondamentale da perseguire è la riduzione del rischio potenziale, ottenuta operando su tutti i fattori coinvolti, per poter agevolmente rientrare nei futuri limiti di legge, qualunque sia il decorso stagionale. A questo riguardo è importante ricordare che nella situazione italiana, in cui le piogge in fioritura sono meno frequenti rispetto agli areali del Nord Europa, se si evita-

**Grafico 2 - Distribuzione del DON nei prodotti di molitura del frumento duro e negli spaghetti prima e dopo cottura (\*)**

(\*) Valore medio  $\pm$  SD (n = 9), frumento duro contaminato nell'intervallo 0,3-13,1  $\mu$ g/g. (\*) Calcolato sul peso secco.

**Grafico 3 - Distribuzione del DON nei prodotti di molitura del frumento tenero (\*)**

(\*) Valore medio  $\pm$  SD (n = 3), frumento tenero contaminato a livelli di 0,9, 2,8 e 7,3  $\mu$ g/g.

no le situazioni a maggior rischio agronomico (grafico 1), con gli attuali limiti proposti difficilmente si avranno problemi pratici sulle partite di cereali prodotte.

### Distribuzione di DON nei prodotti di molitura e trasformazione

Chiarite le problematiche e le interazioni di campo, si è voluto investigare l'influenza dei processi di lavorazione sui livelli di DON nei prodotti di trasformazione. È questo un argomento di grande interesse, sia per la definizione dei limiti di tolleranza nei prodotti trasformati, sia perché sono questi che vengono normalmente utilizzati nell'alimentazione sia umana che animale.

Secondo la normativa europea non è consentito l'utilizzo di tecniche di decontaminazione chimica o il ricorso alla miscelazione per diminuire i livelli di contaminanti in lotti di granaglie con valori superiori ai limiti consentiti. Queste partite non possono perciò essere utilizzate per alimentazione umana ma devono essere destinate ad altri usi. Va comunque sottolineato che i normali processi di lavorazione e trasformazione possono, per loro natura, contribuire ad abbattere, in modo anche considerevole, l'eventuale presenza di tossine nella materia prima. Già nella prima trasformazione, infatti, il grano viene sottoposto a una fase di pulitura in cui, mediante tecniche di vagliatura, separazione densimetrica, aspirazione ecc., vengono eliminati tutti i materiali estranei e di scarto. In questa fase vengono anche allontanate le cariossidi maggiormen-

te contaminate che, in genere, si presentano striminzite, di piccole dimensioni, scolorite, malformate e più leggere.

Alcuni studi hanno mostrato che i processi di molitura del frumento comportano una redistribuzione del DON nelle diverse frazioni di macinazione e che, nel caso del grano duro, la concentrazione della tossina si riduce ulteriormente in seguito alla cottura della pasta. Infatti il DON, sebbene sia un composto termostabile, è solubile in acqua. La cottura in abbondante acqua, come nel caso della pasta, ne influenza di conseguenza il livello nel prodotto al momento dell'utilizzo (Abecassis e Feillet, 2003).

Allo scopo di studiare la distribuzione del DON nei prodotti e sottoprodotti di molitura del frumento duro e tenero e nella pasta è stato, quindi, condotto presso l'Istituto di scienze delle produzioni alimentari del CNR di Bari, in collaborazione con Barilla G.&R. Fratelli, uno studio in cui è stato valutato, inoltre, l'effetto della cottura sul contenuto di DON negli spaghetti.

Sono stati utilizzati 6 campioni di frumento duro (cv Duilio, Bracco e Orobel) e tre campioni di frumento tenero (cv Genio e Serio) provenienti da prove parcellari inoculate artificialmente con ceppi di *Fusarium* produttori di DON e tre campioni di frumento duro (miscele di differenti varietà) provenienti da parcelle non inoculate ma con diverse intensità di fusariosi della spiga. In particolare i campioni utilizzati presentavano concentrazioni di DON pari a: 0,3 - 0,6 - 1,0 ppm (frumento duro naturalmente contaminato); 1,6 - 2,2 - 4,5 - 7,9 - 9,3 - 13,1 ppm (frumento duro artificialmente inocu-

lato); 0,9 - 2,8 - 7,3 ppm (frumento tenero artificialmente inoculato). Si è potuto quindi disporre di un ampio intervallo di concentrazioni di DON non solo rappresentativo dei livelli rilevabili in natura, ma comprensivo anche di valori estremi difficilmente riscontrabili, ma fondamentali per ottenere risultati solidi e rappresentativi.

I campioni di frumento sono stati puliti mediante ventilazione e setacciatura e, dopo condizionamento (17 ore, umidità del 17% per il frumento duro, e 40 ore, umidità del 16,5% per il frumento tenero), sono stati sottoposti a molitura utilizzando il molino Buhler modello MLU 202 e semolatrice Namad per i campioni di frumento duro e il molino modello Chopin CD1 per i campioni di frumento tenero. La semola è stata quindi impastata con l'aggiunta del 28% di acqua ed estrusa (Sercom pasta press) per la preparazione degli spaghetti. Gli spaghetti sono stati cotti per 7 minuti in acqua bollente.

Tutti i prodotti e sottoprodotti della molitura (figure 4 e 5), gli spaghetti prima e dopo cottura (peso secco) e l'acqua di cottura sono stati analizzati utilizzando un metodo HPLC per determinare il contenuto di DON dopo purificazione degli estratti con colonne a immunoaffinità.

Nei grafici 2 e 3 è riportata la distribuzione percentuale del DON nei prodotti di molitura del frumento duro e tenero e negli spaghetti prima e dopo la cottura. I risultati rappresentano il valore medio dei dati dei 9 campioni di frumento duro (3 analisi per campione) e dei 3 campioni di frumento tenero (3 analisi per campione) nell'intervallo di contaminazione considerato: 0,3-13,1 ppm per il frumento duro e

0,9-7,3 ppm per il frumento tenero.

I risultati delle analisi mostrano che il DON si accumula nella crusca e negli scarti di pulitura (1,6 e 4,1 volte in più rispetto a quanto si riscontra nel frumento duro non pulito e 1,4 e 2,0 volte in più rispetto a quanto si verifica nel frumento tenero non pulito), mentre evidenziano un'importante riduzione dei livelli di tossina durante le operazioni di molitura e la cottura degli spaghetti. I livelli medi di DON nelle varie frazioni di molitura risultano inferiori, rispetto al valore di DON nel frumento duro non pulito, del 23% nel frumento duro pulito, del 36% nella farinetta, del 63% nella semola, del 67% negli spaghetti e dell'80% negli spaghetti cotti e, rispetto al valore di DON nel frumento tenero non pulito, del 60% nel frumento tenero pulito, del 23% nel tritello e del 74% nella farina.

La distribuzione di DON nei prodotti di molitura dipende anche dal grado di penetrazione dell'infezione fungina nell'endosperma. La maggiore riduzione di DON osservata dopo pulizia del frumento tenero (60%), rispetto al frumento duro (23%), può essere imputata, oltre che alle numerose variabili in gioco, anche a una maggiore efficienza della strumentazione utilizzata per la pulitura del frumento tenero (pulitore Rationel Kornservice modello SLN) nel rimuovere le cariossidi striminzite e contaminate dalle cariossidi sane rispetto a quella utilizzata per la pulizia del frumento duro (pulitore Rationel Kornservice modello M 220 V). Anche l'utilizzo di setacci con maglie di misura diversa nei due casi può aver contribuito a generare questa differenza. L'efficienza di pulizia dipende, infatti, dalla ripartizione dei livelli di contaminazione di DON nelle cariossidi striminzite, più leggere e visibilmente infette rispetto ai livelli di DON nelle cariossidi sane.

I risultati delle analisi degli spaghetti prima e dopo cottura e dell'acqua di cottura mostrano una diminuzione dei livelli di DON negli spaghetti cotti e la presenza della tossina nell'acqua di cottura. Come conseguenza della solubilità del DON in acqua, negli spaghetti dopo cottura può essere stimato un fattore di ritenzione del 55-60% dei livelli di DON contenuti nella pasta (Visconti *et al.*, 2004).

I risultati presentati contribuiscono alle conoscenze sulla distribuzione del DON nei prodotti di molitura del frumento e degli effetti della cottura sul contenuto di tossina nella pasta. Questi dati sono stati presentati in sede di Commissione europea a Bruxelles e hanno contribuito, fornendo una base scientifica solida, alla definizione di li-



**Cariossidi raccolte da spighe di frumento duro colpite da *Fusarium* spp.**

miti per il DON tali da salvaguardare la salute dei cittadini europei senza penalizzare la filiera grano duro/pasta.

### **Conclusioni**

Il conseguimento di rese ettariarie elevate rappresenta tradizionalmente l'obiettivo principale per i produttori agricoli. Più recentemente, una crescente attenzione è stata dedicata agli aspetti qualitativi legati alla trasformazione e quindi alle caratteristiche tecnologiche delle materie prime. Da ultimo, alcune note vicende verificatesi nel corso degli ultimi anni (pollo alla diossina, vacca pazza, ecc.) hanno portato prepotentemente alla ribalta le tematiche legate alla sicurezza alimentare. Su questi argomenti anche le diverse filiere agroalimentari italiane sono chiamate a impegnarsi ulteriormente, per migliorare i propri standard qualitativi (oltre che quantitativi), con l'obiettivo di adeguarsi a uno scenario in continua e dinamica evoluzione (si pensi al nuovo mercato comunitario e al crescente processo di globalizzazione), che richiede un sempre maggior grado di specializzazione e capacità competitiva anche dei diversi attori della filiera cerealicola, che parte dal campo e giunge sino alla tavola del consumatore.

La fusariosi della spiga del frumento può rappresentare, per tutte le argomentazioni precedentemente esposte, una problematica di assoluto rilievo anche in termini di sicurezza alimentare. Infatti, per l'ottenimento di materie prime qualitativamente idonee alla commercializzazione esistono già normative di riferimento in diversi Paesi europei, verso cui peraltro l'Italia

esporta prodotti di prima (semole, farine) e seconda trasformazione (pasta, prodotti da forno). Va rimarcato che, in previsione di una normativa europea che fissa dal luglio 2006 le soglie di riferimento (armonizzando i diversi limiti già fissati per il DON in Paesi quali Austria e Germania), anche i nostri produttori agricoli si troveranno a dover operare scelte tecniche mirate sin dalle semine 2005, per l'ottenimento di materie prime adeguate alle nuove esigenze. Le esperienze riportate offrono utili indicazioni in tal senso, per la gestione di una fitopatologia che trova tra le diverse opzioni di carattere agronomico e fitoiatrico gli strumenti utili al controllo e al contenimento dei livelli di micotossine riscontrabili nella granella. Di interesse pratico potrebbe essere il modello di previsione del rischio agronomico, che, se confermato anche dalle esperienze future, rappresenterà un utile strumento decisionale per produttori e ammassatori di cereali, in quanto permette di agire durante la coltivazione per il contenimento e la stima dei livelli di contaminazione da DON.

Il lavoro di questi anni ha permesso di evidenziare 3 elementi importanti che caratterizzano la filiera cerealicola italiana. Per prima cosa, i limiti proposti di DON possono essere facilmente rispettati attraverso una corretta gestione agronomica, che eviti i casi estremi, senza richiedere cambi drastici delle pratiche correnti. In secondo luogo, attraverso i monitoraggi effettuati possiamo affermare che la produzione italiana, sotto l'aspetto igienico-sanitario, è decisamente avvantaggiata rispetto a quella dei Paesi del Nord Europa. Infatti le osservazio-

LIMITI NON ANCORA ARMONIZZATI

## Situazione legislativa per le micotossine

La consapevolezza che alcune micotossine possono rappresentare un rischio reale per la salute umana e animale ha portato molti Paesi a emanare regolamenti o linee guida nazionali, che fissano i tenori massimi ammissibili di questi contaminanti naturali in varie matrici alimentari.

In Europa esistono già regolamenti e direttive comunitarie che stabiliscono sia i limiti di tolleranza per le aflatossine (AFB1, AF totali e AFM1), l'ocratossina A e la patulina in vari prodotti agroalimentari (regolamento Ce 1525/98; regolamento Ce 466/2001; regolamento Ce 472/2002; regolamento Ce 1425/2003; direttiva 2003/100/Ce; regolamento Ce 683/2004) che i metodi di prelievo di campioni per la loro analisi (direttiva 98/53/Ce; direttiva 2002/26/Ce; direttiva 2003/78/Ce, direttiva 2004/43/Ce). Inoltre, alcuni Stati membri dell'Unione Europea hanno fissato, in maniera autonoma, i limiti di tolleranza per alcune tossine da *Fusarium* (deossinivalenolo, zearalenone e fumonisine).

Tali limiti, per una stessa matrice, sono più restrittivi in alcuni Paesi rispetto ad altri, con il rischio di distorsione dei processi di competizione commerciale. Anche in vista di possibili disparità di questo tipo la Commissione europea sta provvedendo a definire una normativa comune allo scopo di armonizzarli, delineare una posizione comune a tutti gli Stati membri e assicurare un'unicità di mercato. Tale normativa, che è in fase di discussione e rettificcherà il regolamento Ce 466/2001, entrerà in vigore il 1° luglio 2006. I livelli massimi ammissibili su cui si sta orientando la Commissione per deossinivalenolo (DON), zearalenone (ZEA) e fumonisine (FB1+FB2) in varie derrate alimentari destinate al consumo umano sono riportati in tabella. Per la tossina T-2 e HT-2 i livelli massimi saranno fissati entro il 1° luglio 2007 poiché, nonostante sia ben nota la loro elevata tossicità, al momento i dati sulla loro presenza nei cereali e nei prodotti derivati sono ancora limitati.

### Valori massimi ammissibili in discussione per alcune micotossine prodotte da *Fusarium*

Prodotto (*)	Valori massimi (ppm)		
	DON	ZEA	FB1+FB2
Cereali non processati diversi da frumento duro, avena e mais	1,25		
Frumento duro e avena non processati	1,75		
Mais non processato	1,75 (*)	0,20 (*)	2,00 (*)
Farina di cereali, incluso farina di mais, semola, spezzati di mais e semola di mais	0,75		
Pane, biscotti, snacks a base di cereali e cereali per colazione	0,50		
Pasta (secca)	0,75		
Alimenti per l'infanzia a base di cereali (peso secco)	0,25	0,02	
Cereali non processati diversi dal mais		0,10	
Farina di cereali esclusa quella di mais		0,075	
Farina di mais, spezzati di mais, semola di mais, olio di mais-raffinato		0,20 (*)	
Pane, biscotti		0,05	
Snack a base di mais, cornflakes		0,05 (*)	
Snack a base di cereali e cereali per colazione		0,05	
Alimenti per l'infanzia a base di mais (peso secco)		0,02 (*)	0,15 (*)
Spezzati di mais, farina di mais, semola di mais			1,00 (*)
Alimenti a base di mais per il consumo umano diretto (con l'eccezione di spezzati di mais, farina di mais, semola di mais e di alimenti per l'infanzia a base di mais)			0,40 (*)

(\*) Il riso non è incluso nella voce «cereali»; prodotti a base di riso non sono inclusi nella voce «prodotti a base di cereali».  
 (†) Se nessun livello sarà fissato prima del 1° luglio 2007, il livello riportato sarà applicato a partire da quella data.

ni condotte sul territorio nazionale offrono un quadro generalmente rassicurante, in virtù di condizioni climatiche che in generale limitano la diffusione del patogeno. Va comunque sottolineato che solo con un continuo sforzo rivolto alla prevenzione della

malattia e all'aggiornamento dei mezzi tecnici disponibili (come la conoscenza e il miglioramento della tolleranza genetica dei frumenti coltivabili) si potranno mantenere le nostre produzioni sui livelli qualitativi attuali, che sono adeguati al contesto normativo

prossimo-futuro. In tal senso è utile ribadire che livelli di DON vicini o superiori alle soglie proposte sono stati osservati solo su una percentuale di campioni estremamente limitata.

Inoltre l'abbattimento dei livelli di micotossina che si osserva nelle farine e nelle semole durante le fasi di lavorazione (unito all'ulteriore riduzione che si verifica durante la cottura di uno dei prodotti tipici della nostra tradizione alimentare, la pasta) può tranquillizzare il consumatore finale sulla qualità degli alimenti a base di cereali, anche in relazione ai rischi connessi all'eventuale presenza di deossinivalenolo nella materia prima (ad esempio grano duro per la preparazione della pasta).

In conclusione, se i livelli di produzione in termini quantitativi rappresenteranno anche nel prossimo futuro uno degli obiettivi principali per i nostri produttori, altrettanto rilievo e attenzione dovranno essere attribuiti agli aspetti qualitativi del prodotto in senso lato, con particolare attenzione alla sicurezza alimentare, che rappresenterà un importante terreno di confronto tra i cerealicoltori dell'Unione Europea.

**Claudio Campagna**

*Syngenta Crop Protection*

Milano

*claudio.campagna@syngenta.com*

**Miriam Haidukowski**

**Michelangelo Pascale**

**Angelo Visconti**

*Istituto di scienze*

*delle produzioni alimentari*

*Ispa, CNR*

Bari

*miriam.haidukowski@ispa.cnr.it*

**Davide Pancaldi**

*Diproval*

*Università di Bologna*

*dpancal@agrsci.unibo.it*

**Stefano Ravaglia**

*SIS - Società italiana sementi*

Bologna

*s.ravaglia@sisomweb.com*

**Marco Silvestri**

*Barilla G. & R. Fratelli*

Parma

*m.silvestri@barilla.it*

Si ringraziano Claudio Cristiani del Consorzio agrario di Bologna e Modena (Bologna) e Fabio Pelliconi del Consorzio agrario di Ravenna (Ravenna) per il prezioso e insostituibile aiuto nell'allestimento delle prove sperimentali condotte in Emilia-Romagna.

La bibliografia verrà pubblicata negli estratti.