



UNIVERSITA' DI PISA

Facoltà di Agraria

Corso di Laurea Specialistica in Biotecnologie Vegetali e Microbiche

Tesi di Laurea

Ruolo del deossinivalenolo nella competizione per la paglia da parte di funghi filamentosi.

Relatore:
Chiar.mo Prof. Giovanni Vannacci

Candidato:
Fabiola Matarese

Correlatore:
Chiar.mo Prof. Paolo Emilio Tomei

ANNO ACCADEMICO 2005/2006

*Alla mia famiglia,
con infinita riconoscenza*

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Funghi tossigeni e micotossine	1
1.1.1 Aspetti generali	1
1.1.2 Funghi tossigeni	1
1.1.3 <i>Fusarium</i> spp. su frumento: diffusione della malattia ed importanza delle micotossine	3
1.1.4 Tricoteceni	6
1.1.5 Significato ecologico delle micotossine	10
1.2. Microfunghi su residui di piante	13
1.2.1 Habitat	13
1.2.2 Rapporti trofici	14
1.2.3 Strategie di sopravvivenza	16
1.3. Isolamento di funghi filamentosi dal suolo	18
2. SCOPO DEL LAVORO	23
3. MATERIALI E METODI	24
3.1 Substrati e materiali usati nell'allestimento della prova	24
3.2 Determinazione della componente micotica del terreno	25
3.3 Determinazione della quantità di micotossina da utilizzare e prove di sterilità della paglia	26
3.4 Valutazione dell'effetto del DON sulla colonizzazione della paglia da parte di funghi filamentosi	27
3.5 Prove per promuovere la sporulazione	29

3.6	Antagonismo e micoparassitismo “in vitro”	32
3.6.1	Colture duali	32
3.6.2	Produzione di coilings	34
3.6.3	Micoparassitismo dei macroconidi	36
4.	RISULTATI	38
4.1	Determinazione della componente micotica del terreno	38
4.2	Determinazione della quantità di micotossina da utilizzare e prove di sterilità della paglia	41
4.3	Valutazione dell’effetto del DON sulla colonizzazione della paglia da parte di funghi filamentosi	42
4.4	Antagonismo e micoparassitismo “in vitro”	51
4.4.1	Colture duali	51
4.4.2	Produzione di coilings	62
4.4.3	Micoparassitismo dei macroconidi	64
5.	DISCUSSIONE	70
6.	BIBLIOGRAFIA	77
7.	APPENDICE	

1. INTRODUZIONE

1.1. *Funghi tossigeni e micotossine*

1.1.1 **Aspetti generali**

I funghi sono noti produttori di una vasta gamma di metaboliti secondari, gran parte dei quali conosciuti in rapporto all'attitudine parassitaria di questi organismi. Tra questi composti, le micotossine sono divenute oggetto di studi approfonditi per i risvolti tossicologici conseguenti alla contaminazione di foraggi e derrate alimentari. Le micotossine fanno parte di un gruppo diversificato di composti prodotti da un ampio range di funghi, normalmente dopo una fase di crescita equilibrata. La produzione di una particolare micotossina è, comunque, generalmente confinata ad un numero relativamente esiguo di specie fungine e può essere specie o isolato specifica. I principali produttori di micotossine sono funghi parassiti delle piante e/o agenti di inquinamento delle derrate agrarie e per questo le tossine possono essere accumulate nelle piante infette e nelle derrate colonizzate dai funghi tossigeni in concentrazioni tali da indurre intossicazioni negli animali e nell'uomo, a seguito dell'utilizzazione di mangimi e alimenti contaminati.

1.1.2 **Funghi tossigeni**

I generi di funghi che per la loro più elevata tossicità e maggiore diffusione rivestono importanza micotossicologica sono *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Claviceps*. Vi sono poi diversi altri generi che comprendono ceppi di portata micotossicologica più limitata, sia perchè meno tossici, sia perchè presenti in aree

geografiche ristrette oppure ricorrenti in circostanze particolari o su colture poco diffuse, e sia, infine, perchè impiegati in biotecnologie alimentari particolari. Tra questi altri generi si possono enumerare: *Acremonium*, *Byssochlamys*, *Chaetomium*, *Dendrodochium*, *Diplodia*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Pithomyces*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Stachybotris*, *Trichoderma* e *Trichothecium* (Tab. 1.1) (Bottalico, 2002).

Tabella 1.1 Funghi tossigeni e micotossine	
Funghi tossigeni	Micotossine
<p>Aspergillus <i>A. flavus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. carbonarius</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. versicolor</i></p> <p>Penicillium <i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. citreonigrum</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. expansum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. islandicum</i> <i>P. ochrosalmoneum</i> <i>P. verrucosum</i> <i>P. viridicatum</i></p> <p>Fusarium <i>F. avenaceum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. poae</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. verticillioides</i></p> <p>Claviceps <i>C. purpurea</i></p> <p>Alternaria <i>A. alternata</i></p> <p>Stachybotrys <i>S. atra</i></p>	<p>Aflatossine. Acido ciclopiazonico. Verruculogeno. Fumitremorgine. Ocratossine. Acido penicillico. Ocratossine. Aflatossine. Sterigmatocistina.</p> <p>Acido penicillico. Penitrem. Viomelleina. Citreo viridina Citrinina. Patulina. Acido penicillico. Acido ciclopiazonico. Patulina. Roquefortina. Ciclocloritina. Luteoschirina. Citreo viridina. Ocratossine. Citrinina. Acido penicillico. Viomelleina. Xanthomegnina.</p> <p>Moniliformina. Fusarine. Deossinivalenolo. Zearalenone. Fusarine. Zearalenone. Fusarocromanone. Deossinivalenolo. Zearalenone. Nivalenolo. Fusarine. Tossina T-2. Diacetossiscirpenolo. Fusarine. Fumonisine. Moniliformina. Beauvericina. Fusaproliferina. Tossina T-2. Diacetossiscirpenolo. Moniliformina. Beauvericina. Fusaproliferina. Fumonisine. Fusarine.</p> <p>Alcaloidi tossici (Ergotamine, Clavine).</p> <p>Acido tenuazonico. Alternarioli.</p> <p>Satratossine. Verrucarine.</p>
<p>Altri generi di funghi tossigeni: <i>Chaetomium</i>, <i>Dendrodochium</i>, <i>Diplodia</i>, <i>Myrothecium</i>, <i>Phomopsis</i>, <i>Pithomyces</i>, <i>Rhizoctonia</i>, <i>Sclerotinia</i>, <i>Stachybotris</i>, <i>Trichoderma</i> e <i>Trichothecium</i>.</p>	

Solo una o poche specie dei generi di funghi ritenuti tossigeni sono produttori di micotossine e, inoltre, non tutti i ceppi di una stessa specie tossigena sono produttori di micotossine o, quanto meno, non con la stessa capacità. A tal riguardo si può dire, per esempio, che la capacità di formazione di ocratossina A risulta espressa dal 17% circa dei ceppi di *A. ochraceus* e dal 62% circa dei ceppi di *P. verrucosum*, lo zearalenone è prodotto dal 93% dei ceppi di *F. graminearum* e dal 63% di quelli di *F. culmorum* mentre una più elevata presenza del carattere di tossigenicità (100%) appare per altre micotossine prodotte da *F. graminearum* (deossinivalenolo), *F. verticillioides* (fumonisina) e *F. proliferatum* (fumonisina, fusaproliferina, beauvericina) (Bottalico, 2002).

Non vi sono indicazioni di tossigenicità riguardo ai lieviti, il che porta a escludere la produzione di micotossine nel corso dei numerosi processi fermentativi operati da tali funghi.

1.1.3 *Fusarium* spp. su frumento: diffusione della malattia ed importanza delle micotossine

Numerose specie fungine produttrici di micotossine sono comuni patogeni dei cereali e sono diffuse in aree geografiche sia a clima temperato sia a clima semi-tropicale e tropicale. Tra i cereali attaccati vi sono, quindi, sia quelli autunno-vernini, quali frumento duro e tenero, orzo, avena, segale e triticale, sia quelli primaverili-estivi quali mais, riso e sorgo. Inoltre, le malattie che si sviluppano su queste colture causano marciumi delle radici, dello stelo e delle spighe, con pesanti perdite di raccolto. Desta, comunque, ancor più preoccupazione la capacità di tali specie fungine di produrre micotossine nelle piante attaccate in pieno campo con conseguente accumulo delle stesse nei prodotti finali, sui

quali l'accumulo può proseguire durante l'immagazzinamento e durante le operazioni di trasformazione dei prodotti (Moretti *et al.*, 2002).

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, una sindrome che colpisce vari cereali causando disseccamenti parziali o totali della spiga con conseguenti ripercussioni sulla resa in granella. La fusariosi della spiga diffusa, in forma epidemica, in molte aree cerealicole del mondo (Europa, Asia, Sudafrica, Nordamerica e Australia), è stata segnalata in Italia fin dal 1900 ed è stata sempre più frequentemente segnalata nelle principali aree cerealicole italiane (Balmas *et al.*, 2000). Recentemente, ha fatto la sua comparsa in forma distruttiva anche in alcune aree cerealicole dell'Italia meridionale a causa di andamenti climatici primaverili eccezionalmente piovosi. La sintomatologia della fusariosi della spiga, evidente su spighe immature, consiste in disseccamenti che interessano parzialmente o totalmente la spiga, a seconda della gravità d'attacco. Andamenti climatici piovosi e/o caldo umidi, in coincidenza con le fasi fenologiche comprese tra spigatura e la maturazione latteo-cerosa, costituiscono le condizioni ideali per l'insorgenza e la diffusione della malattia. In tali condizioni, è possibile, talora, osservare la presenza di masserelle color arancio, costituite dalle fruttificazioni agamiche del fungo. L'attacco di fusariosi della spiga può determinare marcati decrementi produttivi in quanto la spiga colpita, giunta a maturazione, risulta vuota o con cariossidi striminzite. L'incidenza e la gravità della fusariosi della spiga sono correlate sia all'inoculo (sotto forma di conidi e/o propaguli presenti nel terreno o persistenti sui residui colturali infetti) 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). Le granaglie raccolte risultano inutilizzabili sia per l'impiego come sementi sia per l'alimentazione umana, qualora l'attività tossigena dei funghi abbia determinato la presenza, oltre certi limiti, di micotossine. A determinare la complessa eziologia della fusariosi della spiga sono prevalentemente specie appartenenti al genere *Fusarium*, che possono coesistere o avvicinarsi in rapida successione. Tra queste *F.graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*. Invece *Microdochium nivale*, invece, sebbene coinvolto in tale malattia in maniera spesso determinante, non è ritenuta una specie tossigena. Da spighe affette da fusariosi possono, comunque, essere isolati, sebbene con frequenza minore, anche *F. cerealis*, *F. chlamydosporum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. verticillioides* e *F. solani* (Balmas *et al.*, 2000).

Fra le principali micotossine prodotte dalle specie di *Fusarium* agenti causali della fusariosi della spiga, indubbiamente quelle appartenenti al gruppo dei tricoteceni, in particolare il deossinivalenolo (DON), destano maggiore preoccupazione, sia perchè si possono più facilmente ritrovare nelle cariossidi sia perchè sono dotate di una notevole tossicità. Oltre ai tricoteceni, gli zearalenoni (in particolare zearalenone) sono metaboliti prodotti da numerose specie di *Fusarium* e sono stati spesso individuati come contaminanti del frumento. In particolare, fra le specie che determinano la fusariosi della spiga, *F. graminearum* e *F. culmorum* sono noti produttori di deossinivalenolo e zearalenoni, mentre altri metaboliti tossici (acido fusarico, beauvericina, enniantine, moniliformina) possono anche essere prodotti dalle altre specie che maggiormente contribuiscono alla fusariosi della spiga di frumento, come *F. avenaceum* e *F. poae* (Moretti *et al.*, 2002).

La possibile presenza contemporanea di diverse specie di *Fusarium* sulle spighe suggerisce una valutazione attenta di quali siano di volta in volta, e fra le diverse aree considerate, le

principali specie infettanti. Tale obiettivo non è fine a sé stesso, ma è legato all'esigenza di raccogliere utili indicazioni sul rischio micotossicologico per il frumento contaminato. Infatti, ognuna delle principali specie costituenti il complesso della fusariosi della spiga ha un profilo tossicologico peculiare e sembra possedere anche specifiche esigenze di adattabilità alle condizioni ambientali per la loro crescita e la produzione di tossine. E' quindi evidente che, in funzione dell'area geografica e delle condizioni ambientali, sul frumento si potranno alternare specie di *Fusarium* differenti, rappresentanti un potenziale accumulo di micotossine diverso (Moretti *et al.*, 2002).

1.1.4 Tricoteceni

I tricoteceni sono una famiglia di sesquiterpenoidi strettamente correlati che possono essere classificati in base alla presenza o assenza di caratteristici gruppi funzionali (World Health Organization, 1990). La maggior parte di essi ha un doppio legame alla posizione C_{9,10}, un epossido al C_{12,13} che è responsabile della loro attività tossica e un numero variabile di gruppi idrossilici e acetilici (Fig. 1) (Sudakin, 2003).

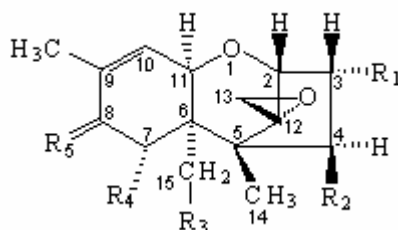
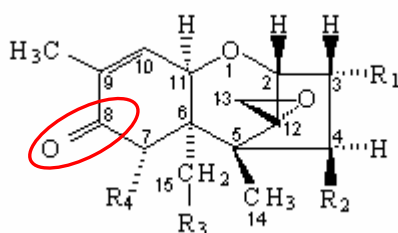


Figura 1.1 Struttura di base dei tricoteceni

I tricoteceni sono stati classificati in quattro gruppi A, B, C e D a seconda della loro struttura di base (Ueno 1977, 1983). Il tipo A (tossina T-2, HT-2, diacetossiscirpenolo) ed il Tipo B (deossinivalenolo, nivalenolo), ad esempio, sono distinti tramite la presenza o l'assenza di un gruppo carbonile alla posizione C₈.



	MW	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Deoxynivalenol (DON)	294	OH	H	OH	OH
3-Acetyl-DON	338	OAc	H	OH	OH
15-Acetyl-DON	338	OH	H	OAc	OH
Nivalenol	312	OH	OH	OH	OH
Fusarenon-X (4-Acetyl-nivalenol)	354	OH	OAc	OH	OH

Figura 1.2 Tricoteceni di tipo B

In generale, i tricoteceni sono resistenti alla degradazione dovuta a fattori ambientali inclusi la luce e la temperatura. Sono composti non volatili e possono essere disattivati solo in condizioni fortemente acide o basiche. La permanenza nell'ambiente e la stabilità molecolare dei tricoteceni può, comunque, essere condizionato dalla coesistenza di batteri e funghi che possono alterare la loro struttura chimica e/o detossificarli (Jesenska e Sajbidorova, 1991; Beeton e Bull, 1989; Shima *et al.*, 1997).

La biosintesi dei tricoteceni si allontana dal metabolismo generale degli isoprenoidi con la formazione del tricodiene attraverso la ciclizzazione del farnesil pirofosfato (Fig. 1.3). Il tricodiene subisce, poi, una serie di ossigenazioni, ciclizzazioni, isomerizzazioni ed esterificazioni prima di raggiungere una forma attiva come il DON e il DON-acetilato

(Desjardins *et al.*, 1993). Durante gli ultimi dieci anni, i geni codificanti gli enzimi che catalizzano la maggioranza di questi passaggi sono stati identificati e localizzati in un solo cluster genico (Hohn *et al.*, 1993; Keller e Hohn, 1997). Almeno otto geni formano il cluster genico biosintetico dei tricoteceni in *F. graminearum* e nella specie strettamente correlata *F. sporotrichioides* (Brown *et al.*, 2001). Questi geni includono tra gli altri TRI5, che codifica per la tricodiene sintasi (Hohn e Beremand, 1989) e TRI3 codificante per un acetilasi (McCormick *et al.*, 1996) con i quali sono stati creati mutanti tramite disattivazione genica, per studiare il ruolo dei tricoteceni nella virulenza di *Fusarium* (Proctor *et al.*, 2002).

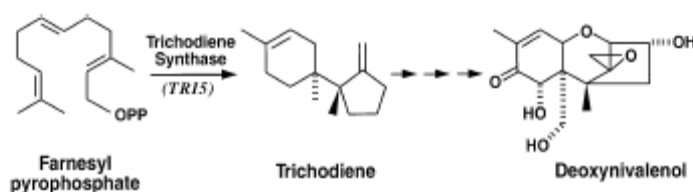


Figura 1.3 Schema della biosintesi del DON

Studi tossicodinamici hanno dimostrato che i tricoteceni sono principalmente inibitori della sintesi proteica nelle cellule eucariotiche. Essi legano la subunità ribosomiale 60S ed interferiscono con l'enzima peptidiltransferasi. Questa interazione conduce a vari gradi di inibizione della formazione dei legami nel peptide a seconda della struttura chimica dello specifico tricotecene (Cundliffe e Davies, 1977). L'eossido in posizione C_{12,13} è necessario per l'inibizione della sintesi proteica mentre altre sostituzioni della struttura ad anello al C₃ e C₄ producono effetti tossici aggiuntivi (Feinberg e McLaughlin, 1989) come l'inibizione della sintesi di DNA e RNA e le sindromi immunosoppressive, emetiche ed emorragiche (Beasley 1989; Rotter *et al.*, 1996). La sindrome emetica, ascrivibile al DON

e composti analoghi, è caratterizzata, nei suini, da vomito, rifiuto di alimento e riduzione del peso corporeo (Rotter *et al.*, 1996). Inoltre, la sua elevata immunotossicità porta ad uno stato progressivo di cattiva salute degli allevamenti con forti decurtazioni zootecniche (Bottalico, 2002).

Questo gruppo di micotossine è prodotto da vari generi di funghi: *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon* e *Trichothecium*. In alcune pubblicazioni è riportato che anche un certo numero di specie di *Trichoderma* sono produttrici di tricoteceni (Etzel, 2000; Novotny e Dixit, 2000), sebbene uno studio recente condotto su oltre 150 ceppi fungini di *Trichoderma* ha trovato che solo un isolato era capace di produrne livelli apprezzabili (Nielsen e Thran, 2001).

Dei numerosi tricoteceni prodotti da specie di *Fusarium* solo pochi sono stati trovati come contaminanti naturali dei prodotti cerealicoli. Tra i più importanti, per diffusione e tossicità, vi sono il deossinivalenolo (DON) e la tossina T-2. Il DON, noto anche come vomitossina, è prodotto principalmente da *F. graminearum* e *F. culmorum* (Bottalico e Perrone, 2002; Visconti *et al.*, 1986; Visconti, 2001). 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 11200 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 6358 campioni di frumento analizzati era contaminato da DON (FAO/WHO 2001; Schothorst e Van Egmond, 2004).

1.1.5 Significato ecologico delle micotossine

Funghi isolati da un'ampia varietà di risorse hanno mostrato che ceppi tossigeni e non tossigeni appartenenti alla stessa specie, così come altri microrganismi non collegati, coesistono e condividono un habitat comune. Attualmente si parla di “una rete di interazioni” legate da fattori biochimici sotto il controllo globale dell'ambiente (Bilgrami, 1987). E' possibile ignorare il ruolo degli altri organismi in tale situazione? Negli habitat altamente specializzati come il filloplano o il rizopiano, gli organismi produttori di micotossine devono competere con i degradatori delle tossine, i produttori di antibiotici ed una varietà di altri organismi con specifiche funzioni. Ci si potrebbe chiedere quindi se le tossine siano prodotte semplicemente per danneggiare gli altri organismi o se esse forniscano anche un “vantaggio per la sopravvivenza” dei produttori contro i predatori. Per quanto concerne la produzione di aflatossine da parte di *Aspergillus flavus* sono state suggerite interazioni inibitorie in presenza di altri microrganismi. Boller e Schroeder (1973, 1974) hanno osservato una spiccata inibizione nella produzione di aflatossine da *A. parasiticus* in presenza di *A. candidus* e *A. chevalier*, sebbene *A. parasiticus* cresca bene in presenza di entrambe le specie. Wicklow *et al.* (1980) invece, hanno condotto uno screening sull'attività antagonistica di 13 specie fungine contro la produzione di aflatossine sul mais ed hanno riportato una forte inibizione da parte di *A. niger* e *Trichoderma viride*. Alla luce dell'enorme energia metabolica spesa nella produzione delle micotossine, essa non può essere considerata come un mero “effluvio biochimico”. Per citare Ernst Mayr (1978), uno dei grandi principi della biologia evoluzionistica è che “*la natura non crede nello spreco*”. Se i metaboliti secondari nelle piante verdi forniscono una difesa contro gli erbivori, si potrebbe concludere facendo una estrapolazione semplicistica che le tossine proteggono i produttori dai loro consumatori. Ad esempio, le proprietà antibiotiche di

alcune micotossine probabilmente forniscono un vantaggio competitivo ai funghi che le producono in una specifica econicchia. E' anche possibile che esse favoriscano la sopravvivenza prevenendo l'ingestione da parte degli animali dei semi e degli altri materiali infetti (Krishna *et al.*, 1992).

Per quanto riguarda i tricoteceni, essi probabilmente giocano un ruolo nella patogenicità delle specie di *Fusarium* produttrici. L'aggressività è una componente della patogenicità che provoca danni in un ospite. Il ruolo dei tricoteceni è stato investigato in molte malattie causate da *Fusarium* (Desjardins e Hohn, 1997). La disattivazione genica di TRI5 ha prodotto mutanti di *Fusarium* non più capaci di produrre tricoteceni. Studi in campo condotti dall'USDA e dalla Purdue University hanno dimostrato che i nuovi ceppi di *F. graminearum* non produttori di tricoteceni erano meno virulenti sul frumento (Desjardins *et al.*, 1996). Analisi su mutanti simili non-produttori di *F. sambucinum* hanno indicato che la produzione di tricoteceni aumentava la virulenza del fungo su radici di pastinaca ma non influenzava la virulenza sui tuberi di patate (Desjardins *et al.*, 1992). Questi risultati hanno dimostrato che l'importanza della produzione dei tricoteceni come fattore di virulenza varia in base all'ospite. Perciò, sebbene la produzione di tricoteceni sia importante per la virulenza di *F. graminearum* sul frumento, non può essere assunto che i tricoteceni contribuiscano alla virulenza sul mais (Harris *et al.*, 1999).

Ci sono interazioni tra i ceppi tossigeni e non tossigeni in condizioni naturali? Il fatto che i due tipi di funghi coesistono nella stessa nicchia ambientale suggerisce la possibilità di interazioni regolari o almeno occasionali. La competizione tra i funghi fitopatogeni che infettano lo stesso organo dell'ospite può essere dovuta a tre fattori: sfruttamento competitivo, interferenza nella competizione (Wicklow, 1981) e interazioni parassitarie (Reid *et al.*, 1999). Il tipo e la concentrazione delle micotossine è stato considerato come

un fattore competitivo che può essere ecologicamente significativo (Cuero *et al.*, 1988; Ramakrishna *et al.*, 1996). Miedaner *et al.* (2004), in uno studio sulla competizione di isolati differenti di *Fusarium culmorum*, hanno dimostrato che né il tipo di micotossina prodotta né la concentrazione della micotossina portavano un vantaggio competitivo su mais colonizzato da un mix degli isolati. Inoltre, essi hanno trovato che nei mix di isolati si ritrovavano concentrazioni minori di micotossina rispetto a quelli attesi dall'inoculazione con un singolo isolato. Risultati simili sono stati ottenuti da Reid *et al.* (1999) quando hanno analizzato il contenuto di DON e fumonisina B₁ in mais inoculato con miscele di *F. graminearum* e *F. moniliforme*. Se la quantità di micotossina costituisse un forte vantaggio competitivo per gli isolati fungini ci si sarebbe aspettati il risultato opposto.

Ad oggi sono stati condotti pochi studi sui modi in cui i funghi che causano deterioramenti alimentari interagiscono con altri miceti nell'ecosistema dei magazzini di grano e sull'effetto che questa ha sulla produzione delle micotossine. E' stato mostrato che il dominio di certe specie cambia con il mutare delle condizioni, particolarmente con il cambiamento nel contenuto d'acqua (Aldred e Magan, 2004). Ad esempio, Magan *et al.* (2003) hanno studiato la competizione per le risorse e la sovrapposizione delle nicchie tra *Fusarium culmorum*, altre specie di *Fusarium* e specie contaminanti. In generale, i risultati hanno indicato che i funghi presenti tendevano ad occupare nicchie separate, in base all'utilizzazione delle risorse, e che la produzione di DON e NIV era significativamente inibita dalla presenza di alcuni altri funghi (Hope e Magan, 2003).

1.2. *Microfunghi su residui di piante*

1.2.1 Habitat

Il fattore più importante che influenza la distribuzione e lo stile di vita dei funghi è la loro nutrizione eterotrofa (Cooke e Rayner, 1984). L'accrescimento fungino è limitato agli ambienti nei quali adeguati rifornimenti di composti organici (primariamente polimeri organici) sono più o meno immediatamente disponibili. I funghi variano ampiamente nelle loro capacità di raggiungere ed utilizzare i composti del carbonio, i quali differiscono in locazione, disponibilità e configurazione. Come risultato, i microfunghi si accrescono su resti di piante in ogni habitat possibile, includendo anche le condizioni climatiche estreme che caratterizzano l'Artico e l'Antartico, il deserto e le foreste pluviali, come pure gli ambienti subtropicali e temperati. La natura e la quantità di nutrienti, unita alle caratteristiche fisiche del substrato, la disponibilità di acqua, l'umidità e la temperatura, determinano il successo della colonizzazione, la conseguente sopravvivenza degli individui e la composizione delle specie di una comunità.

Un gran numero di specie fungine colonizza i residui delle piante che, in termini più generali, possono essere definiti come frammenti non viventi di vegetali caratterizzati sulla base delle seguenti considerazioni:

1. Origine del materiale: radici, pneumatofori, steli, tronchi, cortecce, legno, rami, ramoscelli, piccioli, foglie, filloplano, lamina, venature, peli, brattee, fiori, frutti, semi;
2. Condizione del materiale: epoca e grado d'invecchiamento (caduto di recente o altro), frammentati meccanicamente o da agenti biologici, come insetti o

mammiferi, digeriti da insetti, decomposti da altri funghi; scavati, utilizzati secondariamente, grado di decomposizione; composizione chimica;

3. Posizione del materiale nell'habitat: superficiale, sepolto, immerso, giacente nella lettiera, coperto di rami, su o in altri organismi.

I microfunghi, a causa della loro dimensione ridotta, possono occupare piccoli siti. I tentativi di quantificare e definire i microhabitat all'interno di particolari ambienti sono pochi, sebbene questo dovrebbe essere un primo passo importante nel progettare un efficace programma di campionamento. Tutte le informazioni disponibili sono state generalmente raccolte come parti di studi su schemi di successione (es. per la colonizzazione di tessuti legnosi; Dix e Webster, 1995). Hawksworth e colleghi (1998) notarono l'importanza di questo argomento per il progetto di programmi di campionamenti in ecosistemi tropicali, sebbene l'elenco di nicchie prese in considerazione non fosse esaustivo e gli autori non le definissero in maniera specifica.

1.2.2 Rapporti trofici

Per i funghi sono state riconosciute tre strategie nutrizionali (saprotrofia, necrotrofia e biotrofia) che non sono necessariamente mutuamente esclusive (Cooke e Rayner, 1984). Singole specie possono, in circostanze differenti, manifestarle tutte e tre; inoltre i funghi cambiano frequentemente le loro strategie nutrizionali nel corso del ciclo vitale.

La saprotrofia, che è l'abitudine nutrizionale più frequente dei microfunghi che colonizzano i residui di piante, si verifica quando un fungo utilizza materiale organico non vivente proveniente da una pianta che lui non ha ucciso.

Nella necrotrofia, che spesso comporta processi simili alla saprotrofia, il fungo uccide i tessuti viventi di una pianta e poi li utilizza per nutrirsi. Per alcuni necrotrofi il completamento di un ciclo vitale pieno o ridotto dipende dal passaggio dalla strategia necrotrofa a quella saprotrofa; spesso questa transizione è graduale.

La biotrofia, in cui soltanto cellule di un ospite vivente vengono sfruttate come fonti di nutrimento, è molto meno comune tra i microfunghi che colonizzano i residui delle piante. Alcuni biotrofi, comunque, diventano successivamente necrotrofi e una piccola parte può mostrare anche uno stile di vita saprofitario. Il momento e il grado di crescita in cui avviene la transizione è importante nel contesto della colonizzazione dei resti di pianta.

Poiché i processi per i quali il materiale delle piante morte viene alterato e restituito all'ambiente sono numerosi e vari, è inevitabile che nicchie e strategie trofiche dei microfunghi coincidano. Ad esempio, le foglie lesionate sono considerate un habitat per tutte e tre le tipologie perché i tessuti dell'ospite morto o morente a causa dell'azione di un necrotrofo o biotrofo sono quasi sempre colonizzati da saprotrofi secondari.

Una grande quantità di specie fungine endofite diventa saprotrofa alla morte del loro ospite, una strategia vantaggiosa perché la loro intima associazione con la pianta permette l'utilizzo immediato del tessuto morto. Inoltre, molte specie endofite entrano in una fase necrotrofa quando il tessuto dell'ospite diventa moribondo, permettendo anche una precoce colonizzazione ed utilizzo delle risorse energetiche. Le metamorfosi nutrizionali non sono state studiate in modo adeguato, sebbene osservazioni come quelle di Bills e Pelaez (1996) che integrano informazioni da endofiti e saprofiti, stanno cominciando a rivelare quelli che sono sistemi ecologici frequentemente molto complessi.

Sono necessari anni prima che i resti delle piante si decompongano completamente ed i loro residui vengano incorporati nel terreno, sebbene negli ecosistemi tropicali umidi il

processo possa essere molto più rapido (Anderson e Swift, 1983). I microfunghi che producono spore si possono osservare in modo diretto anche su resti di piante molto decomposti (spesso dopo l'incubazione in camere umide) il che significa che corpi fruttiferi, spore e micelio possano essere rimossi e isolati se necessario. Sebbene quest'ultima tecnica possa sostanzialmente sottostimare le specie presenti nei residui delle piante paragonata a metodi di coltura come il lavaggio delle particelle, problemi di identificazione a causa di colture non sporulanti vengono ampiamente evitati.

1.2.3 Strategie di sopravvivenza

Il concetto di strategia di sopravvivenza nei funghi è stato principalmente tratto dal lavoro di Grime (1977, 1979). Portata per la prima volta all'attenzione dei micologi da Pugh (1980), fu successivamente accettata, modificata ed estesa da Cooke e Rayner (1984) e Andrews (1992) e riassunta da Dix e Webster (1995). Pugh e Boddy (1988) hanno evidenziato che le tipologie trofiche e nutrizionali che possono cambiare nelle diverse fasi di crescita, non dovrebbero essere utilizzate per classificare i funghi. Piuttosto esse dovrebbero essere utilizzate per definire comportamenti mostrati durante particolari fasi del ciclo vitale fungino, poiché il comportamento dei miceti può cambiare a seconda dei diversi stadi di crescita. Le tre principali strategie di vita sono:

- **Ruderali:** appartengono a questa categoria funghi attivi solo in habitat caratterizzati da un basso livello di competizione combattiva o di stress. Sono predominanti laddove le fonti di carbonio sono facilmente disponibili o immediatamente assimilabili e dove, almeno inizialmente, esiste una scarsa microflora competitiva. Sono caratterizzati da una natura effimera, causata

principalmente da due fattori: la mancanza di un'ampia dotazione enzimatica e la mancanza di abilità combattiva. Non sono produttori di metaboliti secondari extracellulari ad attività antifungina e non risultano essere tolleranti nei confronti dei metaboliti rilasciati da altri funghi. La loro abilità competitiva è essenzialmente legata alla capacità di sfruttare le risorse disponibili come colonizzatori primari, probabilmente attraverso una rapida germinazione delle spore o un rapido accrescimento del micelio. Molti *Mucorales*, ad esempio, sono ruderali e abbondanti nel terreno. I funghi ruderali sembrano essere particolarmente sensibili a fattori di transizione come lo stress idrico (Pasricha *et al.*, 1994) e giocano un ruolo insignificante nella decomposizione della lettiera (Webster, 1957).

- **Competitivi:** una situazione con pochi stress e con limitate disponibilità nutritive non sfruttate rappresenta la condizione ideale per incrementare la presenza di funghi combattivi o “C-selected”. La strategia combattiva è sufficiente sia per difendere le risorse guadagnate durante la cattura effettuata come colonizzatori primari, sia per agire come colonizzatori secondari per la cattura di risorse già occupate da altri individui. I funghi competitivi sono persistenti e di lunga vita, hanno una rapida o lenta crescita e germinazione delle spore, mostrano una riproduzione lenta o intermittente ed hanno buona capacità di produrre metaboliti secondari ad attività enzimatica o antifungina.
- **Stress-tolleranti:** le specie “S-selected” si sviluppano in habitat in cui, generalmente, condizioni di stress ambientali o impoverimento delle risorse esercitano una forte pressione selettiva nei confronti delle comunità fungine. La maggior parte dei funghi conosciuti come stress-tolleranti, possono essere raggruppati in nicchie ecologiche che contengono individui adattati ad un

particolare tipo di stress. Con alcune eccezioni, lo sviluppo vegetativo della maggior parte degli “stress-tolleranti” è lenta e spesso limitata in estensione. I funghi “S-selected” saranno di successo in situazioni dove nutrienti organici assimilabili sono liberamente disponibili ma dove altri fattori ambientali sono contrari allo sviluppo fungino.

1.3. Isolamento di funghi filamentosi dal suolo

Le tecniche d’isolamento più comuni prevedono la separazione dei propaguli fungini dal suolo e dagli altri propaguli e l’avvio della crescita su un mezzo di isolamento (Tuite, 1969; Booth, 1971). I propaguli vengono disgregati fisicamente e separati prima dell’applicazione sul mezzo dove devono essere adeguatamente dispersi. Sui mezzi agarizzati, le proprietà fisiche, chimiche e nutrizionali sono utilizzate per limitare l’espansione e l’interazione delle colonie.

Alcuni mezzi usati negli studi del micobiota del suolo sono considerati “non selettivi” (es. Czapek agar, Malt agar o Potato Dextrose Agar). In realtà questi mezzi sono altamente selettivi; ad esempio, i mezzi con un alto contenuto di zuccheri possono creare le condizioni favorevoli per il recupero di specie con una rapida germinazione ed una crescita radiale vigorosa e veloce. Idealmente andrebbe utilizzato un mezzo realmente non selettivo o una serie standard di mezzi selettivi che permettono un’uguale crescita di tutte le specie attive sul substrato. Uno studio completo del micobiota richiede substrati e procedure d’isolamento che recuperino una ampia gamma di funghi; inoltre, sono necessarie una serie di condizioni d’isolamento per rivelare l’intero spettro dei funghi presenti, nella misura in cui essi siano tutti capaci di crescere in cultura artificiale. In alcuni casi possono essere

necessari mezzi nutrizionalmente ricchi per supportare i funghi a crescita lenta. Per prevenire il dilagare dei funghi a rapida crescita, le specie interferenti devono essere eliminate o contrastate con mezzi fisici o chimici sebbene, tali metodi distruttivi non devono essere letali per le specie a crescita lenta (Bills *et al.*, 2004). Tra le strategie impiegate per il recupero dei funghi dal suolo possiamo ricordare l'utilizzo di esche (Tuite, 1969; Singleton *et al.*, 1992). La tecnica del "baiting" consiste nel posizionare un substrato organico nutrizionalmente arricchito a contatto o mischiato con il terreno ipoteticamente contenente alcuni organismi bersaglio, nella speranza che colonizzino e si riproducano sul substrato. Il posizionamento di esche selettive nel suolo può essere usata per alcuni funghi zoosporici, per funghi patogeni delle radici, per i funghi associati al legno e per i funghi associati agli animali.

Di notevole importanza per l'isolamento dei funghi sono le condizioni ambientali quali temperatura e luce. La temperatura d'incubazione condiziona la crescita e per questo può influenzare il tipo di funghi che si sviluppano sulle piastre d'isolamento. I protocolli d'isolamento spesso prevedono l'incubazione a temperatura ambiente o a 25°C in cui la maggior parte delle colonie si sviluppa entro 2-10 giorni. L'incubazione a temperature più fredde (minori della temperatura ambientale) riduce il tasso di espansione della colonia delle specie mesofile, lasciando così più tempo per la separazione delle specie (Petrini *et al.*, 1990). Allo stesso modo, i funghi con temperature ottimali più basse, come gli ifomiceti acquatici e terrestri (Bandoni, 1981) e i funghi psicrofili (Carreiro e Koske, 1992; Petrini *et al.*, 1992b), possono crescere velocemente solo a basse temperature. Al contrario, l'incubazione ad alte temperature (>40°C) può far emergere i funghi termotolleranti e termofili.

L'effetto della luce sull'isolamento dei funghi del suolo gioca un ruolo importante poiché può influire significativamente sulla crescita e sulla sporulazione dei funghi e su caratteri morfologici come la pigmentazione, la morfologia della colonia e delle spore (Plant Pathologist' pocket book, 1968).

Un problema frustrante nell'isolamento dei funghi è rappresentato dagli isolati sterili (non sporulanti). L'induzione alla produzione di fruttificazioni (gamiche o agamiche) può richiedere lunghe prove condotte utilizzando differenti mezzi e condizioni ambientali. Il tempo è una variabile importante ed un'incubazione prolungata per settimane o mesi può essere necessaria. Molti isolati possono, alla fine, essere indotti a sporulare sebbene tali sforzi sono probabilmente impraticabili in studi su larga scala dei funghi del suolo. Gli isolati non-sporulanti possono, comunque, essere raggruppati sulla base delle caratteristiche vegetative mostrate e dei caratteri fisiologici, una pratica standard in batteriologia e nella sistematica dei lieviti (Mueller *et al.*, 2004).

La determinazione della diversità delle specie fungine in un ecosistema è stata complicata dall'incapacità di mettere in coltura molti funghi, dalla natura effimera della produzione delle strutture di riproduzione e dalla variabilità intraspecifica nella morfologia e nella biochimica (Barret, 1987). Negli ultimi anni, sono state sviluppate tecniche molecolari basate sull'impiego e lo studio del DNA nucleare e/o mitocondriale per stimare la diversità e le caratteristiche genetiche. Queste tecniche hanno incrementato la definizione genetica consentendo così un'identificazione tassonomica inequivocabile e una giusta collocazione filogenetica dei funghi. Lo sviluppo della Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis e Faloona, 1987) ha permesso una vasta analisi genetica di campioni anche molto piccoli, diminuendo la necessità di campionamenti distruttivi o la coltura degli organismi.

Recentemente, nello studio dell'ecologia fungina del suolo, è stato largamente applicata la tecnica dell'estrazione diretta degli acidi nucleici che, affiancata all'uso della PCR ha permesso di compiere progressi significativi nella comprensione della diversità genetica delle comunità fungine del suolo (Anderson e Cairney, 2004). Una delle maggiori limitazioni nello studio della diversità fungina del suolo, in cui il pool di DNA estratto proviene da un range diversificato di organismi procarioti ed eucarioti, è stata la scarsa adeguatezza dei primers a disposizione per la PCR. La sfida è stata quella di disegnare primers in grado di amplificare il più ampio spettro tassonomico possibile di funghi, ma allo stesso tempo capaci di evitare l'amplificazione contemporanea di DNA eucariotico estraneo strettamente correlato. Il principale bersaglio per lo sviluppo di primers per lo studio della diversità fungina nel suolo è stato il cluster genico dell'rRNA, e in particolare, il gene 18S (White *et al.*, 1990; Smit *et al.*, 1999; Borneman e Hartin, 2000; Vainio e Hantula, 2000). A tale scopo è stata molto utilizzata anche la regione dello spaziatore interno trascritto (ITS) localizzato tra i geni rRNA 18S e 28S e che comprende il gene 5,8S (White *et al.*, 1990; Gardes e Bruns, 1993; Larena *et al.*, 1999). Queste regioni beneficiano di un'alta velocità evolutiva che corrisponde ad una maggiore variabilità di sequenze tra le specie più strettamente correlate rispetto alle regioni codificanti più conservate all'interno dello stesso cluster.

Tra le più moderne tecniche di studio delle comunità fungine, applicabile soprattutto alla valutazione degli individui non coltureabili, la DGGE/TGGE costituisce un metodo rapido particolarmente quando l'obiettivo è investigare gli avvicendamenti o i cambiamenti nella composizione della comunità (van Elsas *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2003a). La tecnica trae beneficio dall'abilità di analizzare e comparare numerosi campioni su un singolo gel, consentendo così un confronto simultaneo tra i campioni. Lo sviluppo di software specifici

ha notevolmente incrementato il modo in cui i fingerprints delle comunità possono essere analizzati tramite il raffronto sia della posizione che dell'intensità relativa delle bande differenti sul gel, rendendo possibile un'analisi statistica dei dati e la conseguente interpretazione dell'incidenza ecologica (Fromin *et al.*, 2002). Uno dei vantaggi principali delle tecniche di fingerprinting delle comunità basate sui gel è la possibilità di tagliare e sequenziare le bande d'interesse, ottenendo così informazioni tassonomiche per i membri della comunità tramite ricerca in database e/o analisi filogenetiche. In più, queste tecniche possono essere usate insieme a sonde oligonucleotidiche di DNA per aumentare la specificità delle analisi (Stephen *et al.*, 1998).

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo principale del presente lavoro è stato quello di stabilire se la presenza di DON potesse svolgere un ruolo nella competizione per la paglia tra funghi filamentosi di origine tellurica. Poiché è noto in letteratura che una delle possibili strategie di contenimento della produzione e accumulo di micotossine sul frumento prevede l'impiego di microrganismi antagonisti di *Fusarium* spp., un secondo obiettivo del lavoro è stato quello di valutare se alcuni isolati identificati come appartenenti al genere *Pythium*, (all'interno del quale, ceppi che differenziano oogoni spinosi sono stati descritti come antagonisti e micoparassiti di diverse specie di *Fusarium* fitopatogene) e l'unico isolato di *Trichoderma*, ottenuti nel corso delle prove mostravano capacità antagonistiche e micoparassitarie nei confronti di vari ceppi di *Fusarium* anch'essi isolati dagli stessi terreni di provenienza dei presunti antagonisti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Substrati e materiali usati nell'allestimento della prova*

Per la prova sono stati usati, come substrati, mezzi agarizzati quali:

Agar Acqua (WA) preparato aggiungendo $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ di Agar (Difco) in acqua distillata e sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 121°C .

Agar Acqua + Streptomicina (50 ppm) + Bacitracina ($7500 \text{ ui}\cdot\text{L}^{-1}$) (WA+S+B): i due antibiotici sono stati uniti al mezzo già sterilizzato quando questo ultimo aveva raggiunto una temperatura di circa 50°C .

Nutrient Agar (NA, $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) + Cicloeximmide ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (NA+C)

Potato Dextrose Agar (PDA, Difco $39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Potato Carrot Agar (PCA) preparato facendo bollire per 15 minuti, in 1 L d'acqua di rubinetto, 40 g di carote frullate e 40 g di patate pelate e tagliate in piccoli pezzi. 500 mL dell'estratto così ottenuto sono stati uniti a 500 mL di acqua distillata. Successivamente sono stati aggiunti $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ di Agar (Difco) e sterilizzato per 20 minuti a 121°C .

Malt Agar (MA, $21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Il terreno naturale utilizzato, gentilmente fornito dal Centro Interdipartimentale E. Avanzi, proviene da tre diversi campi coltivati negli anni precedenti a cereali. I tre tipi di terreno differiscono tra loro per la struttura: TENDENTE ARGILLOSA, TENDENTE SABBIOSA e MISTA. I terreni sono stati conservati in tre vasche di plastica, precedentemente lavate e disinfettate con alcool, e sgretolati con le mani per eliminare i grumi più grossi. Il terreno così allestito è stato rimescolato ogni giorno e lasciato ad

asciugare, a T° ambiente, per una settimana. Prima dell'utilizzo, i tre terreni sono stati passati in un setaccio con rete di 2 mm per eliminare i grumi e il materiale più grossolano. La prova è stata allestita preparando 6 vaschette di alluminio in cui sono stati posizionati 150 grammi di ciascun terreno a cui è stata aggiunta acqua sterile in quantità diversa a seconda del tipo di terreno (come di seguito dettagliatamente descritto).

La paglia di frumento, utilizzata come esca, anch'essa fornita dal Centro Avanzi, è stata tagliata in piccoli pezzi di forma quadrata con lato di circa 3 mm di lunghezza.

La micotossina deossinivalenolo (DON) è stata acquistata dalla Sigma e disciolta in 5 mL di una soluzione di metanolo e acqua in proporzione 85:15 alla concentrazione finale di 1 mg·mL⁻¹.

3.2 Determinazione della componente micotica del terreno

Al fine di determinare la composizione del micobiota presente nei tre tipi di terreno è stata condotta la seguente prova. Da ognuna delle sei vaschette contenenti il terreno inumidito ne è stato prelevato 1 g e posto in una falcon sterile da 50 mL. Ai 6 g totali di terreno contenuti nella falcon sono stati aggiunti 40 mL di acqua sterile per creare una sospensione del terreno. A partire da questa sospensione sono state fatte varie diluizioni seriali 1:10 fino alla 10⁻⁷.

100 µL di ciascuna diluizione (tq, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷) sono stati posti in piastre contenenti WA addizionato con Streptomicina e Bacitracina e distribuiti con una spatola (3 repliche per ogni diluizione). Le piastre sono state posizionate nel fototermostato

a 24° C con fotoperiodo luce/buio 12h/12h. Questo procedimento è stato ripetuto per ogni tipo di terreno.

Le piastre inoculate sono state controllate ogni giorno. Quando sono comparse le prime colonie, queste sono state isolate, dove possibile, prelevando un tassello del mezzo di crescita e trasferendolo in capsule Petri (6 cm di diametro) contenenti PDA.

Le piastre sono state incubate nel fototermostato a 24° C. Le colonie fungine sono state identificate tramite indagine microscopica.

3.3 Determinazione della quantità di micotossina da utilizzare e prove di sterilità della paglia

Per determinare la concentrazione di micotossina da utilizzare nella soluzione d'imbibizione dei pezzi di paglia è stata condotta una prova empirica volta a stimare la quantità di liquido ipoteticamente trattenuta dalla paglia.

In ciascuna di quattro eppendorf sono stati posizionati 25 pezzi di paglia e per ognuna è stato calcolato il peso netto della paglia. In ognuna sono stati poi aggiunti 500 µL di una soluzione di metanolo e acqua (85:15). La paglia è stata lasciata imbibire per 24 ore nel fototermostato a 24°C, quindi i pezzi di paglia di ciascuna replica sono stati pesati su vaschette di plastica ricoperte di carta alluminio. Per calcolare quanta micotossina era trattenuta dalla paglia, è stata calcolata la variazione di peso dopo l'imbibizione e, trascurando il peso specifico, è stata convertita in quantità di liquido trattenuto (g=mL). I risultati ottenuti da ciascuna delle quattro repliche sono stati mediati e tramite opportuna proporzione è stata calcolata quanta micotossina (espressa in µg) era presente in tale

quantità di liquido. Il valore ottenuto è stato rapportato al peso iniziale della paglia per risalire alla concentrazione (ppm) del DON rimasta nelle esche da interrare.

La stessa prova è servita anche per decidere se sottoporre la paglia a sterilizzazione prima dell'imbibizione nella soluzione contenente la micotossina. A tale scopo è stato compiuto un test preliminare simulante la prova successiva, lasciando asciugare i pezzi di paglia sotto cappa per 24 ore e trasferendoli, poi, su piastre contenenti WA+S+B e NA+C. Nei giorni seguenti è stata controllata l'eventuale comparsa di colonie fungine o batteriche, rispettivamente nei due terreni, sulle piastre inoculate con la paglia.

3.4 Valutazione dell'effetto del DON sulla colonizzazione della paglia da parte di funghi filamentosi

L'allestimento della prova è stato ripetuto per ciascun tipo di terreno in tre giorni differenti (Fig. 3.1).

In 6 eppendorf da 1 mL sono stati posti 70 pezzi di paglia. Di queste, 3 sono state utilizzate per realizzare la tesi di controllo e perciò riempite con 1 mL di una soluzione di Metanolo e acqua sterile (85:15); nelle altre 3, invece, sono stati messi 975 μL di MetOH/H₂O nella stessa proporzione e 25 μL di Deossivalenolo (DON, soluzione stock 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) per ottenere una soluzione contenente la micotossina in concentrazione finale di 25 ppm.

Le eppendorf sono state posizionate nel fototermostato a 24° C per 24 ore per permettere l'imbibizione della paglia. Trascorso tale periodo, i pezzi di paglia imbibiti sono stati prelevati sterilmente e posizionati in capsule Petri contenenti dischi di alluminio sterile al fine di consentire l'asciugatura sotto flusso di cappa. Dopo 24 ore, la paglia ormai asciutta è stata interrata nelle vaschette contenenti 150 g di terreno inumidito con 25 mL di H₂O

sterile per il terreno misto, 27 mL per il terreno argilloso e 22 mL per il terreno sabbioso (3 vaschette per il controllo e 3 per la tesi con la micotossina). Il terreno contenente la paglia è stato mescolato con un cucchiaino sterile e quindi trasferito in un bicchiere di plastica da 200 mL contrassegnato con una sigla diversa a seconda della tesi e della replica (CTRL 1, CTRL 2, CTRL 3, DON 1, DON 2, DON 3). I 6 bicchieri sono stati ricoperti con mezza piastra per evitare l'eventuale perdita di acqua dovuta all'evaporazione, posizionati su un bancone e lasciati ad incubare per 7 giorni a T° ambiente.

Dopo una settimana, il terreno è stato trasferito, da ogni bicchiere, in un setaccio d'acciaio con rete da 2 mm per consentire un più facile recupero dei pezzi di paglia*. Da ogni replica sono stati recuperati, a caso, 60 pezzi di paglia che sono poi stati messi in un colino e sciacquati sotto acqua corrente fino alla completa eliminazione del terreno dalla loro superficie. Una volta sciacquata, la paglia è stata trasferita in sacchetti di garza sterile e sterilizzata per 10 secondi in una soluzione di Ipoclorito di Sodio all'1% di Cl attivo + Etanolo 50%. Dopo la sterilizzazione sono stati eseguiti 3 risciacqui di 1 minuto ciascuno in acqua sterile; i pezzi di paglia sterilizzati sono stati poggiati su carta da filtro per eliminare l'acqua in eccesso.

In seguito, i 60 pezzi di paglia recuperati da ogni replica sono stati trasferiti su piastre contenenti due mezzi selettivi:

1. 30 pezzi su **Agar-Acqua + Streptomicina** (50 ppm 0,05 g·L⁻¹) + **Bacitracina** (7500 ui/L) → mezzo selettivo per funghi
2. 30 pezzi su **Nutrient Agar + Cicloeximide** (100 µg·L⁻¹) → mezzo selettivo per batteri

* Il setaccio è stato lavato e sterilizzato prima di ogni operazione.

Ogni pezzo è stato contrassegnato con un numero da 1 a 30 per poter risalire all'origine di ciascuna colonia.

Tutte le piastre sono state incubate a 24°C per favorire lo sviluppo delle colonie fungine e batteriche. Il giorno seguente le piastre di NA+C su cui si erano sviluppati i batteri sono state esaminate ed è stata fatta una valutazione dei pezzi colonizzati o meno da batteri o da attinomiceti. Le piastre di WA+S+B sono state esaminate ogni giorno per circa una settimana per controllare se da ogni pezzo si fosse sviluppata una o più colonie diverse: ciascuna colonia è stata immediatamente isolata e trasferita su piastre di PDA da 6 cm di diametro. Ogni colonia sviluppatasi a partire dallo stesso pezzo è stata contrassegnata con il numero del pezzo di paglia da cui si era originata e con una lettera differente (es. 1a, 1b). Non appena le colonie si erano sufficientemente sviluppate, è stata fatta una distinzione tra le colonie che presentavano strutture di riproduzione o micelio sterile. Le prime sono state sottoposte ad indagine microscopica al fine di identificarne almeno il genere di appartenenza mentre con i miceli sterili sono state eseguite prove successive per stimolare la differenziazione di strutture riproduttive necessarie per procedere all'identificazione.

3.5 Prove per promuovere la sporulazione

Per promuovere la sporulazione, gli isolati non sporulanti sono stati trasferiti su alcuni mezzi noti per la loro capacità di stimolare la differenziazione di strutture riproduttive.

Inizialmente tutti i miceli sterili sono stati trasferiti su piastre Petri contenenti Malt Agar. Dopo un giorno dall'inoculo sono stati posizionati sulla superficie della piastra alcuni semi di orzo (sterilizzati 2 volte in autoclave per 40 minuti a 121°). Le piastre sono state fatte incubare a 24° C per circa un mese. In seguito gli isolati che non avevano sporulato sono

stati trasferiti in camera fredda a 4° C al buio per circa una settimana e poi di nuovo a 24° alla luce per diverse settimane.

Gli isolati risultanti ancora sterili al termine di questa prova sono stati trasferiti su piastre contenenti PCA (Potato Carrot Agar) e diversi substrati organici sterilizzati 2 volte in autoclave per 40 minuti a 121° C (piselli secchi, pezzi di paglia uguali a quelli utilizzati nella prima prova, semi di grano, semi di orzo e pezzi di circa 2 cm di lunghezza di graminacee selvatiche). Le piastre sono state esposte a condizioni ambientali “esterne” di tipo estivo (mese di giugno con fotoperiodo breve e temperature medie giornaliere più elevate rispetto alle temperature medie notturne) per circa un mese.

Laddove, in seguito alle due prove, non è stato possibile indurre la sporulazione dei miceli sterili, questi sono stati dereplicati al fine di suddividerli in gruppi e sottogruppi in funzione dell'aspetto della colonia e della colorazione del substrato di crescita.

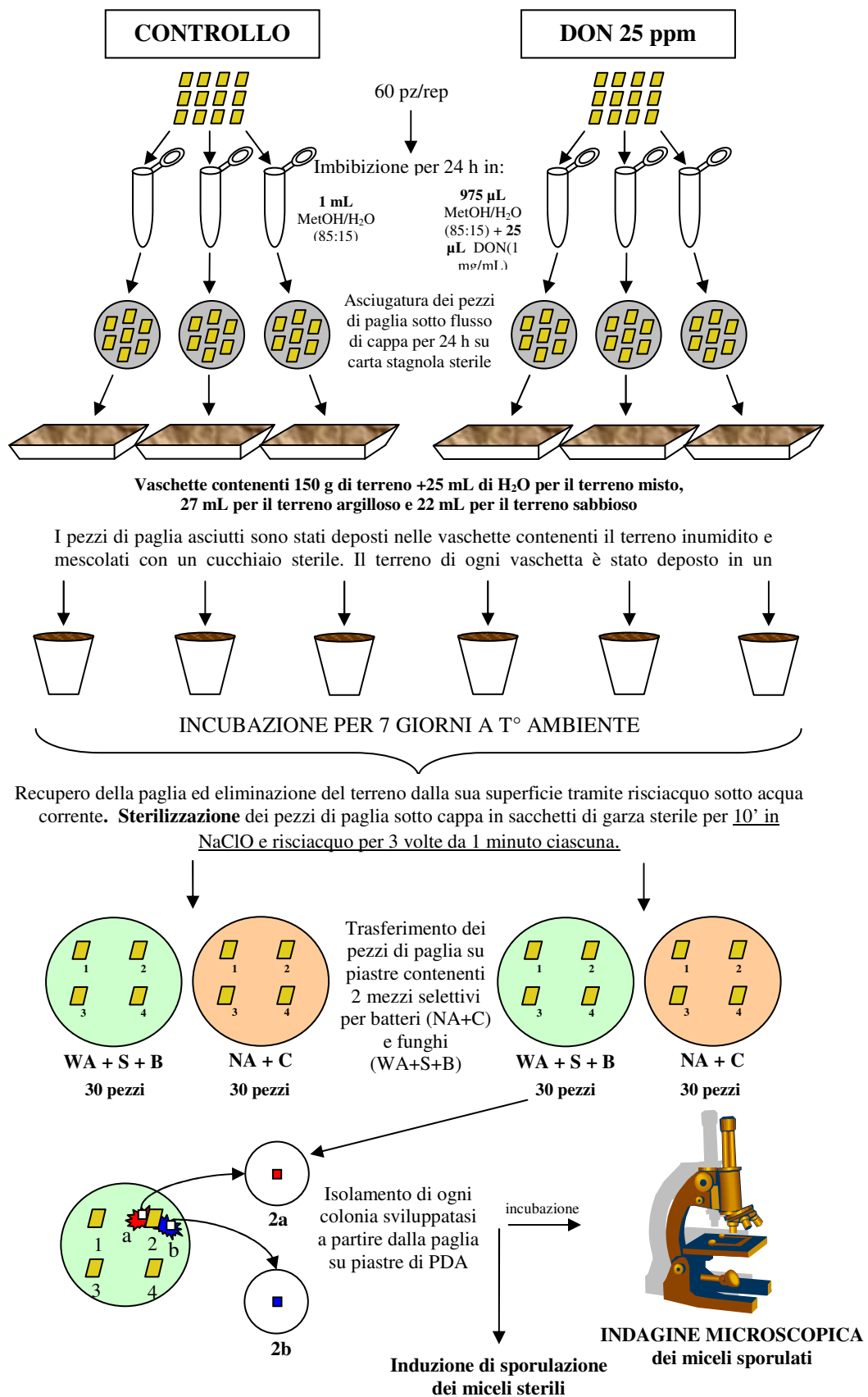


Figura 3.1 Schema di allestimento della prova.

3.6 Antagonismo e micoparassitismo “in vitro”

3.6.1 Colture duali

Alcuni isolati di *Pythium* sp. identificati nel corso della prova precedente (vedi § 2.4) sono stati sottoposti ad un test preliminare “in vitro” al fine di saggiarne la capacità antagonistica nei confronti di isolati appartenenti al genere *Fusarium* sp., mediante l’allestimento di colture duali su substrato PDA e WA, sulla base del lavoro di Gambogi e Durante (1985). Per la scelta delle combinazioni abbiamo usato come criterio la provenienza degli isolati rispettivamente o dalla stessa piastra di isolamento iniziale, o dallo stesso pezzo di paglia o dalla stessa replica o dalla stessa tesi o, infine, dallo stesso terreno. Nella tabella riportata di seguito sono elencati gli isolati utilizzati nella prova.

<i>Fusarium</i> sp.		<i>Pythium</i> sp.
Sigla isolato	Identificazione	Sigla isolato
SABBIOSO D3 19b	<i>F. graminearum</i>	SABBIOSO D3 21a
SABBIOSO C2 21a	<i>F. culmorum</i>	SABBIOSO C2 1a
SABBIOSO C3 8b	<i>F. sez. Liseola</i>	SABBIOSO C3 8a
SABBIOSO C1 20b	<i>F. culmorum</i>	SABBIOSO C1 14a
SABBIOSO D2 7a	<i>F. culmorum</i>	SABBIOSO D2 17b
MISTO D2 24a	<i>F. sez. Liseola</i>	MISTO D2 24a
MISTO C1 28a	<i>F. equiseti</i>	MISTO C1 22a
MISTO D3 23a	<i>F. graminearum</i>	MISTO D3 9a
MISTO D1 15b	<i>F. sez. Liseola</i>	MISTO D1 15a
MISTO C2 25a	<i>F. culmorum</i>	MISTO C2 29a (non differenziante oogoni spinosi)
MISTO C3 22a	<i>F. sez. Liseola</i>	MISTO C3 1b
ARGILLOSO D3 6a	<i>F. equiseti</i>	ARGILLOSO D3 8a
ARGILLOSO D1 7a	<i>F. equiseti</i>	ARGILLOSO D1 3b
ARGILLOSO D2 30b	<i>F. equiseti</i>	ARGILLOSO D3 25a
		ARGILLOSO D1 6b
		ARGILLOSO D2 23b

Tabella 3.1 Elenco degli isolati utilizzati per la prova di antagonismo “in vitro” e micoparassitismo. Ogni combinazione è contrassegnata con lo stesso colore.

Anche l'unico isolato di *Trichoderma* ottenuto dalla prova di valutazione dell'effetto del DON, è stato sottoposto agli stessi test di antagonismo e micoparassitismo, dove è stato accoppiato con un isolato di *Fusarium* proveniente dalla stessa tesi (*F. sezione Liseola* misto C2 22b).

Gli isolati in esame sono stati allevati in piastre (dal diametro di 6 cm) contenenti PCA. Dal bordo in attivo accrescimento delle colonie sono stati prelevati dischetti di agar e micelio di 6 mm di diametro con cui sono state inoculate piastre di PDA e WA (3 repliche per ogni combinazione). A causa delle diverse velocità di accrescimento del *Fusarium* e del *Pythium* la prova è stata condotta in tre modalità differenti: inoculando contemporaneamente *Fusarium* e *Pythium* ed inoculando il *Fusarium* 48 h e 24 h prima del *Pythium* per dare al patogeno un vantaggio competitivo. I dischetti di micelio sono stati posti sulla stessa piastra a 5 cm di distanza, secondo lo schema illustrato in figura 3.2.

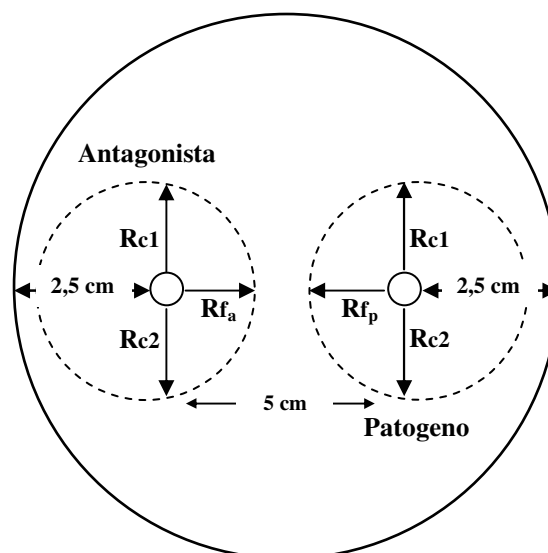


Figura 3.2 Schema dell'inoculo per la prova di antagonismo "in vitro" e delle misurazioni effettuate.

Le piastre sono state incubate alla temperatura di 24 °C e fotoperiodo luce/buio 12h/12h. Sono stati eseguiti rilievi sull'accrescimento radiale delle colonie ogni 24 ore fino al contatto tra le due colonie. Le misurazioni sono state effettuate sui raggi delle colonie, misurando le distanze di accrescimento laterali utilizzate come controllo (Rc1 e Rc2) e quelle frontali del *Pythium* (**Rf_a**) e del *Fusarium* (**Rf_p**).

L'eventuale attività antagonistica esercitata da parte di *Pythium* spp. nei confronti degli isolati appartenenti al genere *Fusarium* è stata valutata prendendo in esame i seguenti parametri (Royse and Riess, 1978; Bell et al., 1982):

- presenza di una zona di inibizione tra le due colonie
- inibizione della crescita radiale delle colonie del patogeno
- capacità di sovracrescita e sporulazione dell'antagonista sulla colonia del patogeno (indizio di micoparassitismo).

3.6.2 Produzione di coilings

Al fine di valutare ulteriormente le capacità micoparassitarie degli isolati antagonisti in esame è stata allestita un'ulteriore prova, volta a osservare l'eventuale produzione di avvolgimenti ifali (coilings) intorno alle ife degli isolati di *Fusarium*. La prova è stata condotta riutilizzando gli stessi accoppiamenti *Pythium/Fusarium* usati nel test precedente (compresa la coppia *Trichoderma/Fusarium*), su substrato WA in piastre Petri (ø 10 cm) contenenti un disco di cellophan (ø 9 cm) sterile (autoclavato per 2 volte a 121 °C per 40 minuti in acqua). Le piastre sono state inoculate con dischetti di micelio (ø 6 mm) di *Pythium* e *Fusarium* (vedi § 3.6.1) concedendo a questo ultimo un vantaggio competitivo di 48 h secondo lo schema in figura 3.3.

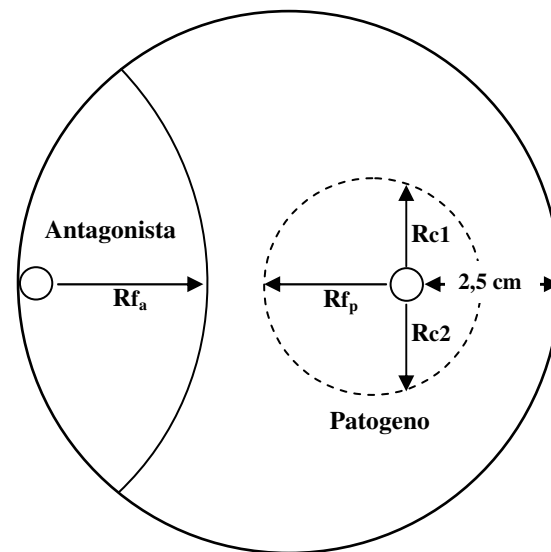


Figura 3.3 Schema di inoculo delle piastre per la valutazione dell'attività antagonistica attraverso la produzione di coilings.

Le piastre sono state incubate nel fototermostato a 24°C con fotoperiodo luce/buio 12h/12h fino a quando le colonie avessero raggiunto una dimensione tale da confluire. Nella zona di contatto tra le due colonie, sono state asportate delle porzioni di cellophan (circa 3 cm per 1 cm), trasferite su un vetrino portaoggetto e montate a freddo con colorante Cotton blue (0,5%) addizionato di Sudan III* in eccesso ed osservate al microscopio composto.

Oltre alla produzione di coilings, i seguenti caratteri sono stati considerati come indizi di eventuale attività antagonistica:

- corte ramificazioni (o lacci)
- vacuolizzazione e svuotamento dei contenuti cellulari delle ife del patogeno a seguito di contatto con le ife dell'antagonista.

* **Cotton blue con Sudan III**

Per la preparazione della soluzione base mischiare: acido lattico, glicerina e acqua (1:2:1). A 100 ml della soluzione base aggiungere Sudan III in eccesso e far bollire in matraccio. Lasciare raffreddare e filtrare la soluzione ottenuta con carta. Aggiungere Cotton blue (0,5%) ed agitare fino a soluzione completa.

3.6.3 Micoparassitismo dei macroconidi

Sulla base di quanto riportato in letteratura, questa prova è stata allestita al fine di valutare la capacità degli isolati di *Pythium* di parassitizzare i conidi del *Fusarium* e per determinare, contemporaneamente, l'effetto del parassitismo dei macroconidi sulla produzione di oogoni da parte dell'eventuale antagonista, come descritto nel lavoro di Davanlou *et al.* (1999).

Sospensioni di macroconidi prodotti da colonie di *Fusarium* spp. (gli stessi isolati impiegati nelle precedenti prove di antagonismo) cresciute su PCA per 9 giorni a 24°C, fotoperiodo luce/buio 12h/12h, sono state preparate e corrette ad una concentrazione di 10^7 spore mL⁻¹, al fine di ottenere un'elevata densità che, come noto, ne inibisce la germinazione. 100 µL di ciascuna sospensione sono stati distribuiti uniformemente sulla superficie di piastre Petri contenenti 11 mL di WA o PDA (3 repliche per ogni combinazione). Ogni piastra è stata inoculata con 5 dischetti (ø 6 mm) di PCA contenenti apici ifali di *Pythium*. I blocchi sono stati posizionati sulle piastre seguendo lo schema illustrato nella figura 7. Contemporaneamente sono state inoculate piastre di PDA solo con la sospensione di conidi del *Fusarium* e dischetti di PDA non colonizzati e piastre di WA solo con i dischetti di *Pythium* come controlli. L'incubazione è stata effettuata a 24°C ed è stata seguita per 48 h. Dopo tale intervallo di tempo dalle piastre contenenti WA sono state prelevate 3 strisce di agar (una per replica) tra i blocchi periferici e quello centrale (vedi fig. 3.4). Le strisce di agar sono state montate su vetrini e colorati con Cotton blue (0,5%) aggiunto di Sudan III in eccesso. Per determinare il numero di oogoni, da ogni vetrino sono stati scelti a caso 20 campi (all'obiettivo 10 x) dal centro della striscia. Inoltre, per individuare la percentuale di conidi parassitizzati, in ogni vetrino sono stati contati a

random (all'obiettivo 40x) su un totale di 100 conidi, quanti si mostravano pieni e quanti erano svuotati del contenuto citoplasmatico.

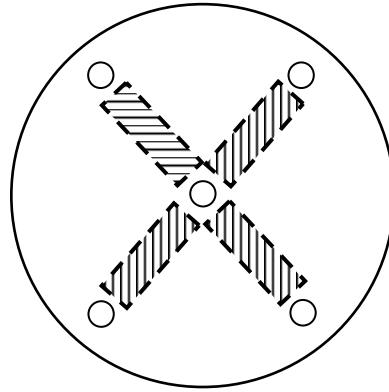


Figura 3.4 Schema di inoculo delle piastre per la prova di micoparassitismo dei conidi. Le zone tratteggiate rappresentano le strip di agar prelevate per l'analisi al microscopio dopo l'incubazione.

Inoltre, per le piastre inoculate su substrato PDA, è stata effettuata un'analisi visiva della presenza o meno di una zona di inibizione intorno ai dischetti di inoculo del *Pythium*.

4. RISULTATI

4.1 *Determinazione della componente micotica del terreno*

Al fine di valutare la composizione del micobiotà presente nei tre tipi di terreno è stata condotta la prova descritta nei materiali e metodi (§ 3.2). Già dopo 24 h d'incubazione, sulle piastre inoculate con le varie diluizioni di terreno sono comparse le prime colonie, sottoforma di micelio lasso, bianco e non sporulante. Alla luce della finalità di questo studio, cioè stimare la diversità di specie fungine presenti nel terreno, è stato deciso di recuperare tutte le colonie presenti sulle piastre, prima che confluissero l'una verso l'altra (Bills *et al.*, 2004). Dalle piastre contenenti aliquote della sospensione "tal quale" non è stato possibile recuperare alcuna colonia a causa della densità troppo elevata dei propaguli che ha portato alla formazione di un "tappeto" indistinto di micelio. Poiché, anche nelle piastre utilizzate per seminare aliquote della diluizione "alla -1" le colonie apparse si presentavano confluenti tra loro, sono state prelevati a caso cinque tasselli del mezzo di crescita da punti diversi della piastra e trasferiti su capsule Petri (6 cm di diametro) contenenti mezzo PDA. Da tutte le altre diluizioni sono state isolate tutte le colonie emerse, prelevando piccoli tasselli di agar e micelio dal bordo. Trascorse 48 h dall'inoculo non è più stato possibile proseguire con gli isolamenti poiché le colonie, troppo cresciute, si sono sovrapposte.

Tutti gli isolati ottenuti dal campionamento sono stati sottoposti ad indagine microscopica al fine di identificarne il genere e, laddove possibile, la specie di appartenenza. Per i ceppi non andati incontro a differenziazione di strutture riproduttive, sono state condotte prove di induzione della sporulazione; i risultati ottenuti sono stati soddisfacenti per tutti i miceli

sterili, con l'eccezione di 7 isolati per i quali non è stato possibile attribuire un genere di appartenenza e che, quindi, sono indicati come micelio sterile. I risultati dell'identificazione degli isolati fungini sono riportati nelle Tabelle 4.1, 4.2 e 4.3 rispettivamente per il terreno argilloso, misto e sabbioso.

Tabella 4.1 Identificazione degli isolati provenienti da terreno di tipo argilloso

TERRENO ARGILLOSO					
10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}	
A	<i>Fusarium sez. Liseola</i>	B	<i>Aspergillus</i>	A	Micelio sterile
B	<i>Fusarium oxysporum</i>	C	Micelio sterile	B	<i>Coelomycetes</i>
C	<i>Coelomycetes</i>	D	<i>Coelomycetes (Phoma like)</i>	C	<i>Coelomycetes</i>
D	<i>Absidia</i>	E	<i>Aspergillus</i>	D	<i>Cladosporium</i>
E	<i>Trichoderma</i>	F	<i>Trichoderma</i>	E	<i>Coelomycetes (Phoma like)</i>
F	<i>Fusarium equiseti</i>	G	<i>Stachybotris (chartarum)</i>	F	<i>Cladosporium</i>
		G.1	<i>Fusarium solani</i>	G	<i>Cladosporium</i>
		H	<i>Trichoderma</i>	H	<i>Cephalosporium</i>
		I	<i>Stachybotris (chartarum)</i>	I	<i>Cephalosporium</i>
		L	<i>Coelomycetes</i>	L	<i>Cephalosporium</i>
		N	<i>Cladosporium</i>	M	<i>Cephalosporium</i>
		O	<i>Acremonium</i>	N	<i>Cephalosporium</i>
		P	<i>Penicillium</i>	P	<i>Cladosporium</i>
		Q	<i>Verticillium</i>		
		R	<i>Aspergillus</i>		
		S	<i>Clonostachys rosea</i>		
		T	<i>Cladosporium</i>		
10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}	
A	<i>Alternaria (tipo tenuis)</i>	A	Micelio sterile	B	<i>Cladosporium</i>
B	<i>Cladosporium</i>				
C	<i>Cladosporium</i>				
D	<i>Cladosporium</i>				
E	<i>Fusarium equiseti</i>				
10^{-7}					
A	<i>Cladosporium</i>				

Tabella 4.2 Identificazione degli isolati provenienti da terreno di tipo misto

TERRENO MISTO			
10^{-1}		10^{-2}	
B	<i>Penicillium</i>	A	<i>Stachybotrys (chartarum)</i>
C	<i>Caecomyces (Phoma like)</i>	B	Micelio sterile
D	<i>Caecomyces (Phoma like)</i>	C	<i>Penicillium</i>
D.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	E	<i>Stachybotrys (chartarum)</i>
F	<i>Fusarium solani</i>	F	<i>Penicillium</i>
		G	<i>PseudoBotrytis</i>
10^{-3}		10^{-4}	
A	<i>Cladosporium</i>	A	<i>Aspergillus</i>
B	<i>Acremonium</i>	B	<i>Penicillium</i>
		C	<i>Penicillium</i>

Tabella 4.3 Identificazione degli isolati provenienti da terreno di tipo sabbioso

TERRENO SABBIOSO			
10^{-1}		10^{-2}	
A	<i>Mortierella</i>	A	Micelio sterile
B	<i>Verticillium</i>	B	<i>Trichoderma</i>
C	<i>Fusarium equiseti</i>	C	<i>Verticillium</i>
D	<i>Fusarium oxysporum</i>	E	<i>Verticillium</i>
E	Micelio sterile	E.1	<i>Botrytis</i>
10^{-3}		F	<i>Penicillium</i>
A	Micelio sterile	G	<i>Trichurus spiralis</i>
C	<i>Penicillium</i>	H	<i>Penicillium</i>
D	<i>Penicillium</i>	I	<i>Penicillium</i>
E	<i>Aspergillus</i>	L	<i>Trichoderma</i>
10^{-5}		M	<i>Trichoderma</i>
A	<i>Cladosporium</i>	N	<i>Aspergillus</i>
B	<i>Cladosporium</i>	O	Micelio sterile
C	<i>Cladosporium</i>	Q	<i>Penicillium</i>
D	<i>Stemphyllium</i>	R	<i>Mortierella</i>
10^{-6}		S	<i>Mortierella</i>
A	<i>Cladosporium</i>	T	<i>Verticillium</i>
10^{-7}		U	<i>Fusarium solani</i>
A	<i>Cladosporium</i>	V	<i>Verticillium</i>
B	<i>Cladosporium</i>	Z	<i>Verticillium</i>

In *Tavola I* sono riportate alcune immagini, ottenute al microscopio composto, di isolati fungini provenienti dai tre terreni saggiati.

4.2 Determinazione della quantità di micotossina da utilizzare e prove di sterilità della paglia

Per determinare la concentrazione di micotossina (DON) da utilizzare per il trattamento della paglia, è stata allestita una prova empirica come descritto in § 3.3, volta a valutare la quantità di micotossina (ppm) trattenuta dalla paglia dopo l'imbibizione. I calcoli effettuati hanno dato come risultato una variazione di peso media, tra le quattro repliche (dopo 24 h d'imbibizione) pari a $\Delta_{\text{peso}}=0,047\text{g}$. Da questo dato, approssimando, è stato stimato che la paglia aveva trattenuto 0,047 mL di soluzione. Sulla base delle indicazioni fornite nel lavoro di Cooney *et al.*, (2001) è stato deciso di utilizzare una concentrazione finale di DON nella paglia pari a 50 ppm, corrispondente a $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Quindi, ipotizzando di avere utilizzato una soluzione contenente 50 ppm di micotossina per l'imbibizione, applicando la proporzione:

$$0,05 \text{ mg} : 1 \text{ ml} = x : 0,047 \text{ ml}$$

è stato ottenuto che nella paglia sarebbe stata trattenuta una quantità di DON pari a 2,35 μg . Tale valore è stato rapportato al peso iniziale medio della paglia e dal risultato è stato dedotto che la concentrazione del DON rimasta nei pezzi da interrare era pari a $102,17 \mu\text{g g}^{-1}$ (=ppm), cioè il doppio di quella desiderata.

Poichè il rapporto tra la concentrazione della soluzione d'imbibizione e la concentrazione finale nella paglia è risultato essere di 1:2, è stato deciso di usare una concentrazione di micotossina nella soluzione d'imbibizione pari a 25 ppm.

Al fine di valutare il livello di sterilità della paglia trattata con la soluzione di metanolo+acqua+DON, il substrato esca trattato è stato piastrato su WA+S+B e su NA+C da cui, dopo incubazione a 24°C, non si è originata alcuna colonia fungina e/o batterica. Sulla base di queste osservazioni, è stato deciso di non sottoporre la paglia ad alcun trattamento sterilizzante prima dell'imbibizione. Questo perché la quantità di metanolo presente nella soluzione utilizzata per sciogliere il DON (85%) è risultata sufficiente ad eliminare eventuali microrganismi residenti nel substrato da impiegare come esca.

4.3 Valutazione dell'effetto del DON sulla colonizzazione della paglia da parte di funghi filamentosi

La parte principale e più impegnativa di questo lavoro di tesi è stata l'identificazione dei ceppi isolati dai pezzi di paglia trattati o non trattati con il DON ed interrati nei tre tipi di terreno. Una prima analisi è stata condotta distinguendo gli isolati che presentavano strutture riproduttive dai miceli sterili (vedi § 3.4). Attraverso un'indagine microscopica è stata eseguita l'identificazione dei ceppi fungini, sulla base di caratteristiche morfologiche e delle fruttificazioni gamiche e agamiche (taglia, colore, forma ecc..) e seguendo le chiavi dicotomiche descritte nel *Compendium of Soil Fungi* (Domsch *et al.*, 1980) che ha permesso l'assegnazione dei ceppi ad un genere o, laddove possibile, ad una specie di appartenenza.

Con una certa frequenza, il trasferimento dalla piastra contenente i pezzi di paglia recuperati dal terreno a nuove piastre di PDA ha dato origine a colonia miste, cioè non contenenti un unico individuo. In questi casi, i due o più isolati fungini sono stati separati

tramite il prelevamento, con una punta di vetro, eseguito mediante osservazione al microscopio “stereo” e trasferiti su nuove piastre di PDA.

I miceli sterili sono stati, dapprima, raggruppati sulla base delle caratteristiche morfologiche della colonia (colore del micelio e del retro-piastra, consistenza del micelio classificata come “raso” o “aereo e cotonoso”, velocità di accrescimento). In seguito sono stati sottoposti a prove per indurre la sporulazione (vedi § 3.5), mediante incubazione su diversi substrati e a differenti condizioni di luce e temperatura. Per gli isolati rimasti sterili non è stato possibile assegnare un genere e una specie di appartenenza e quindi sono stati indicati come “Miceli sterili”.

Le tabelle di seguito riportano, in dettaglio, il risultato delle identificazioni degli isolati derivanti da ciascun pezzo di paglia recuperato dai diversi terreni.

Tabella 4.4 Identificazioni dei ceppi isolati dal terreno di composizione mista.

<u>TERRENO MISTO</u>						
N°pezzo paglia	Controllo 1	Controllo 2	Controllo 3	DON 1	DON 2	DON 3
1	a) <i>F. equiseti</i> b) <i>F. sez. Liseola</i> + <i>Chaetomium</i>	<i>F. equiseti</i>	a) Micelio sterile 4 b) <i>Pythium</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>F. equiseti</i>	a) <i>F. oxysporum</i> b) <i>Fusarium sp.</i>
2	Micelio sterile	Micelio sterile 1	a) Micelio sterile 3 b) Micelio sterile	Micelio sterile	Micelio sterile 3	a) Micelio sterile3 b) <i>Pythium</i>
3	<i>F. oxysporum</i>	a) <i>F. equiseti</i> b) Micelio sterile 4	Micelio sterile 3	b) Micelio sterile 3	a) <i>F. equiseti</i> b) Micelio sterile 4	Micelio sterile
4	Micelio sterile	Micelio sterile 3	a) Micelio sterile 4 b) Micelio sterile 3	Micelio sterile	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 3
5	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	a) <i>Chaetomium</i> b) <i>F. oxysporum</i>	a) <i>F. oxysporum</i> o sez <i>Liseola</i> b) <i>F.</i> <i>oxysporum</i>	Micelio sterile 4	<i>Chaetomium</i>
6	X	<i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile 3	<i>Pythium</i>	b) Micelio sterile 5	Micelio sterile 3
7	a) <i>F. oxysporum</i> b) <i>F. solani</i>	<i>F. sez. Liseola</i>	a) Micelio Sterile 3 b) Micelio Sterile 5	Micelio sterile 3	a) Micelio sterile 3 b) <i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>

TERRENO MISTO						
N°pezzo paglia	Controllo 1	Controllo 2	Controllo 3	DON 1	DON 2	DON 3
8	a)Micelio sterile b) <i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile 3	a) <i>F. oxysporum</i> a.1) <i>Myrothecium</i> b)Micelio sterile 4	a)Micelio sterile 4 b) <i>Chaetomium</i>	a) <i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile 4
9	<i>F. oxysporum</i> (o <i>Liseola</i>)	a) Micelio sterile 5 b) Micelio sterile 3	a) <i>F. equiseti</i> a.1) <i>F. oxysporum</i>	a)Micelio sterile b)Micelio sterile 5	Micelio sterile 3	a) <i>Pythium</i> b) <i>Chaetomium</i>
10	<i>F. oxysporum</i>	b) <i>F. oxysporum</i>	a)Micelio sterile 3 b) <i>F.lateritium</i>	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 3	a)Micelio sterile b)Micelio sterile
11	<i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile 3	a)Micelio sterile 5 b)Micelio sterile 3	Micelio sterile 3	Micelio sterile 4	a) <i>F. equiseti</i> a.1) <i>Fusarium spp</i>
12	<i>F. equiseti</i>	a) <i>F. equiseti</i> b)Micelio sterile2 c) <i>F. oxysporum</i>	a)Micelio sterile 4 b)Micelio sterile 3	a)Micelio sterile b) <i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 3	Micelio sterile
13	Mucoracea	a) <i>F. oxysporum</i> a.1) <i>Myrothecium</i>	Micelio sterile 1	a)Micelio sterile b) <i>F. sez. Liseola</i> C) <i>Chaetomium</i>	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 3
14	X	a) <i>F. equiseti</i> b)Micelio sterile 5	a) <i>F. oxysporum</i> b.1)Micelio sterile	X	<i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile 3
15	<i>F. oxysporum</i>	a)Micelio sterile 3 b) <i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 3	<i>Pythium</i>	Micelio sterile 3	a) <i>F. equiseti</i> b) <i>F. oxysporum</i>
16	a) <i>F. solani</i> b) <i>F. sez. Liseola</i>	<i>Chaetomium</i>	a) <i>F. oxysporum</i> b)Micelio sterile 4 c) <i>F. lateritium</i>	Micelio sterile 4	a) Micelio sterile 4 b) <i>F. equiseti</i>	Micelio sterile
17	Micelio sterile 3	<i>F. equiseti</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. Liseola</i>	Micelio sterile 3	a) <i>F. oxysporum</i> a.1) <i>Myrothecium</i>
18	<i>Pythium</i>	a) Micelio sterile 3 b) <i>Pythium</i>	a)Micelio sterile 4 b) <i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile 4	<i>F. solani</i>	Micelio sterile 4
19	a)Micelio sterile 3 b) <i>F. oxysporum</i> o sez. <i>Liseola</i>	a)Micelio sterile 3 b) <i>F.solani</i> b.1) <i>F.oxysporum</i>	Micelio sterile 3	a)Micelio sterile 3 b) <i>F. oxysporum</i>	a) <i>F. equiseti</i> b) <i>Chaetomium</i>	a) <i>Pythium</i> b) <i>Stachybotris</i>
20	Micelio sterile 3	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 3	Micelio sterile 3	a) <i>Pythium</i> b) <i>F. equiseti</i>	a)Micelio sterile 3 b)Micelio sterile
21	<i>F. equiseti</i>	a) <i>Fusarium</i> sp. a.1)Mucoracea	Micelio sterile 3	Micelio sterile	Micelio sterile 3	a) <i>F. sez. Liseola</i> a.1) <i>Myrothecium</i>
22	<i>Pythium</i>	a) <i>F. lateritium</i> a.1) <i>F. sez. Liseola</i> b) <i>Trichoderma</i>	a) <i>Fusarium</i> sez. <i>Liseola</i> b)Micelio sterile 4	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile	<i>F. oxysporum</i>
23	<i>F. sez. Liseola</i>	a)Micelio sterile b) <i>Pythium</i>	Micelio sterile 3	<i>F. equiseti</i>	a) <i>Fusarium</i> sp. b)Micelio sterile 3	a) <i>F. graminearum</i> b)Micelio sterile 3
24	<i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile	a) <i>F. solani</i> b)Micelio sterile	Micelio sterile 3	<i>Pythium</i>	<i>F. equiseti</i>
25	X	<i>F. culmorum</i>	Micelio sterile 3	a) <i>F. equiseti</i> a.1) <i>F. oxysporum</i> C) <i>F. sez. Liseola</i>	Micelio sterile 3	Micelio sterile 4

TERRENO MISTO						
N°pezzo paglia	Controllo 1	Controllo 2	Controllo 3	DON 1	DON 2	DON 3
26	<i>F. oxysporum</i>	a) <i>Chaetomium</i> b) <i>F. sez. Liseola</i>	<i>F. equiseti</i>	a)Micelio sterile3 b)Micelio sterile4	a) <i>F. equiseti</i> b) <i>F. sez. Liseola</i> b.1) <i>F. solani o oxy</i>	<i>Fusarium</i> sp.
27	Micelio sterile 4	Micelio sterile 3	Micelio sterile 4	a)Micelio sterile3 b)Micelio sterile	a)Micelio Sterile 4 b)Micelio sterile 3	<i>F. equiseti</i>
28	<i>F. equiseti</i>	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 3	a)Micelio sterile4 b) <i>F. oxysporum</i>	a) <i>F. equiseti</i> b)Micelio sterile 4	Micelio sterile 3
29	<i>Pythium</i>	<i>Pythium</i>	a) <i>F. oxysporum</i> b) Micelio sterile 3	a) <i>Fusarium</i> spp b) <i>F. oxysporum</i>	a) <i>F. oxysporum</i> a.1) <i>Myrothecium</i> b) <i>Pythium</i>	a) <i>F. equiseti</i> a.1)Micelio Sterile
30	Micelio sterile 3	Micelio sterile 3	Micelio sterile 3	Micelio sterile 4	a)Micelio sterile 4 b) <i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile 3

Tabella 4.5 Identificazioni dei ceppi isolati dal terreno di composizione tendente argillosa.

TERRENO ARGILLOSO						
N°pezzo paglia	Controllo 1	Controllo 2	Controllo 3	DON 1	DON 2	DON 3
1	Micelio sterile 2	<i>F. equiseti</i>	<i>Cephalosporium</i>	Micelio sterile	Micelio sterile 11	X
2	Micelio sterile 5	<i>F. oxysporum</i>	<i>Caelomyces</i>	Micelio sterile	Micelio sterile	Micelio sterile 11
3	X	Micelio sterile	Micelio sterile 2	<i>Pythium</i>	Micelio sterile	<i>F. oxysporum</i>
4	Micelio sterile 2	a)Micelio sterile 2 b)Micelio sterile	Micelio sterile	Micelio sterile	Micelio sterile 5	a)Micelio sterile 6 b)Micelio sterile 5
5	Micelio sterile 5	Micelio sterile 2	Micelio sterile	Micelio sterile 12	a) <i>Chaetomium</i> b)Micelio Sterile 12	Micelio sterile
6	Micelio sterile 5	<i>F. solani</i>	Micelio sterile	a)Micelio sterile 12 b) <i>Pythium</i>	Micelio sterile	<i>F. equiseti</i>
7	Micelio sterile 2	<i>F. sez. Liseola</i>	X	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 3	Micelio sterile
8	X	<i>F. equiseti</i>	<i>F. solani</i>	<i>Caelomyces</i>	Micelio sterile 11	<i>Pythium</i>
9	a)Micelio sterile 2 b)Micelio sterile5	<i>F. equiseti</i>	<i>F. oxysporum</i>	a) <i>Fusarium</i> spp. b) <i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile 11	<i>Chaetomium</i>
10	<i>F. culmorum</i>	<i>F. equiseti</i>	a) <i>F. solani</i> a.1) <i>F.oxysporum</i>	a)Micelio sterile b) <i>F. equiseti</i>	Micelio sterile	X
11	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Chaetomium</i>	Micelio sterile 2	Micelio sterile	Micelio sterile	<i>Chaetomium</i>
12	Micelio sterile 12	a)Micelio sterile11 b) <i>Trichoderma</i>	<i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile	Micelio sterile 12	a) <i>F. equiseti</i> b)Micelio sterile

TERRENO ARGILLOSO						
N°pezzo paglia	Controllo 1	Controllo 2	Controllo 3	DON 1	DON 2	DON 3
13	<i>F. oxysporum</i>	Micelio sterile 11	Micelio sterile 5	Micelio sterile	Micelio sterile 12	X
14	Micelio sterile 6	X	<i>Chaetomium</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile
15	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 11	a)Micelio sterile b) <i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 5	<i>Caelomycetes</i>	a) <i>F. equiseti</i> b)Micelio sterile11
16	Micelio sterile 11	Micelio sterile	Micelio sterile	Micelio sterile 3	Micelio sterile 2	X
17	Micelio sterile 2	<i>F. tricintum</i>	Micelio sterile 2	a) <i>F. sez. Liseola</i> b) <i>F. oxysporum</i>	<i>Colletotrichum</i>	a) <i>F. oxysporum</i> b)Micelio sterile
18	Micelio sterile	Micelio sterile	<i>F. oxysporum</i>	a) <i>F. equiseti</i> b)Micelio sterile	X	Micelio sterile
19	Micelio sterile 5	a)Micelio sterile13 b) <i>F. equiseti</i>	a)Micelio sterile2 b) <i>F. equiseti</i>	a) <i>F. solani</i> a.1) <i>F.oxysporum</i> b) <i>F. sez. Liseola</i>	Micelio sterile	Micelio sterile
20	Micelio sterile 5	Micelio Sterile	X	Micelio sterile	Micelio sterile 2	X
21	a)Micelio sterile11 c) <i>F. equiseti</i>	X	Micelio sterile	X	X	<i>F. lateritium</i>
22	Micelio sterile	X	<i>Chaetomium</i>	a)Micelio sterile b)Micelio sterile 5 c)Mucoracea	Micelio sterile	Micelio sterile 12
23	Micelio sterile	Micelio sterile 12	Micelio sterile 12	Micelio sterile	a)Micelio sterile12 b) <i>Pythium</i>	Micelio sterile
24	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile	Micelio sterile	X	X	<i>Chaetomium</i>
25	a)Micelio sterile12 b) <i>F. equiseti</i>	<i>F. culmorum</i>	a)Micelio sterile 2 b)Micelio sterile	a)Micelio sterile b) <i>F. sez. Liseola</i>	X	<i>Pythium</i>
26	X	<i>Alternaria</i>	Micelio sterile 2	Micelio sterile	Micelio sterile 11	<i>Fusarium</i> sp.
27	Micelio sterile 2	Micelio sterile	<i>Chaetomium</i>	<i>F. oxysporum o sez. Liseola</i>	Micelio sterile	Micelio sterile
28	a)Micelio sterile b)Micelio sterile 5	Micelio sterile	Micelio sterile 6	a) <i>Caelomycetes</i> a.1) <i>Stemphyllium</i>	Micelio sterile 11	<i>F. equiseti</i>
29	X	<i>Alternaria</i>	Micelio sterile 2	Micelio sterile	Micelio sterile 11	Micelio sterile 6
30	Micelio sterile 2	Micelio sterile	a) <i>F. equiseti</i> b)Micelio sterile	<i>F. sez. Liseola</i>	a)Micelio sterile12 b) <i>F. equiseti</i>	Micelio sterile

Tabella 4.6 Identificazioni dei ceppi isolati dal terreno di composizione tendente sabbioso

TERRENO SABBIOSO						
N° pezzo paglia	Controllo 1	Controllo 2	Controllo 3	DON 1	DON 2	DON 3
1	Micelio sterile	<i>Pythium</i>	X	X	<i>Cephalosporium</i>	<i>F. solani</i>
2	a) <i>Mucor</i> b) <i>F. solani</i>	a) Micelio sterile b) <i>Fusarium</i> sp	a) <i>F. oxysporum</i> b) <i>F. sez. Liseola</i> b.1) <i>Fusarium</i> sp.	X	X	Micelio sterile
3	Micelio sterile	Micelio sterile	Micelio sterile 5	Micelio sterile 5	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
4	a) <i>F. equiseti</i> b) Micelio sterile	a) <i>F. oxysporum</i> b) <i>Pythium</i>	Micelio sterile	X	<i>Clonostachys</i>	X
5	b) Micelio sterile	Micelio sterile	Micelio sterile 5	X	X	Micelio sterile
6	<i>Stachybotris</i>	<i>F. equiseti</i>	X	X	a) Micelio sterile b) <i>Fusarium</i> sp.	Micelio sterile
7	a) Micelio sterile b) <i>F. solani</i>	Micelio sterile	X	X	<i>F. culmorum</i>	a) <i>F. oxysporum</i> b) Micelio sterile 5
8	a) <i>F. equiseti</i> b) <i>F. proliferatum</i>	<i>F. equiseti</i>	a) <i>Pythium</i> b) <i>F. sez. Liseola</i>	X	a) <i>F. solani</i> a.1) <i>F. oxysporum</i> b) Micelio sterile	<i>F. equiseti</i>
9	<i>F. solani</i>	a) <i>Fusarium</i> sp. b) <i>F. equiseti</i> c) Micelio sterile	<i>Pythium</i>	Micelio sterile 5	Micelio sterile 5	X
10	<i>Caelomyces</i>	Micelio sterile	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 5	<i>F. sez. Liseola</i>	X
11	a) <i>F. equiseti</i> b) <i>F. solani</i>	a) Micelio sterile 5 b) Micelio sterile	<i>Pythium</i>	a) Micelio sterile 5	X	<i>Fusarium</i> sp.
12	a) <i>F. solani</i> b) <i>Caelomyces</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>Pythium</i>	<i>F. subglutinans</i>	X	<i>Pythium</i>
13	<i>F. solani</i>	a) Micelio sterile b) Micelio sterile 5	<i>Pythium</i>	X	Micelio sterile 5	Micelio sterile
14	<i>Pythium</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>F. sez. Liseola</i>	X	<i>F. oxysporum</i> o <i>sez. Liseola</i>	Micelio sterile
15	Micelio sterile	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pythium</i>	X	<i>Fusarium</i> sp.	Micelio sterile
16	<i>F. equiseti</i>	Micelio sterile 1	<i>Pythium</i>	X	X	Micelio sterile 1
17	Micelio sterile	a) <i>F. sez. Liseola</i> b) <i>F. equiseti</i>	X	X	a) <i>Cephalosporium</i> b) <i>Pythium</i>	Micelio sterile
18	a) <i>F. solani</i> b) Micelio sterile	<i>F. oxysporum</i>	X	X	X	Micelio sterile 5
19	a) Micelio sterile b) Micelio sterile	X	<i>F. equiseti</i>	X	X	a) <i>F. equiseti</i> b) <i>F. graminearum</i>
20	a) <i>Caelomyces</i> b) <i>F. culmorum</i>	a) Micelio sterile b) <i>Fusarium</i> sp.	X	X	X	X

TERRENO SABBIOSO						
N°pezzo paglia	Controllo 1	Controllo 2	Controllo 3	DON 1	DON 2	DON 3
21	Micelio sterile 1	a) <i>F. solani</i> b) <i>F. culmorum</i>	X	X	X	<i>Pythium</i>
22	Micelio sterile	<i>F. oxysporum</i>	X	X	X	Micelio sterile 5
23	<i>F. solani</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>Pythium</i>	X	X	X
24	a) <i>F. solani</i> b) <i>F. sez. Liseola</i>	Micelio sterile	a) Micelio sterile b) <i>Pythium</i>	X	a) <i>F. equiseti</i> b) Micelio sterile 5	<i>F. sez. Liseola</i>
25	a) Micelio sterile b) <i>F. equiseti</i>	<i>Pythium</i>	X	X	<i>F. equiseti</i>	<i>F. equiseti</i>
26	Micelio sterile	<i>F. sez. Liseola</i>	Micelio sterile 5	X	X	Micelio sterile
27	b) Micelio sterile	<i>F. proliferatum</i>	<i>Pythium</i>	Micelio sterile 1	X	X
28	<i>Pythium</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>F. oxysporum</i>	X	a) <i>F. sez. Liseola</i> a.1) Micelio sterile	<i>Pythium</i>
29	Micelio sterile	Micelio sterile	<i>F. equiseti</i>	X	a) <i>F. equiseti</i> a.1) <i>F. oxysporum</i>	<i>Pythium</i>
30	<i>Pythium</i>	Micelio sterile 1	<i>Pythium</i>	<i>F. oxysporum</i>	X	Micelio sterile 5

In *Tavola II* sono riportate alcune immagini ottenute al microscopio composto, illustranti gli isolati provenienti dai terreni inoculati con la paglia trattata (a) e non trattata (b) con DON.

Per riassumere, dai risultati emersi dalle identificazioni sono stati calcolati i numeri di isolamenti totali per le due tesi (CTRL e DON) di ciascun terreno e il numero di isolati presenti in esse, separati per genere e laddove possibile per specie (Tabella 4.7). Non si evincono differenze rilevanti nelle percentuali di identificazione ottenute per i CTRL e per le tesi trattate con DON. Si può ipotizzare che la presenza della micotossina nel substrato utilizzato come esca, non influenzi la competizione per la paglia da parte dei funghi filamentosi presenti nel terreno.

Dalla tabella 4.7, non solo è evidente un'abbondanza di miceli sterili in tutti e tre i terreni saggiati, ma il genere più frequente risulta essere *Fusarium*, di cui sono stati identificate diverse specie, alcune delle quali patogene del frumento e micotossinogene (*F. culmorum* e *F. graminearum*) e altre ricorrenti in ciascun terreno (*F. equiseti*, *F. oxysporum* e *Fusarium* sezione *Liseola*). Ad eccezione della tesi CTRL del terreno misto, *F. equiseti* è risultata essere la specie più presente in ciascuna tesi.

Dopo *Fusarium*, il genere *Pythium* appare il più diffuso in tutti e tre i terreni. Tutti gli isolati, ad eccezione del MISTO C2 29a, all'analisi microscopica hanno mostrato differenziazione di oogoni di tipo spinoso, il che lascia ipotizzare l'appartenenza alle specie *P. oligandrum*, *P. mycoparasiticum*, *P. achanticum*, *P. achantaphorum*, *P. periplocum* ecc...(caratterizzati da oogoni spinosi), noti per la loro attività micoparassitaria verso numerose specie di funghi fitopatogene, tra cui quelle appartenenti al genere *Fusarium* (in modo particolare *F. culmorum*).

E' opportuno spendere alcune parole per sottolineare come un genere, che nel terreno trova uno dei propri habitat preferiti e che racchiude numerosi isolati caratterizzati da un'elevata capacità di competere per il possesso della paglia presente nel terreno, sia stato isolato solo in un caso. Si tratta del genere *Trichoderma*, saprotrofo di origine tellurica, che è stato recuperato solamente nel terreno misto, tesi CRL, replica 2, colonia 2b (Tabella 4.4). E' altresì importante sottolineare, comunque, la scarsa incidenza di *Trichoderma* risultante dagli isolamenti da terreno, volti a valutarne la componente micotica indigena (Tabelle 4.1, 4.2 e 4.3).

Tabella 4.7 Numero di ceppi appartenenti ai diversi generi, risultanti dalla prova di isolamento da terreni diversi, utilizzando paglia (trattata e non trattata con DON) come esca.

GENERE	TERRENO MISTO		TERRENO ARGILLOSO		TERRENO SABBIOSO	
	n° TOT isolamenti CTRL	n° TOT isolamenti DON	n° TOT isolamenti CTRL	n° TOT isolamenti DON	n° TOT isolamenti CTRL	n° TOT isolamenti DON
<i>Fusarium</i>	56	50	23	27	46	23
<i>Fusarium</i> sp.	1	6	1	2	6	3
<i>F. equiseti</i>	14	19	12	10	14	6
<i>F. oxysporum</i>	24	16	6	6	6	5
<i>F. oxysporum</i> o sez. Liseola	1	0	0	2	0	0
<i>F.</i> sez. Liseola	8	6	1	5	6	4
<i>F. proliferatum</i>	0	0	0	0	2	0
<i>F. solani</i>	4	2	3	1	10	3
<i>F. lateritium</i>	3	0	0	1	0	0
<i>F. subglutinans</i>	0	0	0	0	0	1
<i>F. culmorum</i>	1	0	2	0	2	1
<i>F. graminearum</i>	0	1	0	0	0	1
<i>F. tricinctum</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Pythium</i>	7	8	0	5	16	5
<i>Chaetomium</i>	4	5	4	4	0	3
<i>Mucoraceae</i>	1	0	0	1	1	0
<i>Trichoderma</i>	1	0	1	0	0	0
<i>Cephalosporium</i>	0	0	1	0	0	2
<i>Coelomycetes</i>	0	0	0	3	3	0
<i>Clonostachys</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Stachybotrys</i>	0	1	0	0	1	0
<i>Alternaria</i>	0	0	2	0	0	0
<i>Stemphyllium</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Myrothecium</i>	1	3	1	0	0	0
<i>Colletotrichum</i>	0	0	0	1	0	0
Miceli sterili	55	61	58	58	36	24
TOTALE	125	128	93	101	103	59

Infine, confrontando la tabella 4.7 con le tabelle 4.1, 4.2 e 4.3, indicanti la composizione del microbiota presente nei tre terreni, è evidente una certa selezione esercitata dalla paglia che ha portato all'esclusione di alcuni generi, come *Aspergillus*, *Penicillium*, o *Verticillium*.

4.4 Antagonismo e micoparassitismo “in vitro”

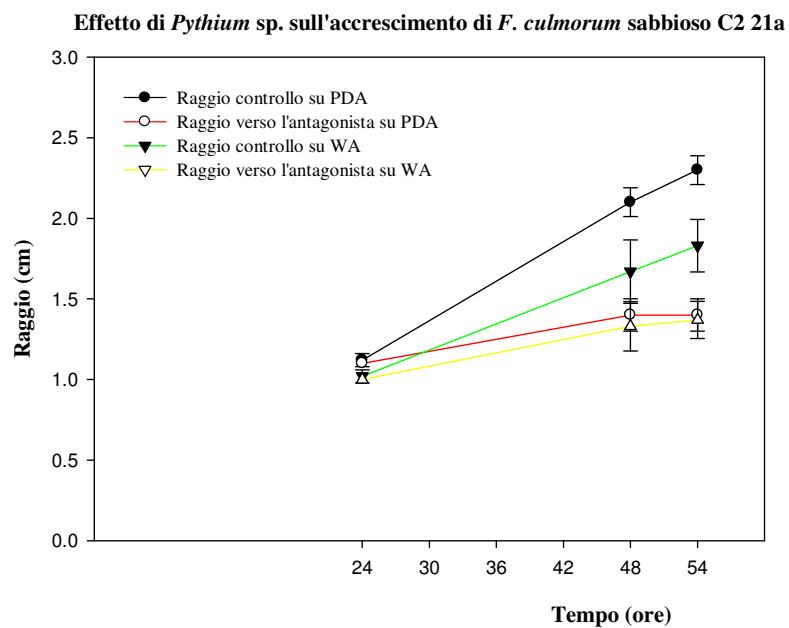
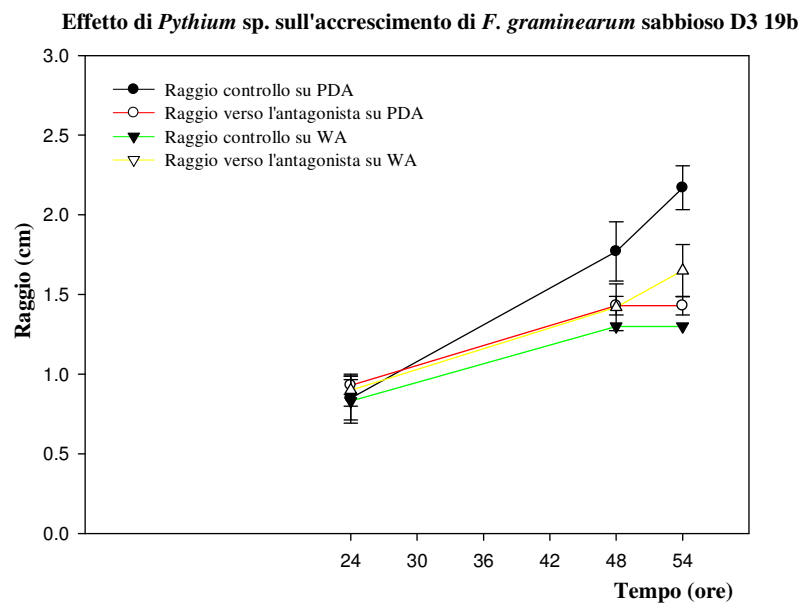
Le osservazioni condotte sugli isolamenti ottenuti utilizzando la paglia (trattata e non trattata con DON) come esca interrata nei tre diversi terreni hanno mostrato che *Fusarium* e *Pythium* sono i generi maggiormente rappresentati. Il genere *Pythium* racchiude numerose specie distinguibili sulla base di alcuni caratteri morfologici, tra cui la produzione di oogoni lisci o spinosi. Numerose specie differenzianti oogoni spinosi, come già accennato nel precedente paragrafo, contengono isolati noti per la loro attività antagonista e micoparassitaria verso funghi fitopatogeni, tra cui specie appartenenti al genere *Fusarium*.

Sulla base di quanto fin qui detto, la parte finale del lavoro di tesi è stata dedicata ad una preliminare valutazione delle potenzialità antagonistiche e micoparassitarie di alcuni isolati di *Pythium* nei confronti di alcuni isolati di *Fusarium*. La scelta degli accoppiamenti patogeno/potenziale antagonista è stata fatta, come descritto nei materiali e metodi, sulla base delle tesi da cui si erano sviluppati i funghi in questione. Inoltre, agli stessi test di antagonismo e micoparassitismo è stato sottoposto l'unico isolato di *Trichoderma* ottenuto dalla prova di valutazione dell'effetto del DON, che è stato accoppiato con un isolato di *Fusarium* proveniente dalla stessa tesi.

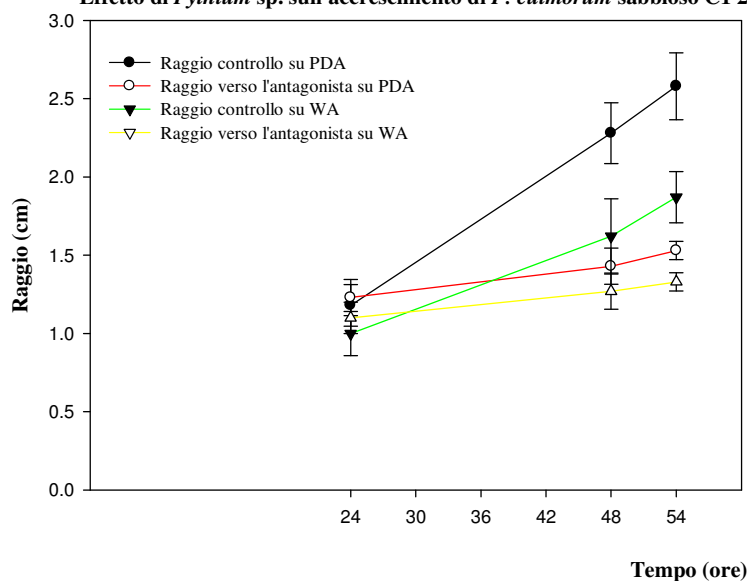
4.4.1 Culture duali

Sulle piastre delle colture duali (vedi § 3.6.1) sono stati eseguiti rilievi sull'accrescimento radiale delle colonie del patogeno dopo 24, 48 e 54 h dall'inoculo dell'antagonista (cioè fino al contatto tra le due colonie). Le misurazioni (cm) sono state effettuate sui raggi delle colonie, utilizzando come controlli quelli in direzione laterale (Rc1 e Rc2), e come “sintomo” d'inibizione quello nella direzione dell'antagonista (Rf_p). Con i valori raccolti

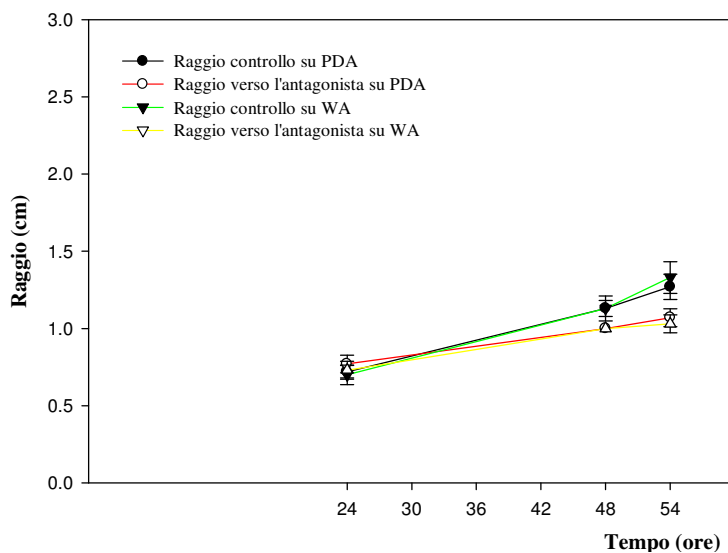
sono stati costruiti i grafici riportati di seguito, dove sulle ascisse è indicato il tempo (espresso in ore), e sulle ordinate le misure dei raggi (espressi in cm). Poiché, sia l'antagonista che il patogeno hanno mostrato velocità di crescita piuttosto elevate ma, comunque, non comparabili, per la realizzazione dei grafici sono state utilizzate solo le colture duali in cui il patogeno è stato inoculato 24 h prima dell'antagonista.



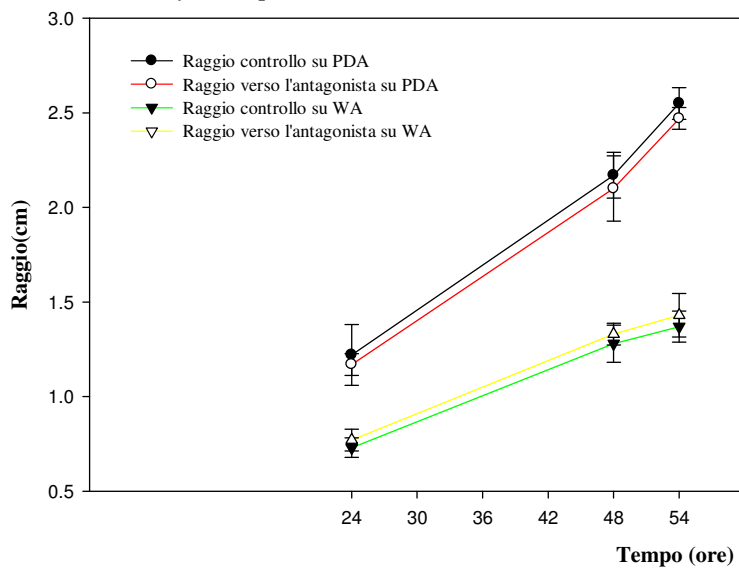
Effetto di *Pythium* sp. sull'accrescimento di *F. culmorum* sabbioso C1 20b



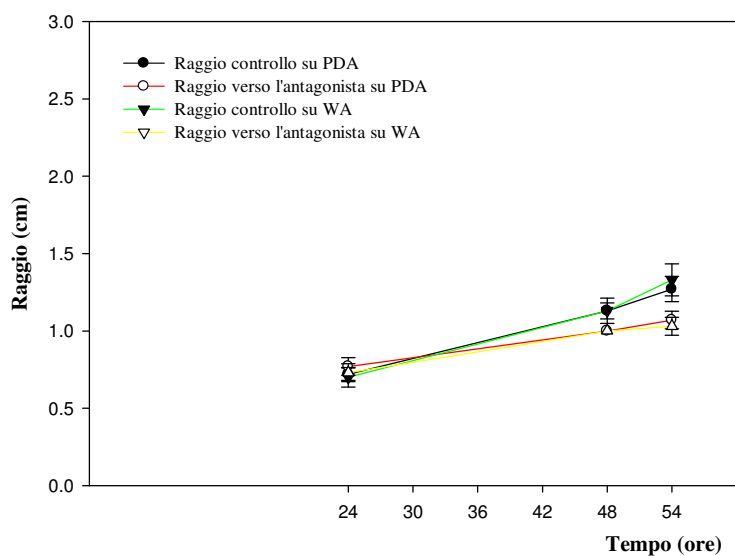
Effetto di *Pythium* sp. sull'accrescimento di *F. sezione Liseola* sabbioso C3 8b



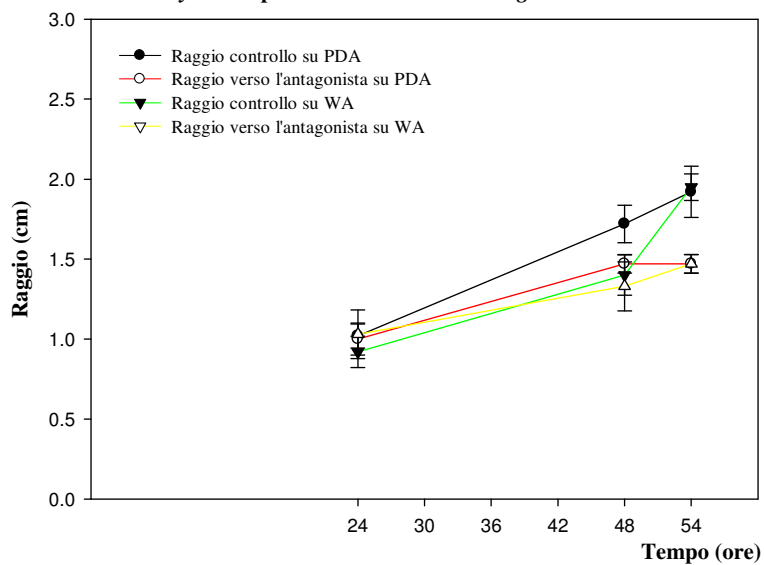
Effetto di *Pythium* sp. sull'accrescimento di *F. culmorum* sabbioso D2 7a



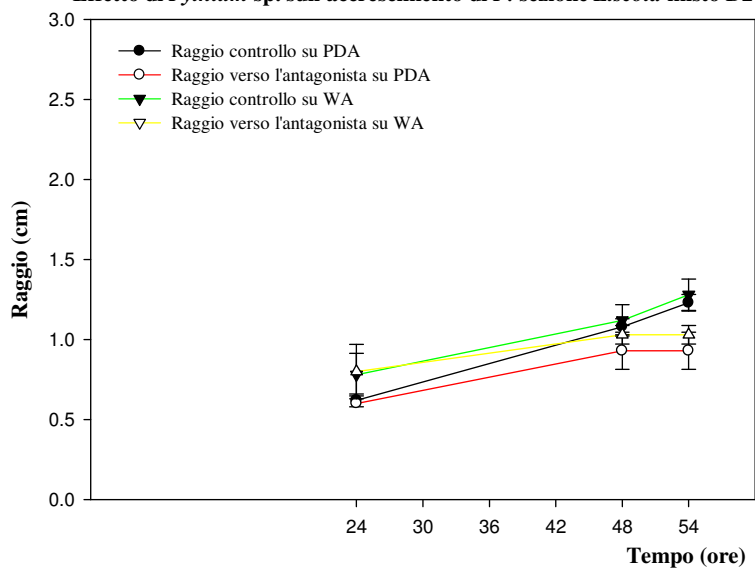
Effetto di *Pythium* sp. sull'accrescimento di *F.* sezione *Liseola* sabbioso C3 8b

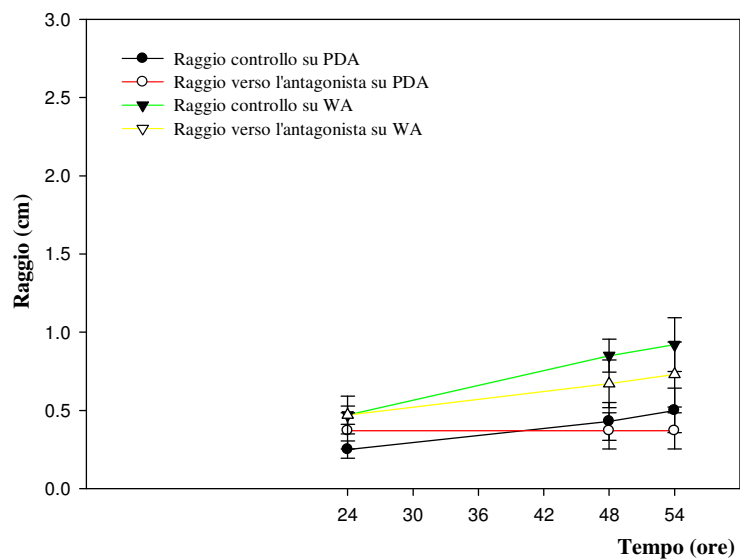
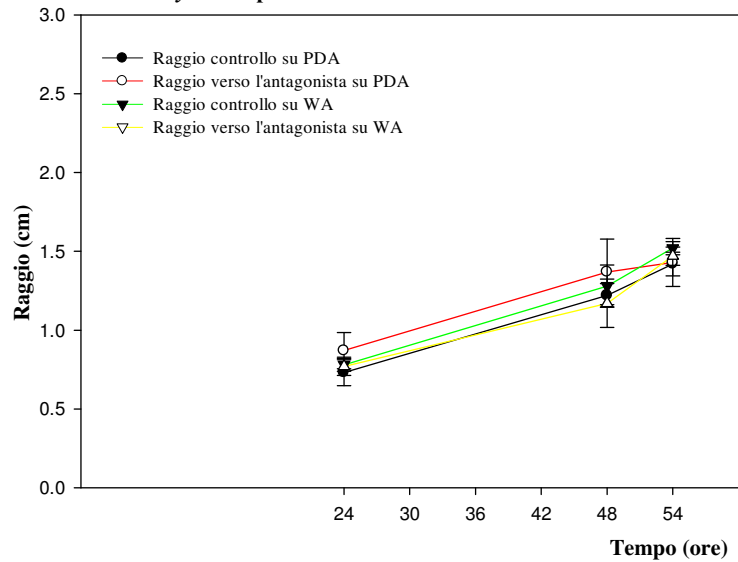
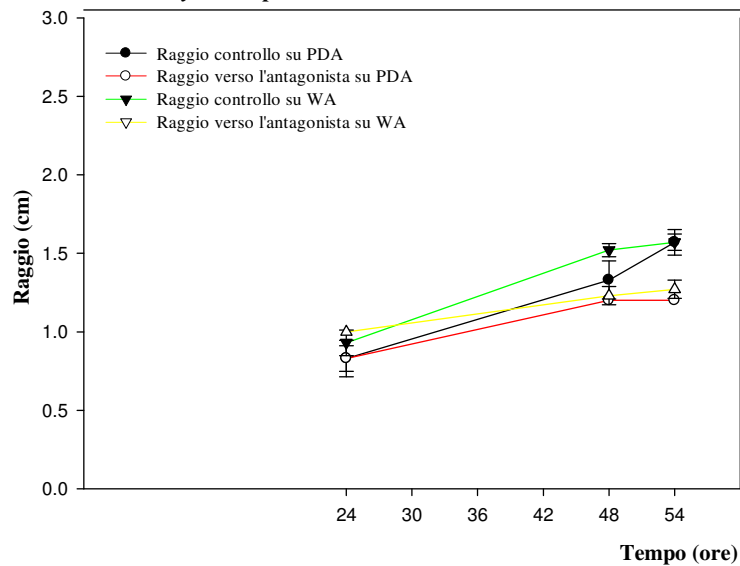


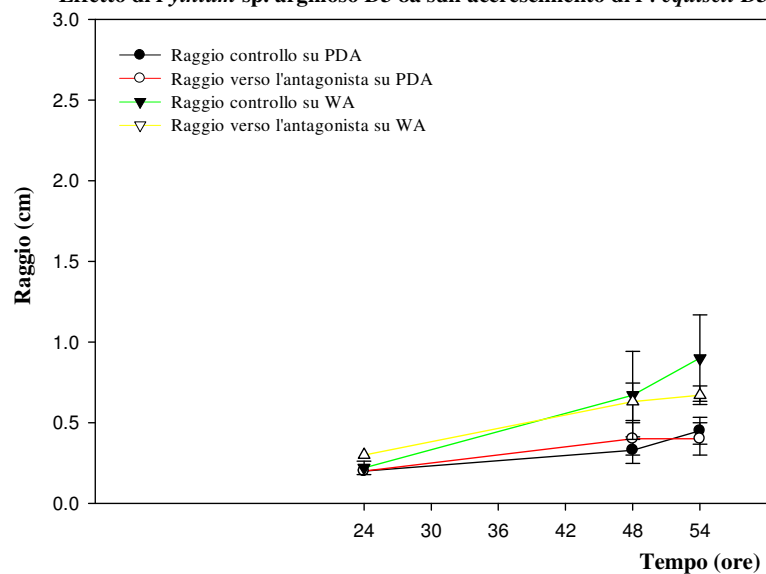
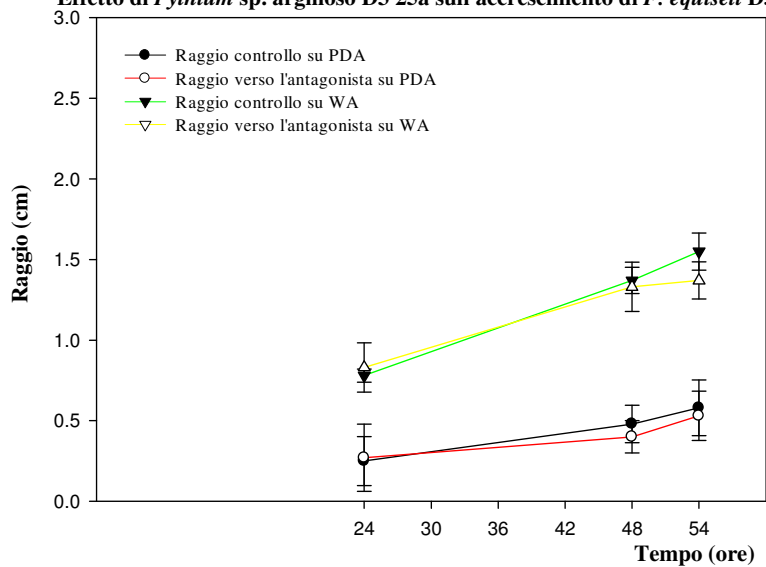
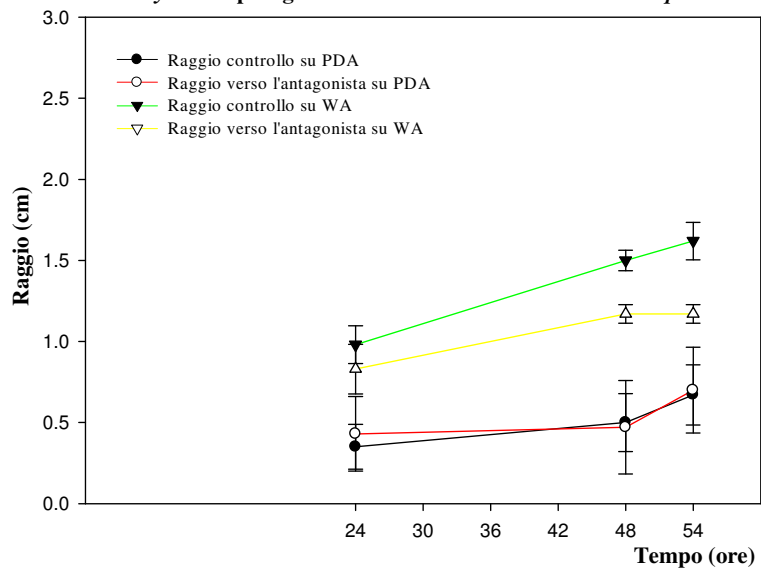
Effetto di *Pythium* sp. sull'accrescimento di *F. graminearum* misto D3 23a



Effetto di *Pythium* sp. sull'accrescimento di *F.* sezione *Liseola* misto D2 24a



Effetto di *Pythium* sp. sull'accrescimento di *F. equiseti* misto C1 28aEffetto di *Pythium* sp. sull'accrescimento di *F. sez. Liseola* misto D1 15bEffetto di *Pythium* sp. sull'accrescimento di *F. sez. Liseola* misto C3 22a

Effetto di *Pythium sp. argilloso* D3 8a sull'accrescimento di *F. equiseti* D3 6aEffetto di *Pythium sp. argilloso* D3 25a sull'accrescimento di *F. equiseti* D3 6aEffetto di *Pythium sp. argilloso* D1 3b sull'accrescimento di *F. equiseti* D1 7a

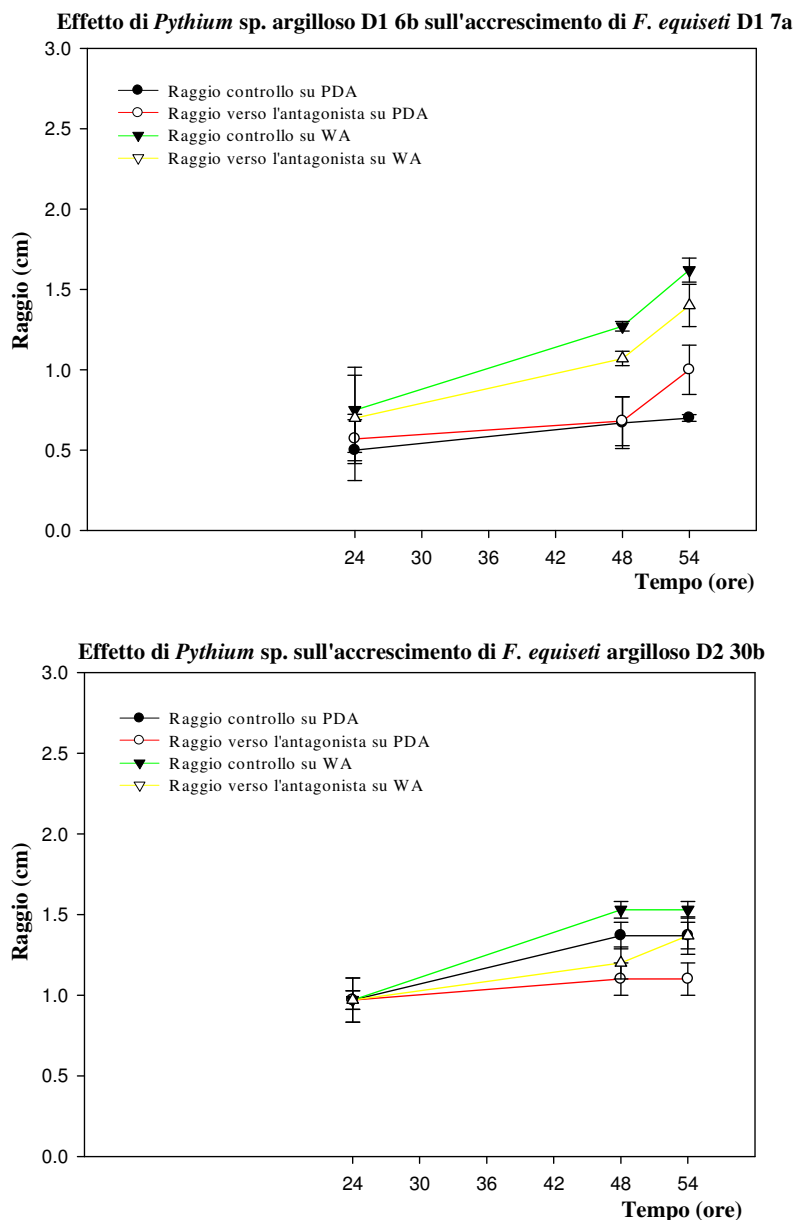
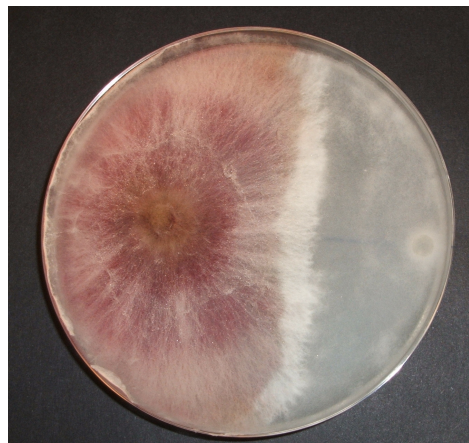
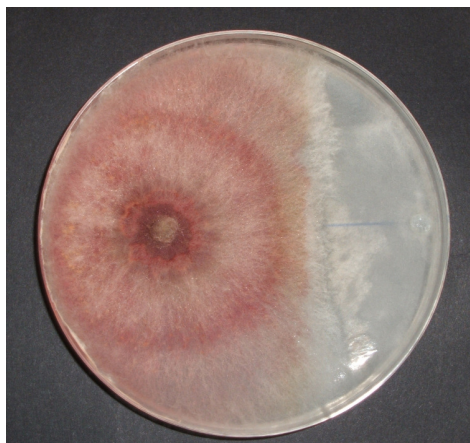


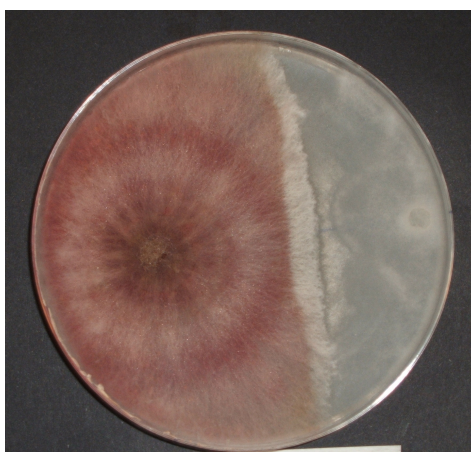
Figura 4.1 Grafici riportanti i valori dei raggi del patogeno espressi in cm. Il valore del raggio di controllo rappresenta la media dei 6 valori ottenuti ad ogni rilevamento.

Dai grafici sopra riportati si evince che tutti i *Fusarium*, tranne *F. equiseti* argilloso D2 30b e D1 7a, mostrano, nella direzione controllo, un aumento nell'accrescimento radiale lineare in funzione del tempo su PDA, probabilmente dovuto alla bassa velocità di crescita dei suoi isolati. Su PDA, le misure dei raggi nella direzione dell'antagonista di *F. graminearum* sabbioso D3 19b, *F. culmorum* sabbioso C2 21a, *F. sez. Liseola* misto D2 24a, *F. sez. Liseola* misto C3 22a e *F. graminearum* misto D3 23a indicano, dopo 24 h dall'inoculo del

Pythium, valori comparabili con quelli dei rispettivi controlli; col passare del tempo l'accrescimento dei raggi verso il *Pythium* subisce una sostanziale interruzione dell'accrescimento fino a fermarsi alle 54 h, quando giunge a ridosso della colonia dell'antagonista. Per *F. sez. Liseola* misto D2 24a l'effetto dell'inibizione è apprezzabile solo dopo 54 h in quanto prima le misure del raggio controllo e del raggio verso l'antagonista non sono differenti. Su WA i raggi mostrano andamenti simili a quelli su PDA: per il *F. graminearum* misto D3 23a la differenza nell'accrescimento radiale su WA tra R_c e R_f è apprezzabile solo dopo 54 h.



F. graminearum sabbioso D3 19b vs *Pythium* D3 21a *F. culmorum* sabbioso C2 21a vs *Pythium* C2 1a



F. graminearum misto D3 23a vs *Pythium* D3 9a *F. culmorum* sabbioso C1 20b vs *Pythium* C1 14a

Figura 4.2 Foto delle colture duali inoculate con il patogeno 48 h prima dell'antagonista. Le foto sono state effettuate dopo 96 h dall'inoculo dell'antagonista (48 h dopo il contatto tra le colonie).

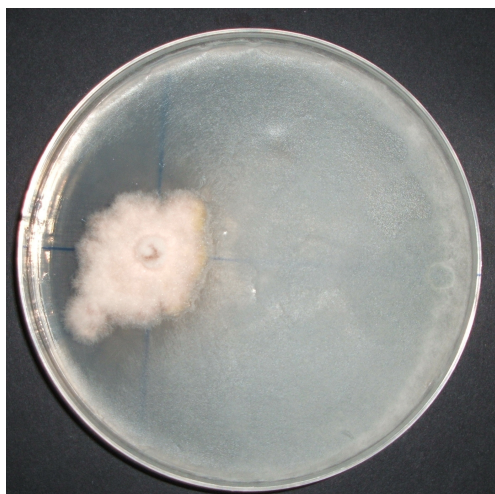
Dall'analisi visiva delle piastre delle colture duali inoculate con il patogeno 48 h prima dell'antagonista (fig. 4.2) è ben riconoscibile l'effetto inibitorio del *Pythium* nei confronti del *Fusarium*. 48 h dopo il contatto tra le due colonie è evidente il cordone d'inibizione (barrage) nel punto di contatto.

F. sezione Liseola sabbioso C3 8b mostra una diminuzione nella velocità di accrescimento del raggio R_{fp} , rispetto al R_c , quando si avvicina alla colonia del *Pythium*, con differenze apprezzabili solo all'ultimo rilievo.

Il periodo di incubazione delle piastre non è stato, invece, sufficiente per *F. culmorum* sabbioso C1 20b per mostrare un arresto della crescita nella direzione dell'antagonista. Come mostrato nel grafico, sebbene esiste un rallentamento verso *Pythium* su entrambi i substrati, la tendenza delle curve rimane quella di aumento lineare.

F. culmorum sabbioso D2 7a, *F. equiseti* misto C1 28a, *F. sez. Liseola* misto D1 15b non sembrano risentire dell'effetto del *Pythium*. I valori dei raggi nella direzione controllo e nella direzione dell'antagonista non sono differenti su entrambi i substrati.

Sebbene dai grafici relativi a *F. equiseti* argilloso D3 6a, il patogeno sembrerebbe non risentire dell'effetto inibitorio dei due isolati di *Pythium* testati, dall'analisi visiva delle piastre (figura 4.3) è evidente come la colonia del patogeno abbia subito un arresto della crescita e sia stata circondata dall'antagonista decisamente più veloce.



F. equiseti argilloso D3 6a vs *Pythium* D3 8a



F. equiseti argilloso D3 6a vs *Pythium* D3 25a

Figura 4.3 Foto delle piastre delle colture duali di *F. equiseti* argilloso D3 6a contro *Pythium* argilloso D3 8a e D3 25a. Le foto sono state scattate dopo 48 h dal contatto delle due colonie (96 h dopo l'inoculo dell'antagonista).

F. equiseti argilloso D1 7a mostra un andamento diverso a seconda dell'isolato antagonista utilizzato nelle colture duali. Contro *Pythium* argilloso D3 3b il patogeno mostra un andamento uguale dei raggi (R_{fp} e R_c) su PDA mentre su WA, dove la crescita del *Fusarium* è in generale più veloce, sembra subire un rallentamento in presenza dell'antagonista. Quando allevato in coltura duale con *Pythium* argilloso D1 6b, *F. equiseti* su WA cresce più velocemente che su PDA ma non dà segni di rallentamento dovuto alla presenza dell'antagonista. Particolare è il comportamento su PDA dove, il *Fusarium* ha una crescita minore nella direzione controllo rispetto a quella verso *Pythium*.

Anche l'unico isolato di *Trichoderma*, quando posto in coltura duale con *F. sez. Liseola* misto C2 22b, sembra inibire la crescita del patogeno sia su PDA che WA. I valori del raggio del *Fusarium* verso l'antagonista rimane comparabile con quello di controllo fino alle 48 h, per poi iniziare a distanziarsi fino ad essere differente dopo 72h.

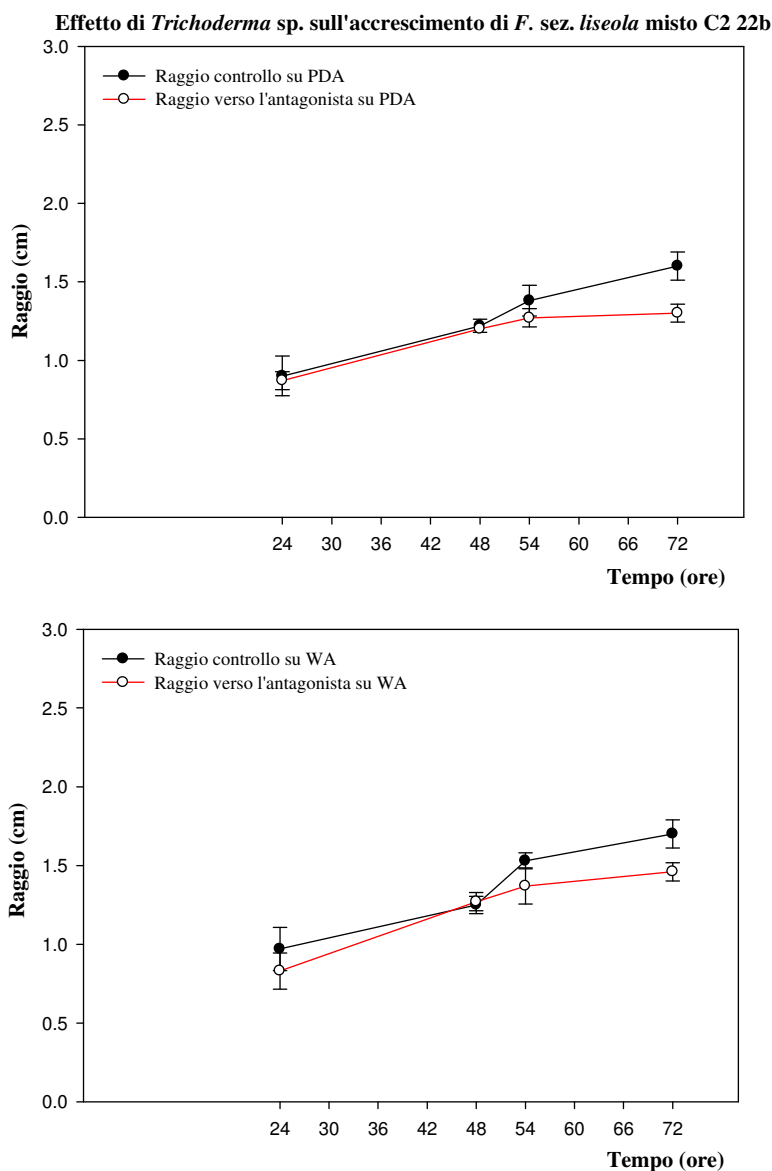


Figura 4.4 Grafici dell'accrescimento radiale di *F. sez. Liseola* in coltura duale con *Trichoderma* sp. su PDA e WA.

Come è possibile osservare nella foto riportata di seguito (fig. 4.5), la capacità di *Trichoderma* di crescere e sporulare sulla colonia di *Fusarium* è piuttosto evidente. Sull'intera superficie della colonia del patogeno sono visibili strutture miceliari aeree portanti conidi.

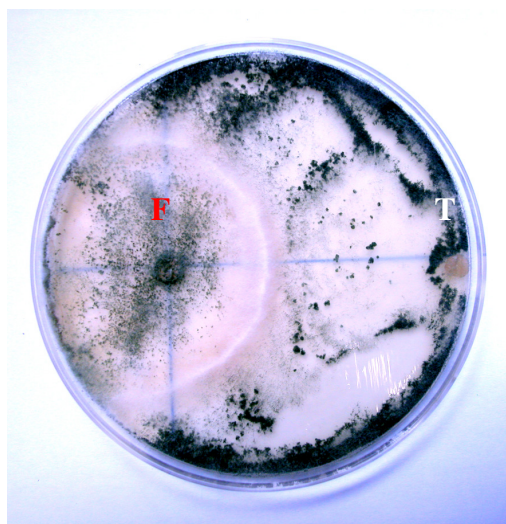


Figura 4.5 Foto di una piastra di *Trichoderma* sp (T) in coltura duale con *F. sez. Liseola* (F) su PDA.

4.4.2 Produzione di coilings

Dalle osservazioni effettuate al microscopio composto su vetrini contenenti porzioni di cellophane prelevate nel punto di contatto tra le colonie del patogeno e degli antagonisti (§ 3.6.2), è stato possibile osservare la formazione di avvolgimenti ifali e/o lacci da parte di diversi isolati di *Pythium*. In particolare, gli isolati di *Pythium* misto D1 15b e argilloso D1 6a, che dai dati di inibizione della crescita non avevano dato risultati evidenti, al microscopio si sono distinti per la capacità di formare coilings e corte ramificazioni o lacci (figure 4.6 e 4.7).



Figura 4.6 Coilings di *Pythium argilloso* D3 6a attorno ad un'ifa di *Fusarium*.

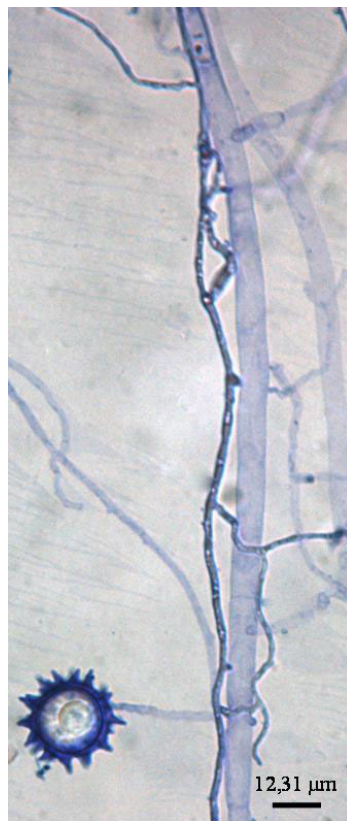


Figura 4.7 Lacci di *Pythium misto* D1 15a attorno ad un'ifa di *Fusarium*

Gli altri isolati di *Pythium*, mostratisi capaci di inibire la crescita del *Fusarium*, hanno evidenziato una maggiore capacità di micoparassitizzare i conidi (come descritto nel paragrafo seguente), rispetto alla capacità di produrre avvolgimenti ifali attorno le ife del patogeno.

4.4.3 Micoparassitismo dei macroconidi

Questa prova è stata condotta per saggiare la capacità degli isolati di *Pythium* di micoparassitizzare i macroconidi degli isolati di *Fusarium*. Dall'analisi al microscopio dei vetrini allestiti come descritto nel § 3.6.3 sono stati contati i numeri di oogoni presenti in 20 campi scelti a caso sia del controllo che delle piastre inoculate prima con la sospensione dei conidi e poi con i dischetti di *Pythium*, per testare l'effetto del parassitismo dei macroconidi sulla produzione di oogoni da parte dell'antagonista. Inoltre sugli stessi vetrini, per individuare la percentuale di conidi parassitizzati, sono stati contati "random" su un totale di 100 conidi, quanti si mostravano pieni e quanti erano svuotati del contenuto citoplasmatico.

In generale i risultati maggiormente apprezzabili sono stati ottenuti per gli isolati di *Pythium* sp. accoppiati con *F. graminearum* misto D3 23a, *F. culmorum* sabbioso C2 21a, *F. sez. Liseola* misto D2 24a, *F. sez. Liseola* misto C3 8b e *F. culmorum* sabbioso C1 20b, gli stessi che avevano subito una inibizione della crescita da parte di *Pythium* nelle prove di antagonismo in piastra.

Per quanto riguarda il numero di oogoni di *Pythium* è stata osservata una tendenza generale a differenziare una maggiore quantità di oogoni su substrato WA in presenza dei conidi di *Fusarium* rispetto al controllo non inoculato con *Fusarium*. I dati ottenuti dalla media

totale dei 20 campi per ognuna delle tre repliche esaminate, riportati nella tabella seguente, confermano quanto sopradetto.

<i>Pythium</i> sp vs:	N° di oogoni differenziati nel controllo non inoculato	N° di oogoni differenziati in presenza di conidi di <i>Fusarium</i>
<i>F. sez. Liseola</i> misto D2 24a	4.5 ± 1,767	11,66 ± 1.665
<i>F. graminearum</i> misto D3 23a	9.33 ± 2.419	15.76 ± 3.583
<i>F. culmorum</i> sabbioso C2 21a	3.05 ± 2.622	4.93 ± 2.187
<i>F. sez. Liseola</i> misto C3 8b	11.91 ± 2.218	17.23 ± 5.040
<i>F. culmorum</i> sabbioso C1 20b	7.46 ± 2.107	11.2 ± 0.589

Tabella 4.8 Calcolo della media totale del numero di oogoni presenti in 20 campi di 3 repliche differenti con le relative deviazioni standard per il controllo e per la prova in presenza di conidi di *Fusarium*.

Per quanto riguarda la percentuale di conidi parassitizzati (Tab 4.9), è stato calcolato che il numero medio (ottenuto mediando la somma di conidi vuoti o pieni ottenuta dalle 3 repliche) di conidi svuotati del contenuto citoplasmatico per tutti gli isolati di *Fusarium* sopra indicati è risultato essere superiore a quello dei conidi pieni. In particolare, l'isolato *F. sez. Liseola* misto C3 8b presentava l'80.0± 9.85% di conidi svuotati del tutto o solo parzialmente del contenuto citoplasmatico così come per l'isolato *F. graminearum* misto D3 23a, per il quale è stato calcolato il 69.33% ± 4.16 di conidi vuoti.

<i>Pythium</i> sp vs:	% conidi vuoti
<i>F. sez. Liseola</i> misto D2 24a	65.33 ± 12.86
<i>F. graminearum</i> misto D3 23a	69.33 ± 4.16
<i>F. culmorum</i> sabbioso C2 21a	61.33 ± 21.07
<i>F. sez. Liseola</i> misto C3 8b	80 ± 9.85
<i>F. culmorum</i> sabbioso C1 20b	56.33 ± 3.78

Tabella 4.9 Calcolo della percentuale media del numero di conidi svuotati del contenuto citoplasmatico con le relative deviazioni standard.

Di seguito sono riportate alcune foto effettuate al microscopio composto raffiguranti esempi di macroconidi parassitizzati.

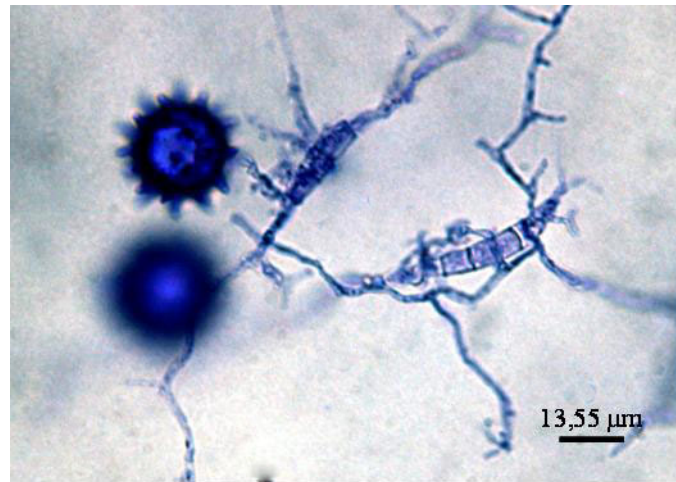


Figura 4.8 Conidi di *F. culmorum* sabbioso C1 20b avvolti dalle ife di *Pythium*.



Figura 4.9 Conidio di *F. graminearum* misto D3 23a completamente parassitizzato dalle ife di *Pythium* che lo hanno avvolto, penetrato e svuotato del contenuto citoplasmatico.



Figura 4.10 Visione d'insieme contenente conidi pieni e svuotati del tutto o parzialmente del contenuto citoplasmatico dell'isolato *F. graminearum* misto D3 23a.

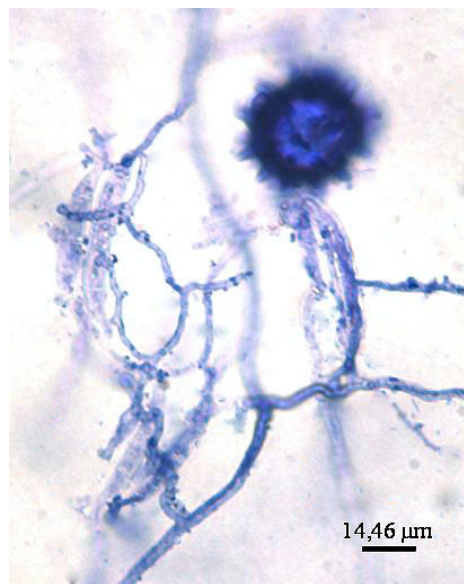


Figura 4.11 Conidi di *F. sez. Liseola* misto D2 24a avvolti e penetrati dalle ife di *Pythium*.

Infine, dalle osservazioni condotte sulle piastre di PDA seminate con la sospensione di macroconidi di *Fusarium* e inoculate con i cinque dischetti di *Pythium*, in alcuni casi è stata osservata la formazione di aloni di inibizione della crescita e sporulazione di *Fusarium* nell'intorno dei dischetti dell'antagonista. Nelle foto di seguito riportate è mostrato questo ulteriore aspetto di inibizione esercitato da *Pythium* misto D1 15a vs *F.* sezione *Liseola* misto D1 15b, *Pythium* misto D2 24a vs *F.* sezione *Liseola* D2 24a, *Pythium* misto D3 9a vs *F. graminearum* misto D3 23a, *Pythium* sabbioso D3 21a vs *F. graminearum* sabbioso D3 19b, *Pythium* sabbioso C1 14a vs *F. culmorum* C1 20b e, infine, *Pythium* sabbioso C2 1a vs *F. culmorum* C2 21a

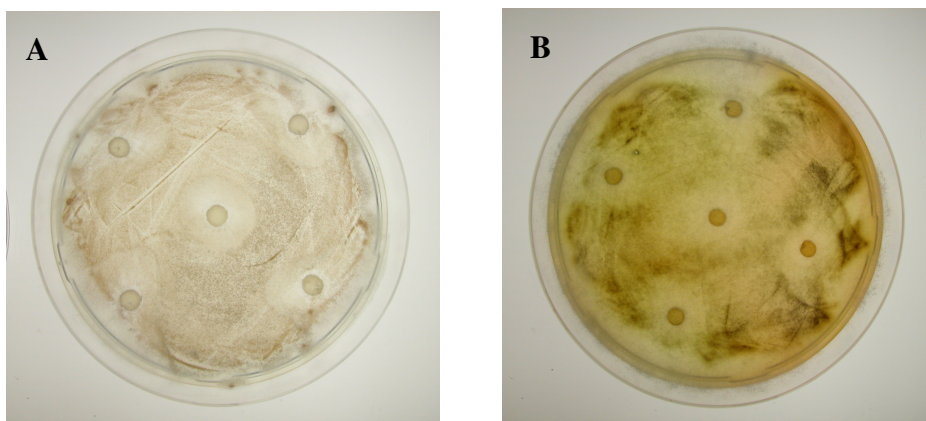


Figura 4.12 Inibizione di *F.* sezione *Liseola* misto D1 15b da parte di *Pythium* misto D1 15a (A) e di *F.* sezione *Liseola* D2 24a da parte di *Pythium* misto D2 24a (B).

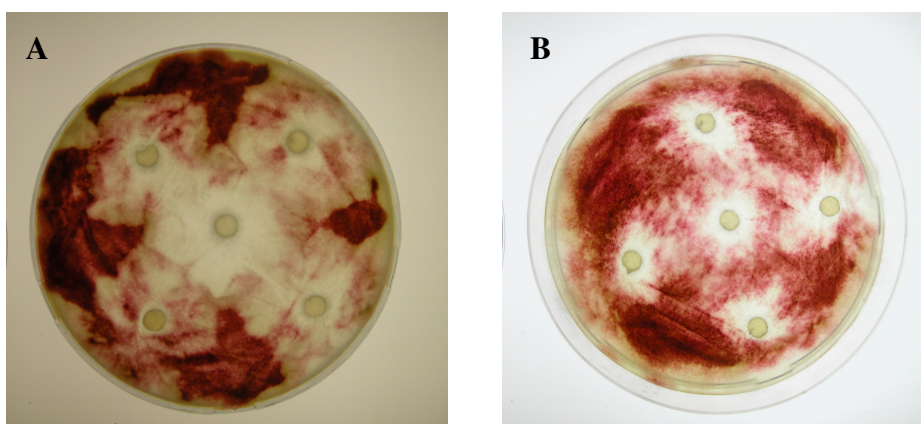


Figura 4.13 Inibizione di *F. graminearum* misto D3 23a da parte di *Pythium* misto D3 9a (A) di *F. graminearum* sabbioso D3 19b da parte *Pythium* sabbioso D3 21a (B).

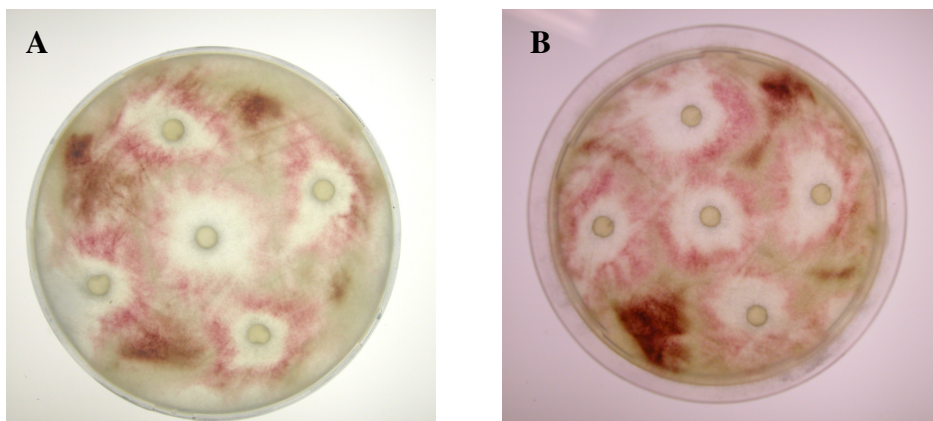


Figura 4.14. Inibizione di da parte di *F. culmorum* C2 21a da parte di *Pythium sabbioso* C2 1a (A) e di *F. culmorum* C1 20b da parte *Pythium sabbioso* C1 14a (B).

Infine, particolarmente interessante risulta essere il comportamento dell'unico isolato di *Pythium* non differenziante oogoni spinosi (misto C2 29a). Questo ceppo, ad accrescimento molto lento, non mostra nessuna attività di inibizione della crescita, antagonismo o micoparassitismo nei confronti di *F. culmorum* misto C2 25a utilizzato nelle colture duali. In modo particolare, come evidente in Fig. 4.15 dove è mostrato il confronto tra le piastre di PDA inoculate solo con i dischetti di *Pythium* e quelle inoculate con i dischetti dopo semina dei conidi di *Fusarium*, il patogeno sembra prendere il sopravvento della colonia, crescendo e sporulando sui dischetti di *Pythium*.

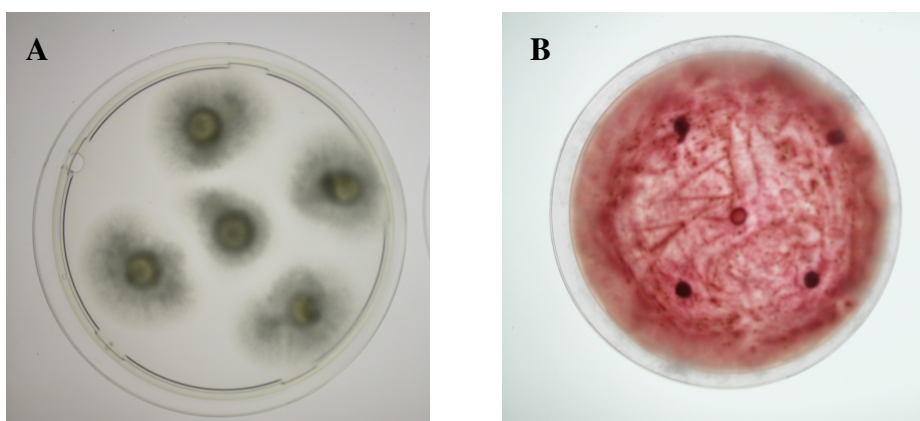


Figura 4.15 Accrescimento di *Pythium* misto C2 29a inoculato da solo su PDA (A) e su piastra precedentemente seminata con conidi di *F. culmorum* misto C2 25a (B).

5. DISCUSSIONE

In questi ultimi anni sempre maggiore attenzione è rivolta ai temi legati alla sicurezza alimentare, sia a livello nazionale che internazionale. La presenza di micotossine, in particolare di deossinivalenolo (DON), nel frumento e nei derivati, segnalata in varie indagini condotte nell'ambito di progetti europei ed internazionali, oltre a costituire un argomento prioritario in termini di sicurezza alimentare, rappresenta un importante problema di campo associato alla fusariosi della spiga (Campagna *et al.*, 2005). Le micotossine che con più frequenza sono ritrovate nel frumento, sia tenero che duro, sono prodotte dai funghi appartenenti al genere *Fusarium*, in particolare *F. graminearum* e *F. culmorum*, agenti causali della fusariosi della spiga e produttori di deossinivalenolo (DON). L'incidenza e la gravità della malattia e la frequenza e i livelli di contaminazione di DON nelle cariossidi dipendono da vari fattori tra cui la quantità di inoculo presente nei residui colturali del terreno (di cui la paglia ne è un'abbondante componente) e le condizioni climatiche (Pascale *et al.*, 2002).

Al di là dell'importanza economica e sanitaria delle micotossine, poco si sa circa il ruolo che questi metaboliti secondari giocano da un punto di vista ecologico. Sorge spontaneo chiedersi se il dispendio energetico affrontato da questi organismi per sintetizzare e rilasciare le micotossine possa trovare riscontro in un vantaggio competitivo da parte dei produttori nei confronti degli altri microrganismi, potenziali antagonisti o competitori. In alcuni lavori, sfortunatamente non molto recenti, riguardanti l'interazione tra diversi funghi micotossinogeni, si ipotizza che la differente quantità di micotossine prodotte da parte di due o più specie possa rappresentare un fattore competitivo (antagonismo chimico). La produzione di metaboliti secondari fungini potrebbe avere un significato ecologico poiché

potrebbe conferire una fitness migliore agli organismi produttori (Bruehl *et al.*, 1972; Park, 1960; Reid *et al.*, 1999). In conformità a queste premesse, la prova principale condotta all'interno di questa tesi è stata incentrata sulla valutazione dell'effetto del DON, presente sui residui colturali di frumento (porzioni di paglia trattate e non trattate con la micotossina e interrate in tre diversi terreni coltivati a frumento), sulla competizione per la paglia da parte di funghi filamentosi tellurici. I dati ottenuti non hanno evidenziato nessun effetto della micotossina sulla diversità del micobiota recuperato in fase di isolamento ed identificazione, il che lascia ipotizzare a una mancanza di ruolo ecologico del DON, a giustificare l'attuale scarsa disponibilità di lavori consultabili circa l'argomento oppure la non adeguatezza della metodologia impiegata per studiare il fenomeno. Prendendo in considerazione il protocollo da noi seguito, un fattore limitante la esatta valutazione del potenziale ruolo del DON nella colonizzazione della paglia, potrebbe essere rappresentato dalla durata della prova. L'interramento delle esche trattate e non trattate con la micotossina, durato 7 giorni, potrebbe essere insufficiente per determinare una selezione dei miceti colonizzatori, ma, d'altra parte, un'incubazione lunga potrebbe non garantire la stabilità della molecola che, come è noto, può essere soggetta ad alterazioni strutturali inficianti la tossicità, da parte di batteri e funghi indigeni del terreno (Shima *et al.*, 1997; Karlovsky, 1999).

La diversità delle specie e dei generi recuperati dai pezzetti di paglia non sembra essere particolarmente ampia, nonostante nel precedente test di valutazione dei funghi indigeni presenti negli stessi terreni, fossero rappresentati alcuni generi in seguito non recuperati dalle esche. Generi come *Penicillium*, *Verticillium* e *Alternaria*, normalmente presenti in abbondanza in terreni naturali e coltivati (Domsch *et al.*, 1980), isolati nella prima prova, non sono stati ritrovati nel successivo test di colonizzazione della paglia,

indipendentemente dalla presenza o assenza di DON. Invece, il genere più rappresentato, sia nei terreni prima della prova che dagli isolamenti su paglia, è risultato essere *Fusarium*. La composizione della popolazione microbica che colonizza il materiale vegetale in decomposizione (Bryehl e Lai, 1966; Frankland, 1981) è oggetto di studi da molti anni, e sono a disposizione informazioni riguardanti la composizione del microbiota presente sulla paglia in decomposizione. Già nel 1985, Harper and Lynch indicarono *Fusarium* spp., insieme a *Trichoderma* spp. e *Chaetomium* spp. come i maggiori responsabili della degradazione dei residui della coltivazione del frumento.

Andando a verificare attentamente i generi fungini da noi recuperati dai pezzetti di paglia, è possibile notare come si tratti per lo più di miceti ad accrescimento piuttosto veloce. Il tipo di protocollo utilizzato, probabilmente non è esaustivo per avere un quadro generale del microbiota che effettivamente colonizza la paglia. L'isolamento su un mezzo povero, quale l'agar-acqua da noi utilizzato, favorisce un rapido accrescimento delle colonie, il che non ha permesso tempi di incubazione maggiori che avrebbero potuto favorire il recupero di isolati ad accrescimento più lento. Per isolare e mettere in coltura l'intera gamma di funghi colonizzatori sarebbe necessario l'uso di substrati speciali designati per selezionare anche i taxa più difficili, caratterizzati da una crescita lenta o stentata (Mueller *et al.*, 2004). Altrettanto importante al fine del completamento dell'inventario dei funghi isolati è l'identificazione dei miceli sterili, abbondantemente recuperati nelle nostre prove, nonché il campionamento di tutti quegli individui definiti non colturabili. Nel primo caso, poco efficaci si sono dimostrati i vari tentativi di indurre la sporulazione attraverso esposizione a fonti di luce diverse (Leach 1961, 1963) e allevando gli isolati in presenza di differenti fonti nutritive (Wang e Wilcox, 1985; Petrini, 1986). Un approccio utile per l'identificazione dei miceli non sporulanti è rappresentato dall'impiego di tecniche

molecolari che prevedono l'amplificazione e il sequenziamento di particolari geni, tra cui quelli appartenenti al cluster genico del rDNA, particolarmente la regione ITS, oppure attraverso un approccio multigenico (Lord *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2003). Per quanto riguarda l'insieme di individui definiti non colturabili ma associati al substrato paglia, di aiuto potrebbe essere l'impiego di tecniche molecolari di fingerprinting, quali la DGGE (elettroforesi su gel in gradiente di denaturazione) o la TGGE (elettroforesi su gel in gradiente di temperatura), di recente adottate e applicate allo studio di comunità fungine (Kennedy e Clipson, 2003; Osor-Sichler *et al.*, 2006).

Negli anni passati uno sforzo rilevante è stato compiuto per lo sviluppo e l'uso di fungicidi in grado di controllare le specie di *Fusarium* patogene al fine di prevenire le infezioni e la produzione di micotossine. Un numero consistente di prove è stato allestito con numerosi fungicidi sistemici per controllare *Fusarium* spp. su cereali, in particolare frumento, laddove la contaminazione naturale con deossinivalnolo e nivalenolo era stata registrata a livelli preoccupanti. Già nel 1990, Snijders and Perowski dimostrarono una relazione diretta tra la naturale incidenza della fusariosi della spiga e un accumulo di DON su granella di frumento. I risultati ottenuti testando un ampio range di fungicidi hanno portato alla conclusione che, in alcuni casi, sebbene capaci di controllare la malattia, questi composti determinano un incremento del livello di DON (Magan *et al.* 2002; Mathies e Buchenauer, 1996). E' noto, infatti, che funghi saprofiti e patogeni minori, conosciuti anche per la loro maggiore sensibilità ai fungicidi, possono contribuire alla soppressione di alcune specie patogene, attraverso la competizione per i nutrienti disponibili e per lo spazio (Liggitt *et al.*, 1997). Un antagonismo di questo tipo è stato osservato tra specie di *Fusarium* e *Microdochium bollesi* (Reinecke *et al.*, 1979), così come è emersa una correlazione tra alti livelli di un isolato saprofita di *Alternaria alternata* e un abbassamento

di livelli nell'accumulo di DON in pieno campo (Gonzalez *et al.*, 1999). Tali scoperte potrebbero suggerire che la rimozione di funghi non produttori di tossine dalle piante coltivate attraverso l'impiego di fungicidi potrebbe risultare in una mancanza di competizione e, quindi, in uno stabile incremento di patogeni produttori di micotossine che risultano essere meno sensibili ai fungicidi (Simpson *et al.*, 2001). Recentemente sono stati condotti alcuni studi volti a testare un range di microrganismi potenziali antagonisti di isolati di *Fusarium* spp. patogeni di diversi cereali tra cui il frumento (Dawson *et al.*, 2002a 2002b; Aldred e Magan, 2004). Questi sono risultati essere in grado di diminuire la sporulazione di diverse specie di *Fusarium* su cereali e contenere, in maniera significativa, la produzione e l'accumulo del DON.

I risultati ottenuti dalla prove condotte nella prima parte del lavoro sperimentale, come già descritto, suggeriscono che nella comunità fungina che colonizza la paglia esistano funghi che non risentono della presenza della micotossina di cui, al contrario, è ben nota la tossicità verso gli eucarioti. Questo suggerisce che funghi saprofiti di origine tellurica siano in grado di vivere anche in presenza di deossinivalenolo, ignorandone la presenza o detossificando e/o degradando la molecola (Karlovsky, 1999). In modo particolare, alla luce dell'abbondante presenza di isolati di *Pythium* risultante come il secondo genere più frequentemente isolato (di cui un ampio numero è composto da ceppi in grado di differenziare oogoni spinosi e quindi probabilmente ascrivibile a specie a nota attività micoparassitaria e antagonistica) la seconda parte dell'attività sperimentale è stata concentrata sulla valutazione dell'attività micoparassitaria di questi isolati nei confronti di ceppi di *Fusarium* spp. scelti tra quelli potenzialmente patogeni del frumento e produttori di DON.

Il genere *Pythium*, e in particolare la specie *P. oligandrum* è da tempo noto per la sua capacità di antagonizzare e micoparassitizzare numerose specie fungine fitopatogene (Brozova, 2002). Di particolare interesse per il nostro lavoro è la capacità di agire nei confronti della sporulazione di alcuni patogeni delle piante, come *F. culmorum*. E' stata dimostrata una significativa correlazione tra la formazione di zoospore di *P. oligandrum* e la degradazione dei conidi di *Fusarium*. Il contatto casuale tra le ife del micoparassita e quelle dell'ospite è seguito da un blocco della crescita del patogeno, lisi, vacuolizzazione e coagulazione del citoplasma, penetrazione e crescita del micoparassita all'interno delle ife attaccate. Il parassitismo dei conidi si esplica, inoltre, in una rapida perdita del contenuto citoplasmatico, seguito dalla degradazione della parete cellulare (Hocknehull *et al.*, 1995). Quanto descritto, è stato osservato in numerosi accoppiamenti allestiti nelle nostre prove. Questo risultato lascia aperta la concreta possibilità di proseguire con la sperimentazione e sviluppare, in seguito, uno o più dei nostri isolati di *Pythium* (dopo la loro assegnazione a livello di specie) per la lotta a *F. culmorum* e *F. graminearum*, quale strategia nel contenimento della malattia su frumento e dell'accumulo conseguente di micotossine sulle cariossidi. Già dal 1994, infatti, prima nella Repubblica Ceca e ora diffusa nel mondo, la preparazione commerciale biologica conosciuta come Polygandron® è impiegata nella lotta a numerosi patogeni vegetali tra cui *R. solani* e *S. sclerotiorum* e ha dimostrato un'efficacia comparabile con quella del Thiram (Velsely *et al.*, 1989; Velsely, 1991; Velsely e Koubova, 1993). Il biofungicida, contiene oospore di *P. oligandrum* ed è commercializzato per il trattamento di semi e plantule contro patogeni delle orticole e contro il "damping-off" del frumento.

I risultati sin qui ottenuti rappresentano solo la prima e preliminare fase di studi che andranno approfonditi proseguendo l'indagine ecologica attraverso uno studio molecolare

dell'intera comunità fungina associata alla paglia in presenza di DON e la messa a punto di un protocollo in cui il fattore tempo e il tipo di terreno utilizzato verranno valutati attentamente per stimare l'effetto ecologico della micotossina. In parallelo, notevole attenzione dovrà essere rivolta a quei funghi che sono stati capaci di competere per la colonizzazione della paglia anche in presenza di deossinivalenolo, al fine di valutare il meccanismo d'azione che può aver contribuito alla mancanza di effetti della micotossina. Infine, potrà essere approfondito lo studio dell'attività di micoparassitismo e antibiosi degli isolati di *Pythium* quale strategia di contenimento delle fusariosi della spiga di frumento, volta ad assicurare una maggiore qualità e sicurezza alimentare nella prevenzione di contaminazioni da micotossine.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aldred D., Magan N. (2004) Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology letters* 153: 165-171.
- Anderson I.C., Cairney J.W. (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 6 (8): 769-779.
- Anderson I.C., Campbell C.D., Prosser J.I. (2003a) Diversity of fungi in organic soils under a moorland-Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. *Environmental Microbiology* 5: 1121-1132.
- Anderson I.C., Campbell C.D., Prosser J.I. (2003b) Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology* 5: 36-47.
- Anderson J.M., Swift J.M. (1983) Decomposition in tropical forests. In: S.L. Sutton, T.C. Whitmore and A.C. Chedwick (eds.) *Tropical Rain Forest: Ecology and Management*. Pp 287-309 Blackwell Scientific, Oxford, England.
- Andrews J.H. (1992) Fungal life-history strategies. In: G.C. Carrol and D.T. Wicklow (eds.) *The Fungal Community: Its organization and Role in the Ecosystem*. 2nd ed. Marcel Dekker, New York.
- Balmas V., Vitale S., Marcello A., Corazza L. (2000) Fusariosi della spiga. Supplemento a *L'Informatore Agrario* 56 (16): 35, 27-29.
- Bandoni R.J. (1981) Aquatic hyphomycetes from terrestrial litter. In: D.T. Wicklow and G.C. Carrol (eds.) *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem* Vol 2. Pp 693-708 Marcel Dekker, New York.
- Barret J. (1987) Molecular variation and evolution. In: A.D.M. Rayner, C.M. Brasier and D. Moore (eds.) *Evolutionary Biology of the Fungi*. Pp 83-95 Cambridge University Press., Cambridge, England.
- Beasley V.R. (1989) Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Beeton S., Bull A.T. (1989) Biotransformation and detoxification of T-2 toxin by soil and freshwater bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 190-197.
- Bell, D.K., Wells, H.D., Markham, C.R. (1982) In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72(4): 379-382.
- Bilgrami K.S.(1987) Fungal toxins: their biological effects and ecological significance. Presidential address, Proceedings of 74th Indian Science Congress, Part II, Bangalore, India, p.1.
- Bills G.F., Christensen M., Powell M., Thorn G. (2004) Saprobic soil Fungi. In: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds.) *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier, Academic Press.
- Bills G.F., Peláez F. (1996) Endophytic isolates of *Creosphaeria sassafras*. *Mycotaxon* 57: 471-477.
- Boller R. A., Schroeder H.W. (1973) Influence of *Aspergillus chevalieri* on production of aflatoxins in rice by *Aspergillus Parasiticus*. *Phytopathology*, 63: 1507
- Boller R.A., Schroeder H.W. (1974) Influence of *Aspergillus candidus* on production of aflatoxins in rice by *Aspergillus Parasiticus*. *Phytopathology*, 64:121
- Booth C. (1971) *Methods in microbiology*. Pp. 795. Eds. Norris J.R. and Ribbons D.W., academic Press, London and New York.
- Booth T. (1971) Distribution of certain soil inhabiting chytrid and chytridiaceous species related to some physical and chemical factors. *Canadian Journal of Botany* 49: 1743-1755.
- Borneman J., Hartin R.J. (2000) PCR primers that amplify fungal rRNA genes from

- environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4356-4360.
- Bottalico A., (2002) Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali. *Informatore fitopatologico- Speciale Micotossine- 12* : 10-16.
- Bottalico A., Perrone G. (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 611–624.
- Brozova J. (2002) Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Prot. Sc.* 38(1): 29-35.
- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H., Desjardins A.E. (2001) A Genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 32: 121–133.
- Bruhl G.W., Lai P. (1966) Prior-colonization as a factor in the saprophytic survival of several fungi in wheat straw. *Phytopathology* 56:766-768.
- Bruhl G.W., Cunfer B. and M. Toivanen (1972) Influence of water potential on growth, antibiotic production, and survival of *Cephalosporium gramineum*. *Can. J. Plant Sci.* 52:417-423.
- Campagna C., Haidukowski M., Pancaldi D., Pascale M., Ravaglia S., Silvestri M., Visconti A., (2005) Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento. *L'Informatore Agrario* 1: 39-47.
- Carreiro M.M., Koske R.E. (1992) Room temperature isolations can bias against selection of low temperature microfungi in temperate forest soils. *Mycologia* 84: 886-900.
- Cooke R.C., Rayner A.D.M. (1984) Ecology of Saprotrophic Fungi. Longman, London, England
- Cooney J.M., Lauren D. R., di Menna M. E. (2001) Impact of Competitive Fungi on Trichothecene Production by *Fusarium graminearum*. *J. Agric. Food Chem.* 49: 522-526.
- Cuero R., Smith J.E., Lacey J. (1988) Mycotoxin formation by *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* in irradiated maize grains in the presence of other fungi. *Journal of Food Protection* 51: 452-456.
- Cundliffe E., Davies J.E. (1977) Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:491-499.
- Davanlou M., Madsen A.M., Madsen C.H., Hockenhull J. (1999) Parasitism of macroconidia, chlamydospores and hyphae of *Fusarium culmorum* by mycoparasitic *Pythium* species. *Plant Pathology* 48: 352-359.
- Dawson W.A.J.M., Bateman G.L., Jestoi G.L., Rizzo M. (2002a) Biological control of ear blight of wheat caused by *Fusarium culmorum*. *J. appl. Genet.* 43: 217-222.
- Dawson W.A.J.M., Bateman G.L., Kohl J, Haas B.H., de Lombaers-Vander Plas C.H., Corazza L., Luongo L., Galli M., Jestoi M., Rizzo A. (2002b) Controlling infection of cereal grain by toxigenic *Fusarium* species using fungal competition. *Brighton Crop Prot. Conf. 2002 – Pest Dis.* 1: 347-352.
- Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P. (1992) Effect of gene disruption of trichodiene synthase on the virulence of *Gibberella pulicaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:214-222.
- Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P. (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological Reviews* 57: 595–604.
- Desjardins A. E., Proctor R.H., Bai G., McCormick S.P., Shaner G., Buechley G., Hohn T.M. (1996) Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 9: 775-781.
- Desjardins A. E., Hohn T.M. (1997) Mycotoxins in plant pathogenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 147-152.
- Dix N.J., Webster J. (1995) Fungal Ecology. Chapman Hall, London, England.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. (1980) Compendium of Soil Fungi. *Academic Press* (London)
- van Elsas J.D., Duarte G.F., Keijzer-Wolters A., Smit E. (2000) Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of

- soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 43: 133-151.
- Etzel R.A. (2000) The "fatal four" indoor air pollutants. *Pediatr. Ann.*:29, 344_350.
- FAO/WHO, (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Fifty sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), FAO Food and Nutrition Paper 74, WHO Food Additives Series 47, WHO, Geneva, Switzerland, pp. 419-555.
- Feinberg B., McLaughlin C.S. (1989) Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: Beasley, V.R. (Ed.), *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological Effects*. CRC Press, Boca Raton, FL: 27-35.
- Frankland J.C. (1981) Mechanism in fungal succession. pp.403-426 in: D.T.Wicklow and G.C. Carroll. (eds.) *The fungal community: its organisation and role in the ecosystem* New York (USA) Marcel Dekker Inc.
- Fromin N., Hamelin J., Tarnawski S., Roesti D., Jourdain-Miserez K., Forestier N., (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4: 634-643.
- Gambogi, P., Durante, G. (1985) Micoparassitismo in vitro di funghi isolati da terreno forestale di San Rossore. Nota preliminare. *Atti Società Toscana di Scienze Naturali, Memorie* vol. XCII: 177-189.
- Gardes M., Bruns T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Gonzalez H.H.L., Martinez E.J., Pacin A., Resnik S.L. (1999) Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol on argentinian durum wheat. *Mycopathologia* 144: 97-102.
- Grime J.P. (1977) Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalists* 111: 1169-1194.
- Grime J.P. (1979) Plant Strategies and Vegetation Process. John Wiley, Chichester, England.
- Harper S.H.T., Lynch J.M. (1985) Colonization and decomposition of straw by fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 85: 655-661.
- Harris L.J., Desjardins A.E., Plattner R. D., Nicholson P., Butler G., Young J.C., Weston G., Proctor R.H., Hohn T.M. (1999) Possible Role of Trichothecene Mycotoxins in Virulence of *Fusarium graminearum* on Maize. *Plant Disease* (83) 10: 954-960.
- Hawksworth D.L, Minter D.W., Kinsey G.C., Cannon P.F. (1998) Inventorying a tropical fungal biota: intensive and extensive approaches. In: K.K. Janardhanan, C. Rajendran, K. Natarajan and D.L. Hawksworth (eds.) *Tropical Micology* Pp 29-50 Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
- Hockenhull J., Madsen A.M., Davanlou M. (1995) Fungal parasitic *Pythium* species ecology, mode of action and potential utilization. SP Raport State 4: 37-46.
- Hohn T.M., McCormick S.P., Desjardins A.E. (1993) Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Current Genetics* 24: 291-295.
- Hohn T.M., Beremand P. (1989) Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 79: 131-138.
- Hope R., Magan N. (2003) Two-dimensional enviromental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 1-5.
- Jesenska Z., Sajbidorova I. (1991) T-2 toxin degradation by micromycetes. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 35: 41-49.
- Karlovsky P. (1999) Biological Detoxification of Fungal Toxins and its Use in Plant Breeding, Feed and Food production. *Natural Toxins* 7: 1-23
- Keller N.P., Hohn T.M. (1997) Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 21: 17-29.

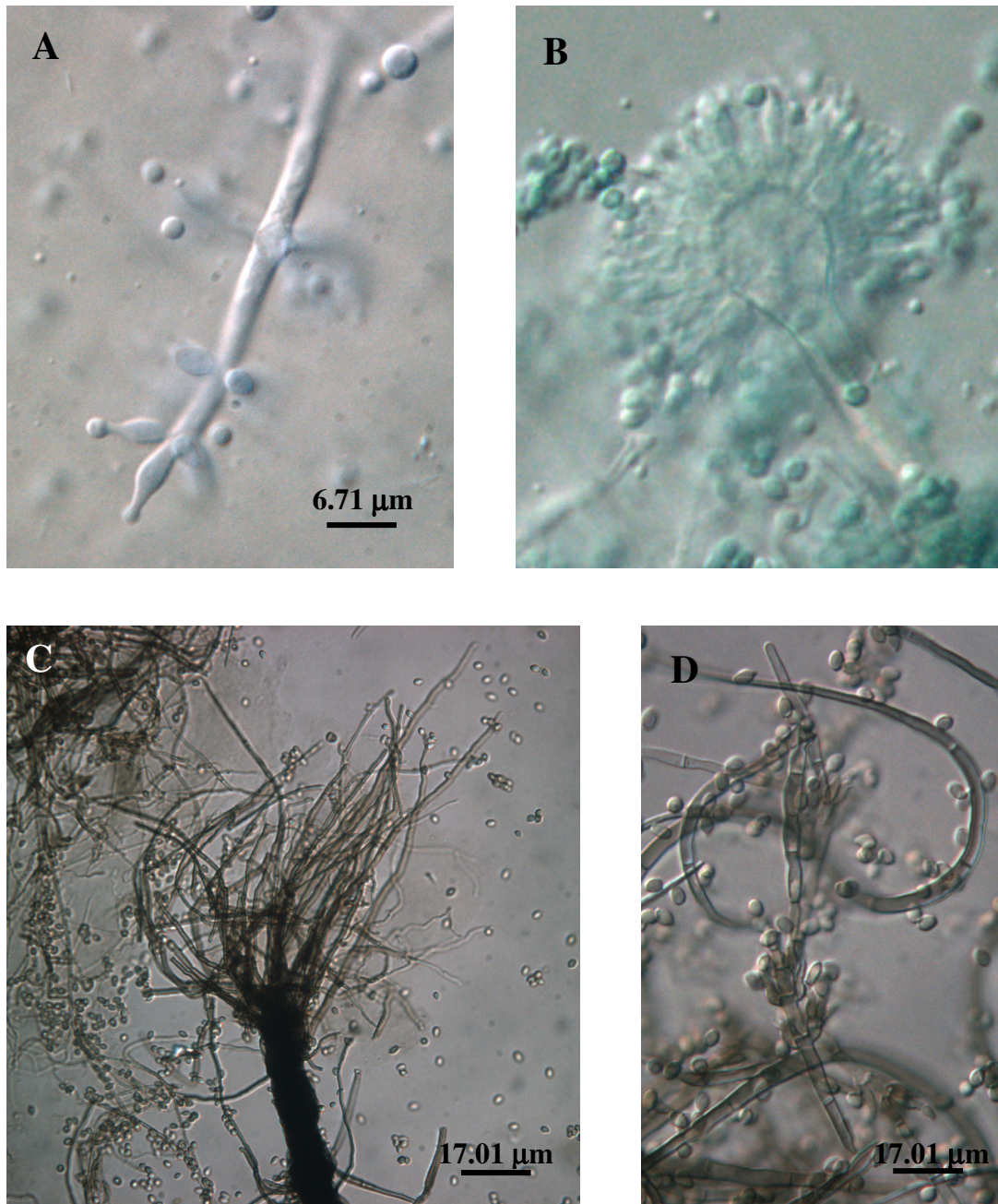
- Kennedy N., Clipson N. (2003) Fingerprinting the fungal community. *Mycologist* 17(4):158-164.
- Krishna S., Bilgrami K.K. (1992) Aflatoxins: their biological effects and ecological significance in Mycotoxins in Ecological Systems, *Handbook of Applied Mycology* Vol. 5
- Larena I., Salazar O., González V., Julián M.C., Rubio V. (1999) Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology* 75: 187-194.
- Leach C.M. (1961) The sporulation of *Helmithosporium oryzae* as affected exposure to near ultraviolet radiation and dark periods. *Can. J. Bot.* 39:706-715.
- Leach C.M. (1963) The qualitative and quantitative relationship of monochromatic radiation to sexual and asexual reproduction of *Pleospora erbarum*. *Mycologia* 55:151-163.
- Liggitt J., Jenkinson P., D.W. Parry (1997) The role of saprophytic microflora in the development of *Fusarium* ear blight of winter wheat caused by *Fusarium culmorum*. *Crop protection* 16: 679-68.
- Lord N.S., Kaplan C.W., Shank P., Kitts C.L., Elrod S.L. (2002) Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 85-92.
- Magan N., Hope R., Colleate A., Baxter E.S. (2002) Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* 108: 685-690.
- Magan N., Hope R., Cairns V., Aldred D. (2003) Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology* 109: 723-730.
- Mathies A., Buchenauer H. (1996) Investigation of the action of different active ingredients on the biosynthesis of mycotoxins in *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. In: Lyr H., Russell P.E. and Sisler H.D. (eds) *Modern fungicides and antifungal compounds* Pp. 199-204. Intercept Ltd., Andover.
- Mayr E. (1978) Evolution and Diversity of life, Harvard Univ. Press., Cambridge, Mass., p. 836.
- McCormick S.P., Hohn T.M., Desjardins A.E. (1996) Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-Oacetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 353-359.
- Miedaner T., Schilling A.G., Hartwig H.G. (2004) Competition effects among isolates of *Fusarium culmorum* differing in aggressiveness and mycotoxin production on heads of winter rye. *European Journal of Plant Pathology* 110: 63-70.
- Moretti A., Corazza L., Balmas V., Santori A., Ritieni A. (2002) Funghi tossigeni e micotossine: filiera cerealicola. *Informatore fitopatologico-Speciale Micotossine*- 12 :17-22.
- Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. (2004) Biodiversity of fungi: inventorying and monitoring methods. Pp. 777. Elsevier Academic Press (USA).
- Mullis K., Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Nielsen K.F., Thran U. (2001) Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 929: 75-87.
- Novotny W.E., Dixit A. (2000) Pulmonary hemorrhage in an infant following 2 weeks of fungal exposure. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 154: 271-275.
- Osor-Sichler M., Gomes N.C.M., Neuber G. Ad Smalla K. (2006) A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil communities. *J. Microbiol. Meth.* 65:63-75.
- Park, D. (1960) Antagonism- the background to soil fungi. Pp 148-159. In: D. arkinson and .S. Waid (eds.) *The ecology of soil fungi*. Liverpool University Press, Liverpool, United Kingdom.
- Pascale M., Bottalico A., Panali D., Perone G., A. Visconti (2002) Occurrence of deoxynivalenol in cereals from experimental fields in different italian region. *Petria*. 12(1/2):123-129.
- Pasricha R., Kumar R.N., Mukerji K.G. (1994) Effect of water stress on growth and sporulation

- of coprophilous fungi. *Nova Hedwigia* 59: 157-162.
- Petrini O. (1986) Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissue. Pp. 175-187. In N.J. Fokkema and J. van den heuvel (eds.), *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Petrini O., Hake U., Dreyfuss M.M. (1990) An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. *Mycologia* 82: 444-451.
- Petrini O., Petrini L.E., Dreyfuss M.M. (1992b) Psychrophilic deuteromycetes from alpine habitats. *Mycologia Helvetica* 5: 9-20.
- Proctor R.H., Desjardins A.E., McCormick S.P., Plattner R.D., Alexander N.J., Brown D.W. (2002) Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 691-698.
- Pugh G.J.F. (1980) Strategies in fungal ecology. *Transactions of the British Mycological Society* 75: 1-14.
- Pugh G.J.F., Boddy L. (1988) A view of disturbance and life strategies in fungi. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 94B: 3-11.
- Ramakrishna N., Lacey J., Smith J.E. (1996) The effects of fungal competition on colonization of barley grain by *Fusarium sporotrichioides* on T-2 toxin formation. *Food Additives and Contaminants* 8: 939-948.
- Reid L.M., Nicol R.W., Ouellet T., Savard M., Miller J.D., Young J.C., Stewart D.W., Schaafsma A.W. (1999) Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. Moniliforme* in maize ears: Disease progress, fungal biomass, and Mycotoxin accumulation. *Phytopathology*, 89: 1028-1037.
- Reinecke P., Duben J., Fehrmann H. (1979) Antagonism between fungi of the foot rot complex of cereals. In: Schippers B. and Gams W. (eds.) *Soil-borne plant pathogens* Pp. 327-336. Academic Press, London.
- Rotter B.A., Prelusky D.B., Pestka J.J. (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 1-34. V.R.
- Royle, D. J., Ries, S. M. (1978). The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 68: 603-607.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Schothorst R., van Egmond H. (2004) Critical assessment of trichothecene exposure-report from the SCOOP project. *Toxicol. Lett.* (present issue).
- Shima J., Takase S., Takahashi Y., Iwai Y., Fujimoto H., Yamazaki M., Ochi K. (1997) Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3825-3830.
- Simpson D.R., Weston G.E., Turner J.A., Jennings P., Nicholson P. (2001) Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *Europ. J. plant Pathol.* 107: 421-431.
- Singleton L.L., Mihail J.D., Rush C.M. (eds.) (1992) *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota.
- Smit E., Leeftang P., Glandorf B., van Elsas J.D., Wernars K. (1999) Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2614-2621.
- Snijders C.H.A., Perowski J. (1990) Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathol.* 80: 566-570.
- Stephen J.R., Kowalchuk G.A., Bruns M.-A.V., McCaig A.E., Phillips C.J., Embley T.M., Prosser J.I. (1998) Analysis of γ -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis and hierarchical phylogenetic probing. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2958-2965.

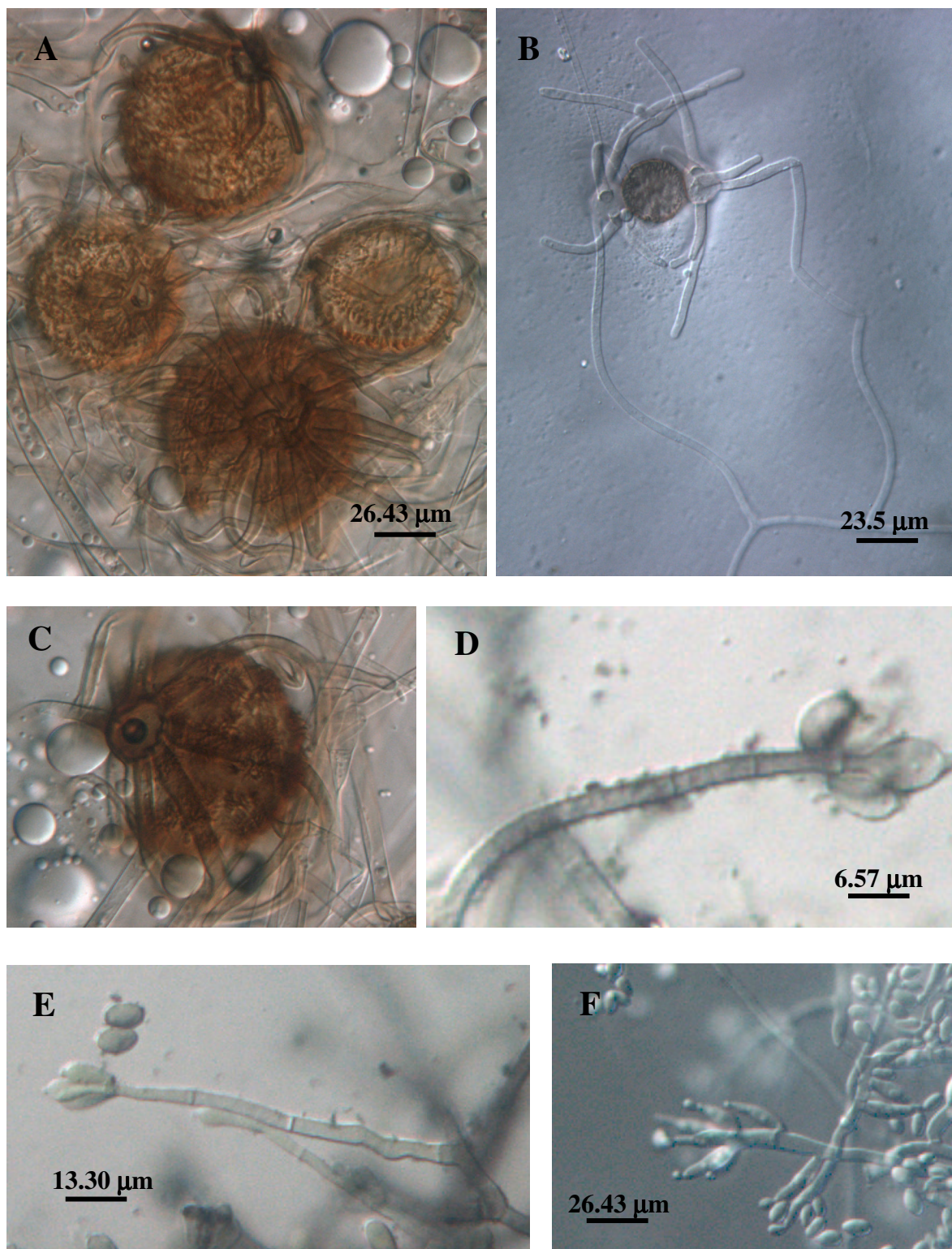
- Sudakin D.L. (2003) Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143: 97-107.
- Tuite J. (1969) Plant Pathological Methods. Burgess, Minneapolis, Minnesota.
- Ueno Y. (1977) Mycotoxins in Human and Animal Health. In: Rodricks J.V., Hesseltine C.W., Mehlman M.A., (Eds.) *Pathotox Publ. IL*: 189-228.
- Ueno Y. (1983) Trichothecenes; Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Developments in *Food Science*, Elsevier, New York.
- Vainio E.J., Hantula J. (2000) Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 104: 927-936.
- Velsely D. (1991) Influence of *Pythium oligandrum* on root health of winter wheat. In: XII Czechoslov. *Plant Prot. Conf.* 249.
- Vesely D., Koubova D. (1993) The effect of *Pythium oligandrum* on the health condition of winter wheat roots. *Protect. Sc.* 29(3): 193-202.
- Velsely D., Vancura V., Kunc F. (1989) Biological control of damping-off pathogens by treating sugar-beet seed with a powdery preparation of the mycoparasitic *Pythium oligandrum* in large scale field trial. In: Interrelationship between microorganisms and plant in soil. In: *Proc. Int. Symp. Liblice, Czechoslovakia*: 445-449. *Develop. Sc. Soil Sci.* 18.
- Visconti A., Chelkowski J., Bottalico A. (1986) Deoxynivalenol and 3-acetyl deoxynivalenol associated with wheat head fusariosis in Poland. *Mycotoxin Res.* 2: 59-64.
- Visconti A. (2001) Problems associated with *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Bull. Inst. Comprehensive Agri. Sci. Kinki Univ.* 9: 39-55.
- Wang C.J.K. and H.E. Wilcox (1985) New species of ectendomycorrhizal and pseudomycorrhizal fungi: *Phialocephala finlandia*, *Chloridium paucisporum* and *Phialocephala fortinii*. *Mycologia* 77:951-958.
- Webster J. (1957) Succession of fungi on decaying cocksfoot culms II. *Journal of Ecology* 45: 1-30.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J. (1990) Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.) *PCR protocols: a Guide to Methods and Applications* Pp 315-322 Academic Press, New York.
- Wicklow D.T. (1981) Interference competition and the organization of fungal communities. In: Wicklow DR and Carrol GC (eds) *The fungal Community*, Pp: 551-375 Marcel Dekker Inc., New York.
- Wicklow D.T., Hesseltine C.W., Shotwell O.C., Adams G.L. (1980) Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology*, 70: 761.
- World Health Organization, I.P.C.S. (1990) Trichothecenes. In: *Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot.* World Health Organization, Geneva.

7. APPENDICE

Tavola I

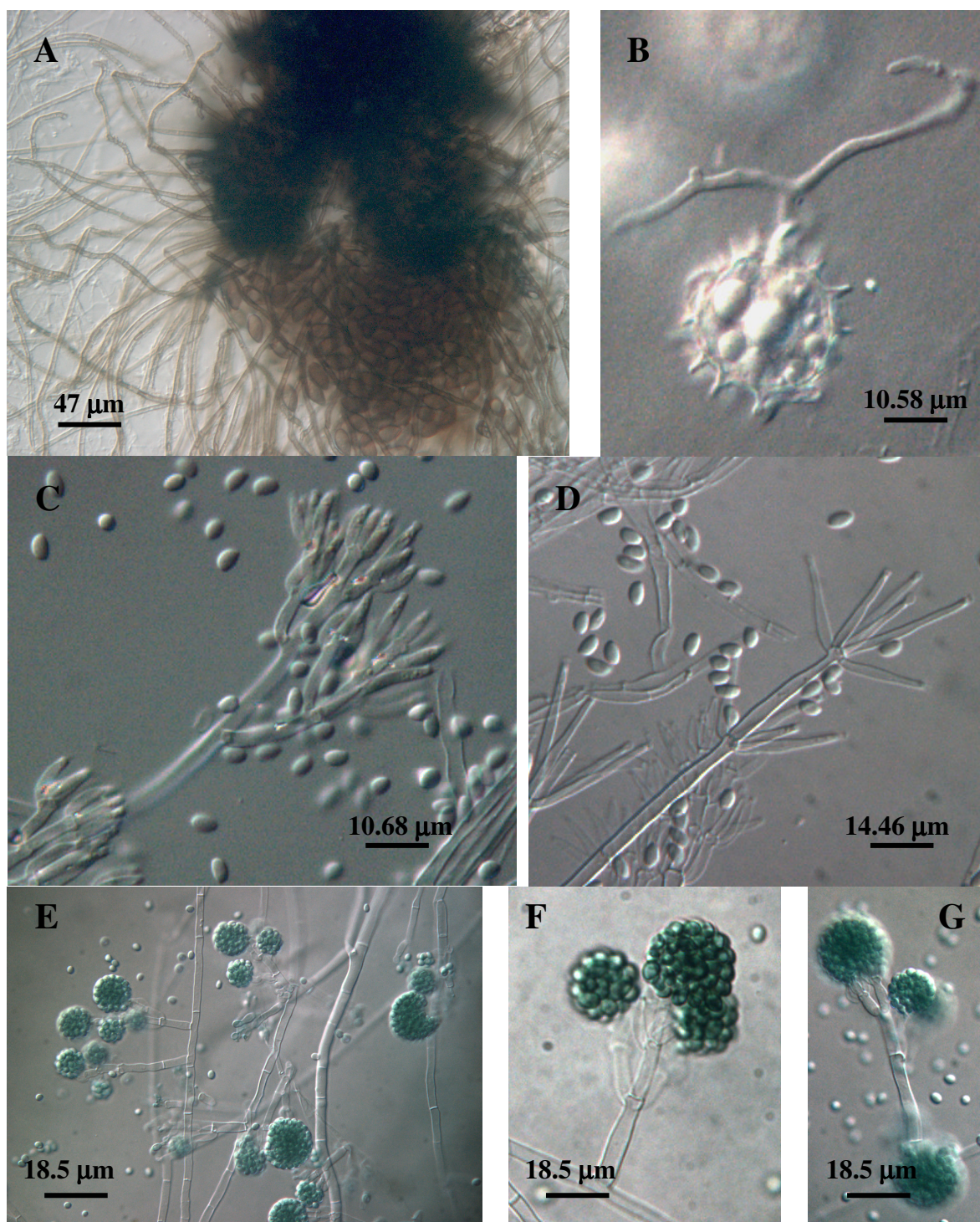


Conidi e conidioforo di *Trichoderma* sp. (A) e *Aspergillus* sp.(B) da terreno argilloso; porzione terminale di sinnema (C) e particolare delle sete e conidi (D) di *Trichurus spiralis* da terreno sabbioso.

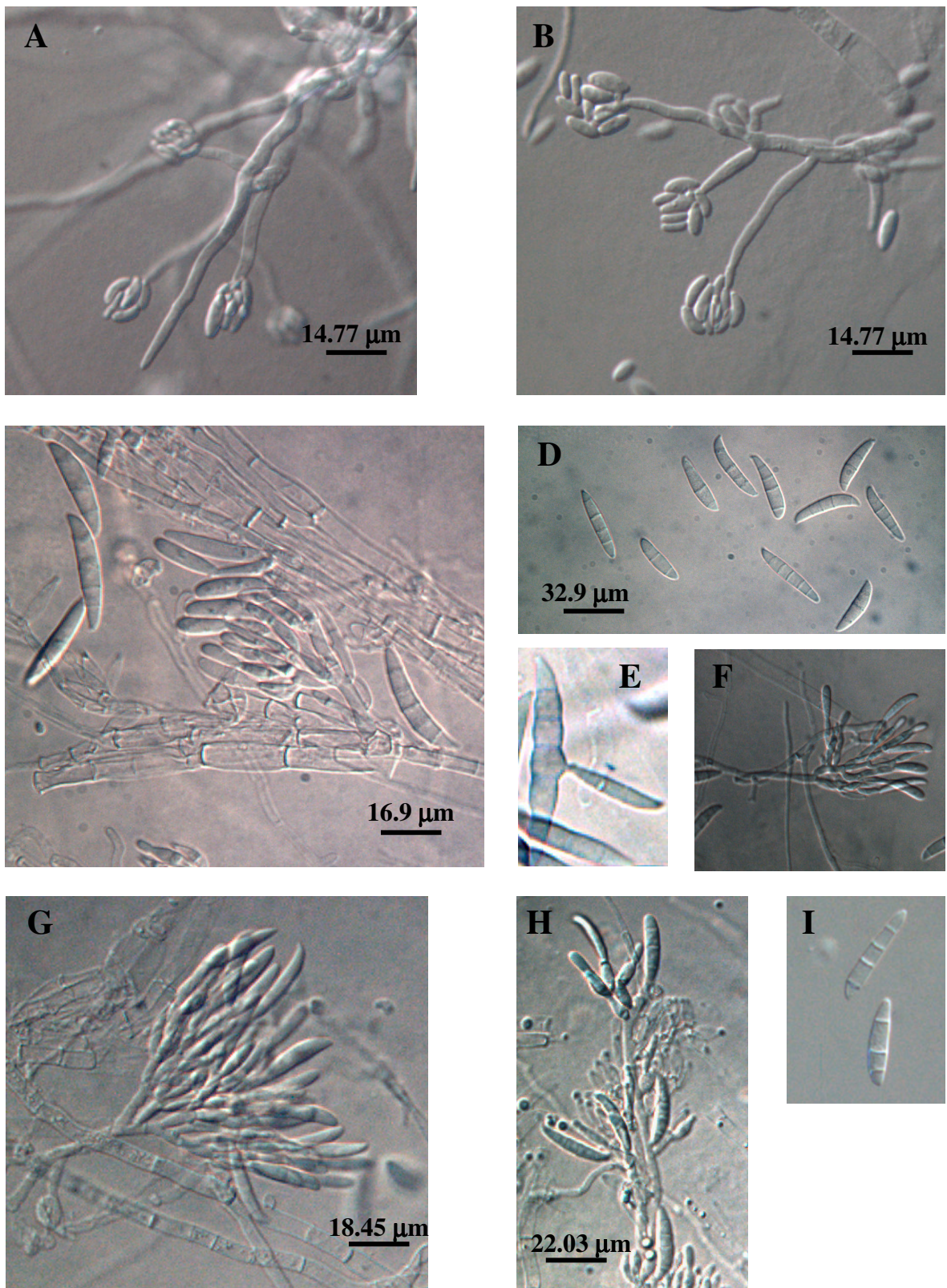


Zigospore di *Absidia* sp. (A, B e C) con particolare dei sospensori (B e C), conidiofori e conidi di *Stachybotrys* sp. (D e E) e conidiofori e conidi di *Clonostachys* sp. (F) da terreno argilloso.

Tavola II



Peritecio di *Chaetomium* sp (A); oogonio spinoso di *Pythium* sp.(B); conidiofori di *Clonostachys* sp. di tipo pennicillato (C) e verticillato (D); conidiofori e conidi di *Trichoderma* sp. (E, F e G):



Conidi e conidiofori di *Fusarium* sezione *Liseola* (A e B); sporodochio e macroconidi di *F. culmorum* (C, D, E e F); sporodochio, conidioforo e conidi di *F. graminearum* (G, H e I).

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto desidero ringraziare il Prof. Giovanni Vannacci per aver messo a disposizione la sua esperienza per la realizzazione di questo lavoro donandomi insegnamenti preziosi, per la sua guida attenta e ineccepibile e per l'infinita disponibilità mostrata nei miei confronti anche nei momenti più impegnativi.

Un ringraziamento davvero speciale va alla Dr.ssa Sabrina Sarrocco. Durante la realizzazione pratica del lavoro non mi ha mai fatto mancare il suo sostegno e la sua guida, mostrandosi sempre pronta ad offrirmi aiuto anche nei periodi per lei più difficili. Durante la stesura della tesi è stata preziosa ed insostituibile; mi ha aiutato moltissimo ed in un momento molto difficile si è dimostrata oltre che una validissima guida anche una persona veramente stupenda.

Ringrazio il Sig. Maurizio Forti perché in laboratorio non mi ha mai abbandonato, assistendo, aiutando e supervisionando ognuno di noi in maniera costante ed instancabile. La realizzazione di gran parte di questo lavoro è stata possibile grazie al suo aiuto ed alla sua esperienza, donati con enorme pazienza e disponibilità.

Un ringraziamento a Christian per la sua grande disponibilità e per il supporto datomi in questi mesi di collaborazione in laboratorio.

Ringrazio di cuore Valentina e Giada, due splendide compagne di laboratorio, sempre pronte ad aiutarmi, ad ascoltarmi ed a sostenermi. Grazie per le piacevoli chiacchierate e i momenti passati assieme.

Ringrazio di cuore tutta la mia famiglia, in particolare i miei genitori e mia sorella Federica, che mi hanno sostenuto ed aiutato durante tutta la carriera scolastica, sopportandomi anche quando era difficile farlo.

Grazie a tutti i miei nonni che hanno contribuito al raggiungimento di questo obiettivo con il loro affetto e sostegno.

Infine un ringraziamento speciale va a Matteo per avermi sostenuto, aiutato e sopportato in questo periodo "movimentato" in cui avevo davvero bisogno di una persona speciale come lui.