

RIASSUNTO

L'attività svolta in questa ricerca ha riguardato la selezione di una popolazione di *Fusarium graminearum* isolata da diverse piante (principalmente frumento e mais) di diverse regioni italiane, al fine di condurre una serie di studi di caratterizzazione molecolare per definirne le caratteristiche filogenetiche e chemiotipiche.

Si è proceduto all'identificazione e all'amplificazione delle regioni genomiche corrispondenti ai geni analizzati in questo studio: *EF-1 α* (Fattore di elongazione), *BenA* (β -tubulina), *H3* (Istone 3) e *Tri101* (Tricotecene 3-O-Acetiltransferasi). Gli alberi filogenetici ottenuti mostrano che gli isolati analizzati appartengono a *F. graminearum sensu stricto* (lignaggio 7) ad eccezione di due (6417 e 6418) che invece appartengono a *F. cortaderiae* (lignaggio 8). Sulla base della variabilità dei quattro geni analizzati, è interessante notare la presenza omogenea nel territorio italiano di *F. graminearum sensu stricto*, specie (lignaggio) considerata la più pericolosa a causa del profilo tossicologico che include tutti i chemiotipi (3A-DON, 15A-DON e NIV).

La conoscenza della struttura filogenetica italiana di *F. graminearum* fornisce molteplici indicazioni per quanto riguarda la lotta e il ridimensionamento degli eventi patologici sui cereali provocati da questo agente patogeno, permettendo una gestione più efficiente e razionale della malattia. L'omogeneità riscontrata rende infatti relativamente semplice lo sviluppo di idonei programmi di miglioramento genetico per la selezione varietale, al fine di indurre resistenza nei cereali che possono essere attaccati da questo patogeno, soprattutto nel frumento duro, dimostratosi più suscettibile agli attacchi di fusariosi (Moretti *et al.*, 2002).

Inoltre, si è proceduto alla caratterizzazione molecolare dei diversi genotipi chimici con riferimento al profilo dei tricoteceni prodotti (Desjardins, 2008). La via biosintetica dei tricoteceni è stata ampiamente indagata e chiarita, caratterizzando i diversi geni coinvolti nella produzione e nella regolazione di queste micotossine (Desjardins, 2006). In particolare, nel corso di questa ricerca sono stati utilizzati primer specifici per i geni *Tri5* e *Tri7* (Quarta *et al.*, 2005; 2006) utili a differenziare genotipi potenzialmente DON da quelli potenzialmente NIV, e primer per l'identificazione del gene *Tri3* per determinare la potenziale capacità dei diversi ceppi di produrre i derivati del DON, il 3A-DON e il 15A-DON (Quarta *et al.*, 2006). Sono stati, inoltre, utilizzati primer specifici per il gene *Tri13* (Wang *et al.*, 2008) per discriminare chemiotipi potenzialmente produttori di 15A-DON, 3A-DON e NIV.

E' opportuno sottolineare che la presenza di un prodotto di amplificazione esprime la possibilità di una particolare tossina di essere prodotta, ma l'effettiva biosintesi della tossina deve essere confermata dalle analisi chimiche.

Le analisi chimiche hanno evidenziato che il chemiotipo più presente è il 15A-DON, mentre è stata riscontrata una minore presenza di chemiotipi NIV e 3A-DON. I dati ottenuti mostrano che la struttura genetica di *Fusarium graminearum* complex (FGC) italiano è omogenea per quel che riguarda la filogenesi e che un'ampia variabilità dei chemiotipi può essere presente anche all'interno di una singola specie del FGC. Inoltre, la predominanza del chemiotipo 15A-DON rispetto a quello 3A-DON espone il frumento italiano a un minor rischio di tossicità dal momento che il chemiotipo 3A-DON è più tossico rispetto al 15A-DON (O'Donnell et al., 2004).

L'attività di ricerca di questa tesi ha anche riguardato l'isolamento di funghi micotossigeni eventualmente presenti su specie di piante officinali tipiche della flora mediterranea e la loro caratterizzazione molecolare.

L'aumento del consumo delle piante officinali, come medicina alternativa, rende infatti necessario l'utilizzo di corrette metodiche di raccolta, manipolazione, produzione e distribuzione che potrebbero rendere le piante sensibili a contaminazione da parte di diverse funghi responsabili della produzione di micotossine.

Considerato le pochissime informazioni riguardanti funghi tossigeni su piante officinali, molta della letteratura conferma la larga distribuzione e l'incidenza di funghi dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*, con particolare riferimento alle piante essiccate.

Per quanto concerne la realtà italiana, il fatto che non esistano dati, se non sporadici, sulla contaminazione di funghi tossigeni sulle piante officinali, rende tale campo di indagine estremamente interessante ed innovativo. Quindi, uno degli obiettivi di questa ricerca è stato quello di caratterizzare a livello molecolare gli isolati fungini rinvenuti su piante officinali prendendo in esame geni utili per studi di popolazione e di filogenesi, come ad esempio i geni ITS e *actina*.

La ricerca ha permesso di identificare una consistente presenza di funghi tossigeni del genere *Fusarium* e *Alternaria*, e in particolare, gli alberi filogenetici, analizzati in questo studio, mostrano che i 144 isolati appartengono a 13 generi differenti, tra cui *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Calonectria*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Trichoderma* e in misura minore sono anche presenti i generi *Aspergillus*, *Stemphylium*, *Chetomium*, *Macrophomina* e *Bionectria*.

Inoltre, uno degli obiettivi di questo studio è stato quello di valutare *in vitro* l'attività antifungina di estratti fogliari grezzi di timo (*Thymus capitatus*), e delle infiorescenze di camomilla (*Anthemis aetnensis*) su diverse specie fungine fitopatogene e micotossigene. Gli estratti saggati hanno mostrato in genere un'azione inibitrice dello sviluppo delle colonie, ma

solo in pochi casi è stata rilevata un'inibizione totale della crescita dei miceli. Infine, è stata valutata anche l'attività degli oli essenziali su *Artemia salina*, tale test ha permesso di saggiare *in vivo* l'eventuale zootossicità degli oli essenziali estratti da piante officinali.

Alla luce dei risultati ottenuti si può affermare che gli estratti saggiati hanno attività antifungina, eventuali campi di applicazione delle potenzialità degli oli essenziali potrebbero essere quello medico-farmacologico, ma anche quello alimentare.

PREMESSA

Non esiste altro posto sulla Terra che presenti come il bacino del Mediterraneo una interazione continua tra biodiversità ed azione dell'uomo. Sulle coste mediterranee, attraverso millenni di pratica agricola ed allevamento tradizionale, si è creata una straordinaria varietà di ecotipi e *pool* genici di piante.

La ricchezza di diversità vegetale del Mediterraneo è attestata da più di 360 specie appartenenti a 53 famiglie, che hanno in questa area geografica il centro di origine. Le risorse genetiche vegetali sono la fonte della nostra alimentazione e dei nostri farmaci e hanno un importante valore a livello sociale, economico, scientifico, educativo, ricreativo ed estetico. Tra le piante di interesse agrario utili all'uomo, si possono annoverare cereali, leguminose, radici e tuberi, piante da zucchero e da olio, piante aromatiche e medicinali, piante da frutto e da noci. Bisogna ricordare che in Italia e, in particolare, nel Meridione, i contadini hanno coltivato a lungo i cereali (frumento, mais, orzo, avena, riso, segale, sorgo), che erano alla base dell'alimentazione sia umana sia zootecnica. Ad esempio, il frumento, il cui centro d'origine è l'Etiopia, si coltiva maggiormente nei Paesi mediterranei, nel Nord America, in Argentina e nell'Europa Orientale. In Italia, la produzione è localizzata al Centro-Sud ed in particolare in Puglia e in Sicilia, proprio per la presenza di un ambiente ottimale per la coltivazione, caratterizzato da piovosità concentrata nel periodo invernale e da primavere ed estati calde. Un altro gruppo di specie di notevole interesse agrario, tipiche della zona mediterranea, sono le "piante erbacee spontanee eduli", con 431 piante erbacee spontanee esistenti nel Meridione, di potenziale utilità nella dieta mediterranea sia come ortaggi sia come piante da condimento. Inoltre, di particolare interesse è il possibile uso come piante medicinali, preziose per le proprietà terapeutiche in ambito farmacologico.

Tra le specie tipiche della macchia mediterranea, le piante officinali più diffuse e utilizzate sono, mirto, timo, origano, rosmarino, alloro.

In questo studio sono state approfondite le conoscenze su alcune tipiche coltivazioni mediterranee, quali frumento e alcune piante officinali, che accomunano e caratterizzano gli ambienti e la vegetazione della Puglia e della Sicilia.

**Caratterizzazione genetica di
popolazioni di *Fusarium graminearum*
da frumento**

INTRODUZIONE

Una delle tematiche emergenti nel settore della sicurezza alimentare è l'incremento negli ultimi decenni di patologie vegetali associate alla presenza di specie fungine produttrici di micotossine nelle coltivazioni di cereali, in tutto il mondo (Goswani e Kistler, 2004).

La problematica riguardante le micotossine è sempre più attuale, in quanto è stata scientificamente dimostrata la pericolosità delle micotossine per la salute umana che, per questo motivo, sono oggetto di ricerche e regolamentazione a livello comunitario e nazionale. Oltre ai problemi di carattere sanitario, la contaminazione delle derrate alimentari da micotossine può provocare ingenti perdite economiche a tutti i livelli della filiera agroalimentare: produzione, stoccaggio, trasformazione, trasporto e distribuzione. E' stato calcolato che circa il 25% delle derrate alimentari prodotte annualmente in tutto il mondo è soggetto a contaminazione da micotossine e ciò ha gravi ricadute economiche (CAST, 2003).

Gli alimenti vegetali più a rischio sono i cereali, i legumi, la frutta secca ed essiccata, la frutta a guscio, le spezie, le olive, il cacao ed il caffè verde. Particolare rilevanza assume poi il fatto che, qualora mangimi contaminati vengano assunti da animali da allevamento, anche i prodotti da questi derivati (latte, formaggi, carne e uova) possono risultare inquinati da micotossine.

La formazione delle micotossine è subordinata, oltre che alla presenza del ceppo fungino tossigeno, al verificarsi di particolari condizioni pedoclimatiche, a squilibri nutrizionali, ad errate pratiche di coltivazione e di conservazione delle derrate alimentari, nonché al tipo di substrato interessato (in quanto alcuni alimenti sono più suscettibili di altri).

Ad esempio, il frumento è una coltura che può essere contaminata almeno da tre tra i cinque più importanti funghi produttori di micotossine: *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e *Fusarium graminearum* (Marasas *et al.*, 2008).

Conseguentemente, metaboliti secondari prodotte da specie fungine appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, come ocratossina (prodotta da *A. ochraceus*, *P. verrucosum*), deossinivalenolo (DON) e zearalenone (ZEA) (entambi prodotti da *F. graminearum*), possono essere comuni contaminanti del frumento (Miller, 1995).

La difficoltà di risoluzione del problema della contaminazione da micotossine risiede nella variabilità dei fattori genetici (specie, razza, ceppo) e dei fattori fisiologici caratterizzanti i funghi tossigeni; inoltre, i fattori ambientali e la marcata variabilità intragenetica ed intraspecifica delle muffe da cui hanno origine le tossine determinano differenti effetti sulle colture, sugli animali e sull'uomo (Corticelli e D'Imperio, 2004).

L'ingestione di micotossine, talvolta letale se protratta nel tempo, può provocare nell'uomo epatiti, effetti cancerogeni e di genotossicità, mentre negli animali può determinare disturbi

digestivi, turbe nella riproduzione ed inappetenza, con conseguente scarsa produttività e, nei casi più gravi, edemi polmonari, immunotossicità e meningiti (Desjardins, 2006)

La fusariosi della spiga di frumento

La fusariosi della spiga rappresenta per il frumento una delle malattie più importanti in tutti gli areali cerealicoli in Italia; è causata da diversi microrganismi fungini, e quelli isolati più frequentemente appartengono al genere *Fusarium* e alle specie *F.graminearum* *F.culmorum*, *F.avenaceum*, *F.poaie* e *Microdochium nivale* (Caron, 1993; Pancaldi *et al.*, 1997, Pancaldi e Alberti, 2001; Pasquini *et al.*, 2003).

Tali patogeni, causano il disseccamento parziale o totale della spiga, penetrando al suo interno, e influenzando, inoltre, negativamente sulla formazione delle cariossidi, che risultano striminzite (Figura 1A) (Pancaldi e Alberti, 2001).

Inoltre, la colonizzazione della granella da parte di questi patogeni può danneggiare la qualità del seme andando ad intaccare le strutture cellulari, come parete cellulare, granuli di amido e proteine di riserva, con conseguente diminuzione della capacità germinativa del seme stesso (Bechtel *et al.*, 1985).

Dal punto di vista epidemiologico, è importante sottolineare che la fioritura rappresenta il momento ottimale per l'infezione, che può avvenire con temperature comprese tra 15 e 30 °C (l'*optimum* termico infatti varia a seconda della specie di *Fusarium* coinvolta) ed è favorita da umidità relativa elevata. La principale fonte d'inoculo è solitamente costituita dai residui di precedenti colture cerealicole, soprattutto per quanto riguarda il mais (Logrieco *et al.*, 2006).

Risulta pertanto evidente l'importanza che tale malattia riveste a livello quali-quantitativo della produzione, considerando inoltre che alcune specie appartenenti al genere *Fusarium* sono «tossigene», cioè capaci di dar luogo alla produzione di micotossine dannose sia per l'uomo sia per gli animali (Bottalico, 2002; Pancaldi e Alberti, 2001).

***Fusarium graminearum*: una specie fungina fitopatogena e tossigena**

Fusarium graminearum (Schwabe) [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch] è un fungo tossigeno patogeno dei cereali, in particolare di frumento e mais, capace di produrre delle micotossine pericolose per l'uomo, gli animali e le piante.

La fusariosi della spiga del frumento, diffusa in tutto il mondo, è causata principalmente da *F. graminearum* anche se, sovente, questa specie viene associata ad altre specie tossinogene appartenenti al genere *Fusarium* (Moretti *et al.*, 2002). La malattia viene segnalata con più frequenza nelle zone a coltivazione cerealicola in presenza di un clima primaverile molto piovoso e/o caldo umido.

La sintomatologia di tale malattia è evidente sulle spighe immature (figura 1B) e si manifesta principalmente con disseccamenti che interessano parzialmente o completamente la spiga a seconda della gravità dell'attacco (Moretti *et al.*, 2002).

La fusariosi provoca ingenti perdite economiche a causa delle elevate riduzioni della qualità e della resa nella produzione di semi, ma anche a causa della contaminazione delle cariossidi da parte delle micotossine, che rappresentano una seria minaccia per la sicurezza alimentare (Moretti *et al.*, 2002).



Figura 1A Cariossidi striminzite 1B Sintomatologia della fusariosi della spiga

Tricoteceni e aspetti normativi

Le principali micotossine prodotte da *F. graminearum* sono i tricoteceni, inibitori della sintesi proteica con azione neurotossica e riduzione del potere immunitario nei mammiferi, e gli zearalenoli aventi attività ormono-simile con effetti anabolizzanti ed uterotrofici (Bottalico, 2002).

I tricoteceni costituiscono una famiglia di più duecento metaboliti sesquiterpenoidi e sono prodotti del metabolismo secondario di diversi generi di funghi. Ad oggi sono stati descritti più di duecento tricoteceni (Grovey, 2007), che possono essere suddivisi in 4 gruppi in base alla loro struttura chimica.

Tra i tricoteceni prodotti dalle specie appartenenti al genere *Fusarium*, quelli dei gruppi A e B si differenziano in base alla struttura chimica per la presenza o assenza di un gruppo funzionale chetonico in posizione C-8. Entrambi i tipi, A e B, possono esplicare tossicità acuta nei confronti di uomini e animali.

Fusarium graminearum produce tricoteceni del gruppo B, tra i quali il deossinivalenolo (DON) il nivalenolo (NIV) ed alcuni derivati acetilati come il 3-acetil-DON (3ADON) e il 15-acetil-DON (15ADON) e il 4-acetil NIV (4ANIV). (Desjardins, 2006).

I tricoteceni sono responsabili della comparsa di diverse sintomatologie negli animali, quali vomito, rifiuto degli alimenti e riduzione del peso corporeo.

Tra le tricotecenotossicosi attribuite al DON e ai suoi derivati, vi è la sindrome emetica che ricorre con frequenza negli allevamenti zootecnici, ma che è stata segnalata sporadicamente anche nell'uomo. E' stato ipotizzato, infatti, che il DON possa essere la causa della glomerulonefropatia umana.

Inoltre, anche il NIV esplica un'azione tossica rilevante, superiore al DON, nei confronti di numerosi animali sia causando tossicità acuta, sia intervenendo in sindromi emorragiche e immunitarie (Desjardins, 2006). Infine, fra i derivati del DON, il 3A-DON dimostra maggiore tossicità verso gli animali e migliore stabilità alla detossificazione praticata dalla flora microbica del ruminante di vacche in lattazione rispetto al 15A-DON (King *et al.*, 1984; Forsell *et al.*, 1987).

I tricoteceni sono composti molto stabili e persistono nei prodotti contaminati anche per molto tempo dopo la morte del fungo produttore, ed è quindi possibile ritrovarli frequentemente negli alimenti e nei mangimi derivati dai cereali. Infatti, i normali processi produttivi delle industrie alimentari non sono in grado di allontanare o distruggere le micotossine dagli alimenti finiti, se i prodotti di partenza sono contaminati.

In particolare, a titolo esemplificativo, da indagini condotte in Europa, su diversi tipi di alimenti a base di cereali, sono state trovate contaminazioni da DON fino a 1380 parti per bilione (ppb) nel 98% dei campioni di farina, fino a 4840 ppb nel 91% degli spaghetti e fino a 517 ppb nel 79% nei prodotti cerealicoli per l'infanzia (Moretti *et al.*, 2002). Per tali motivi, istituzioni internazionali (FAO, OMS e Unione Europea) e nazionali (Ministero della Sanità), impongono l'introduzione della sorveglianza di tutte le fasi che compongono la filiera produttiva, per raggiungere standard qualitativi più elevati e per garantire maggiore sicurezza per l'uomo e gli animali. A questo riguardo si riportano i limiti massimi tollerabili delle tossine nei prodotti alimentari definiti nel Regolamento CE 1881/2006 e aggiornati nel Regolamento CE 1126/2007.

I limiti accettati per il DON sono i seguenti: 1750 ppb nel grano duro e nel mais non trasformati, 750 ppb nei cereali e derivati destinati al consumo umano diretto, 200 ppb nei prodotti per lattanti e bambini. Per quanto riguarda lo ZEN i limiti massimi indicati sono: 100 ppb in tutti i cereali tranne nel mais, 350 ppb nel mais, 50 ppb nei cereali destinati al consumo umano diretto.

Il percorso metabolico della biosintesi dei tricoteceni

Il principale meccanismo di tossicità prodotto dai tricoteceni è l'inibizione della sintesi proteica.

I tricoteceni sono sesquiterpeni triciclici contenenti un doppio legame tra il carbonio 9 e il carbonio 10, un anello epossido in posizione 12, 13 e sono caratterizzati da una distribuzione di ossigenazioni ed esterificazioni in posizione C-3, C-4, C-7, C-8, e C-15.

La biosintesi dei tricoteceni nelle specie di *Fusarium* inizia con una fase di ciclizzazione catalizzata dall'enzima tricodiene sintasi (Tri5) (Hohn e Beremand, 1989), seguita da otto ossigenazioni e quattro esterificazioni.

La sintesi di tali molecole richiede anche l'espressione di una proteina trasportatrice e una rete di geni regolatori. Geni biosintetici e regolatori sono stati mappati nel genoma fungino di *F. graminearum*.

Tri5 è stato il primo gene ad essere clonato, ed inoltre, è centrale nel cluster costituito da dodici geni co-regolatori nella biosintesi dei tricoteceni in *F. graminearum*, definito *Tri5 cluster*.

I geni posti all'estremità del cluster sono correlati al chemiotipo, come ad esempio Tri3 che codifica per la 15-O-acetiltransferasi (McCormick *et al.*, 1996) e che determina il chemiotipo

15ADON, oppure Tri13 codificante per una ossigenasi che porta al chemiotipo NIV (Lee *et al.*, 2002), ed il gene TRI7, responsabile della acetilazione di NIV (4NIV), e che nei ceppi potenzialmente DON non sono funzionanti in seguito a una multipla inserzione e delezione (Lee *et al.*, 2002, Brown *et al.*, 2001). Nella figura 2 sono mostrati alcuni dei geni importanti nel percorso metabolico della biosintesi dei tricoteceni.

Sebbene i geni coinvolti nella sintesi dei tricoteceni facciano parte del cluster Tri5, alcuni geni sono stati identificati in posizione relativamente distanti rispetto al *cluster*, come ad esempio, il Tri101 codificante una tricotecene 3-O-acetiltransferasi (Kimura *et al.*, 2007).

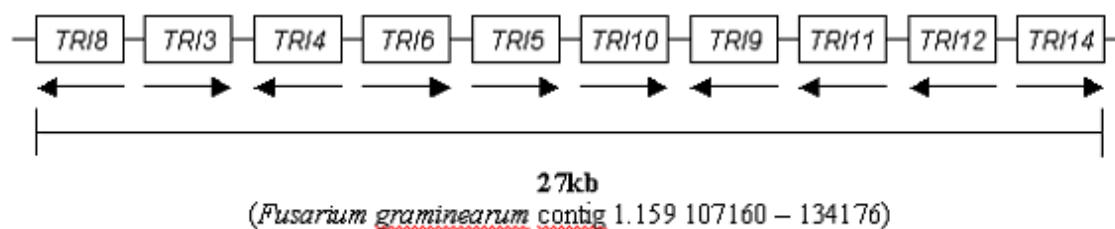


Figura 2. Alcuni geni del pathway biosintetico dei tricoteceni

Chemiotipi e diffusione a livello mondiale

Le popolazioni di *F. graminearum* si differenziano in base alla produzione dei diversi tipi di tricoteceni, definendo profili micotossigenici specifici chiamati chemiotipi. Quindi, per chemiotipo o “razza chimica” si intende il profilo di produzione di molecole chimiche, il genotipo, invece, definisce la costituzione genetica o la sua sequenza di DNA (Desjardins, 2008).

I chemiotipi 3AcDON e 15AcDON indicano, rispettivamente, la produzione di DON+3A-DON e DON+15A-DON, mentre il chemiotipo NIV indica la presenza di NIV e dei suoi derivati acetilati. Dal punto di vista della patogenicità, i chemiotipi 3AcDON e 15AcDON sono più aggressivi nei confronti del frumento rispetto ai chemiotipi NIV (Desjardins *et al.*, 2004), riflettendo probabilmente un vantaggio selettivo per questo tipo di ceppi (Desjardins, 2004).

Dalle diverse indagini eseguite nel mondo sulla presenza di tricoteceni in cariossidi di frumento infette da *F. graminearum*, è emerso che i chemiotipi DON predominano in Nord America, Sud

America, ed Europa, mentre i chemiotipi NIV sono rari in Nord e Sud America e più frequenti in Europa (O'Donnell *et al.* 2000; Rasmussen *et al.* 2003).

Al contrario, indagini estese in Cina, Giappone, Corea e Nepal hanno evidenziato la presenza di entrambi i chemiotipi DON e NIV (Desjardins, 2006). Inoltre, ceppi segnalati come produttori di entrambi i chemiotipi DON e NIV, sono stati definiti “chemiotipi unknown” (Ward TJ, *et al.*, 2002).

E' opportuno sottolineare che la presenza di un prodotto di amplificazione esprime la possibilità di una particolare tossina di essere prodotta, ma l'effettiva biosintesi della tossina deve essere confermata dalle analisi chimiche (Quarta *et al.*, 2005). Distinguere tra i diversi chemiotipi è importante poiché la differenza nella produzione di micotossine può riflettere marcate differenze di tossicità e attività biologica (Kimura *et al.*, 1998).

La controversia tassonomica

Fusarium graminearum è tuttora oggetto di dibattito scientifico circa la sua definizione tassonomica; infatti, è stato sottoposto recentemente ad un processo di revisione sistematica che ha portato alcuni studiosi a considerare questa specie in realtà un complesso di specie denominato *Fusarium graminearum* complex (FGC).

All'interno di popolazioni di *F. graminearum* isolate da campi di frumento, sono stati inizialmente individuati sette lignaggi filo geneticamente distinti sulla base delle sequenze di DNA di sei geni nucleari. Tali lignaggi differivano per la distribuzione geografica, per la produzione di micotossine e per la diversa capacità di esprimere la loro patogenicità sulle colture cerealicole (O'Donnell *et al.*, 2000). Successivi studi sul FGC, mediante la valutazione del polimorfismo nelle sequenze di undici porzioni di geni nucleari e tre regioni intergeniche, hanno permesso di individuare nove distinte linee filo-genetiche (Ward *et al.*, 2002 O'Donnell *et al.*, 2004), elevate al rango di specie. Successivamente, sono state descritte altre due nuove specie nell'ambito del FGC attraverso lo studio filogenetico delle sequenze di tredici geni (Starkey *et al.*, 2007).

Tuttavia, non tutta la comunità scientifica internazionale che studia il genere *Fusarium* concorda con la proposta di divisione in specie diverse di *F. graminearum*. Alcuni studiosi, basandosi su indagini genetiche effettuate utilizzando la tecnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ritengono che i lignaggi siano delle sub-specie piuttosto che delle vere e proprie specie (Leslie e Summerell, 2006). Altri motivi di disaccordo sulla suddivisione

all'interno di *FGC* sono dovuti all'assenza di correlazione tra i lignaggi e la produzione di micotossine ed all'assenza di differenze nei caratteri morfologici ad eccezione di tre degli undici lignaggi (Leslie e Summerell, 2006).

A tal riguardo, Leslie e collaboratori (2007) hanno recentemente generato, sulla base della sequenza del gene *Tri101* considerato un gene chiave nel percorso metabolico della biosintesi dei tricoteceni, un albero filogenetico che mette fortemente in discussione la separazione in differenti specie all'interno del complesso *F. graminearum*.

Infine, più recentemente, O'Donnell (2008) e Yli-Mattila e collaboratori (2009) hanno descritto nell'ambito di *FGC* due nuove specie, *F. ethiopicum* e *F. ussurianum*, originari rispettivamente dell'Africa orientale e dell'estremo oriente della Russia.

Distribuzione geografica

Dal punto di vista della diffusione geografica, *F. graminearum sensu lato* è un fungo diffuso in tutto il mondo. Gli studi su popolazioni isolate dai sei continenti hanno rilevato la presenza di *cluster* biogeograficamente definiti in base ai quali *F. graminearum sensu stricto* (lignaggio 7) è considerato il più diffuso al mondo ed è presente nel nord e nel sud America e in Europa. Gli altri lignaggi, invece, hanno una distribuzione più circoscritta. Nel continente americano il *F. asiaticum* (lignaggio 6), il *F. cortaderiae* (lignaggio 8), il *F. brasiliicum* (lignaggio 9), il *F. austroamericanum* (lignaggio 1) e il *F. meridionale* (lignaggio 2) si ritrovano più diffusamente in Brasile e in Argentina; il *F. boothii* (lignaggio 3) è presente in Messico e Guatemala; in Honduras e USA è presente il *F. mesoamericanum* (lignaggio 4); il *F. gerlachii* (lignaggio 10) è localizzato solo nel nord America. Nel continente Asiatico il lignaggio più diffuso è il *F. asiaticum* (lignaggio 6), ma si riscontrano presenze sporadiche di *F. meridionale* (lignaggio 2) e *F. boothii* (lignaggio 3) in Nepal e Korea, di *F. vorosii* (lignaggio 11) in Giappone. In Sud Africa sono diffusi il *F. meridionale* (lignaggio 2), il *F. boothii* (lignaggio 3) e il *F. acaciae-mearnsii* (lignaggio 5). In Oceania, nei territori di Australia e Nuova Zelanda è stato isolato il *F. cortaderiae* (lignaggio 8), mentre, limitatamente all'isola australiana, sono stati trovati il *F. acaciae-mearnsii* (lignaggio 5) e il *F. meridionale* (lignaggio 2). In Europa, infine, sebbene recentemente siano stati segnalati *F. vorosii* (lignaggio 11) e *F. boothii* in Ungheria (Starkey *et al.*, 2007; Laday *et al.*, 2004), *F. graminearum sensu stricto* è la specie largamente dominante.

Studio filogenetico di *Fusarium graminearum*

L'importanza economica e la rilevanza sanitaria conseguenti alla contaminazione delle matrici alimentari da parte di funghi tossigeni hanno contribuito ad un aumento degli studi tassonomici e filogenetici delle specie fungine tossigene, al fine di ridurre il rischio micotossigeno correlato alla contaminazione delle colture di interesse agrario.

L'incremento di studi di filogenesi molecolare ha condotto alla diffusione di concetti di specie filogenetica (PSC), che individua i confini tra le specie, utilizzando analisi *multi locus* di geni diversi (Taylor *et al.*, 2000).

Gli studi filogenetici hanno portato a concetti di specie generalmente più restrittivi anche nel genere *Fusarium*, ampliando il numero delle specie, ma mantenendo comunque una buona correlazione tra queste specie e la relativa produzione di micotossine.

Alcuni geni utilizzati come *marker* diagnostici per studi filogenetici sono geni codificanti per proteine, geni a singola copia che mostrano un buon livello di discriminazione tra le specie.

La biodiversità e la filogenesi di *F. graminearum* isolato da frumento in Italia sono state analizzate utilizzando i geni TEF (Translation Elongation Factor 1- α), β -TUB (BenA), H3 (Istone 3) e Tri101 (3-O-acetiltransferasi).

Tali geni strutturali, codificanti proteine, danno utili informazioni per l'identificazione delle specie e per la filogenesi, sebbene siano geni a singola copia tendono ad essere abbastanza variabili e altamente affidabili.

Il fattore di elongazione 1 α codifica per l'isoforma della subunità α del fattore di elongazione, responsabile del trasporto enzimatico dell'aminoacil tRNA al ribosoma. Oltre ad avere un ruolo nella traduzione, TEF ha dimostrato di giocare un ruolo importante nella esportazione nucleare di alcune proteine.

La β -tubulina è una proteina citoplasmatica appartenente alla famiglia delle proteine globulari. I microtubuli, i principali elementi citoscheletrici presenti in tutte le cellule eucariotiche, sono costituiti da tubulina, un dimero di due sub unità, α e β . Essi possono svolgere ruoli chiave nella segregazione dei cromosomi nella mitosi, nel trasporto intracellulare, nei movimenti ciliari e flagellari e nel supporto strutturale del citoscheletro.

Gli istoni sono piccole proteine basiche con peso molecolare tra gli 11 e 16 KDa (H1, H2A, H2B, H3 e H4) che formano l'ottamero attorno al quale si avvolge il DNA per formare il nucleosoma, l'unità fondamentale della cromatina. In particolare, gli istoni H3 ed H4 sono sorprendentemente ben conservati attraverso l'evoluzione a conferma del ruolo fondamentale che rivestono. Proprio per questa caratteristica, i geni per gli istoni, sono tra quelli più utilizzati nell'analisi filogenetica. TRI101 catalizza il trasferimento di un gruppo acetile di acetil

coenzima A sul C3 idrossile di diversi tricoteceni. E' situato tra il gene UTP-ammoniaca ligasi e la permeasi fosfato, e, quindi, al di fuori del cluster di geni responsabili della biosintesi tricoteceni. Questo gene in *Fusarium* è anche coinvolto nell'autodifesa (Kimura *et al.*, 1998b; McCormick *et al.*, 1999). Sembra infatti che il prodotto del gene *Tri101* eserciti un effetto di protezione in seguito all'inserimento di un gruppo acetile sul carbonio-3 dei tricoteceni (Kimura *et al.* 1998b).

L'assenza di dati riguardanti la realtà italiana giustifica la necessità di avviare una vasta indagine nel territorio italiano per analizzare la struttura genetica delle popolazioni di *F. graminearum* presenti su frumento nel nostro Paese e studiarne la loro biodiversità.

SCOPO DELLA RICERCA

Fin dall'inizio del secolo scorso, la fusariosi è stata riscontrata nelle diverse aree coltivate a frumento e mais del centro-nord Italia, caratterizzate da condizioni climatiche piovose favorevoli alla sua comparsa. Inoltre, nel caso del mais, anche al Sud, la coltivazione di questa coltura è esposta ai rischi di infezioni causate da *F. graminearum* e dalla contaminazione delle relative micotossine, in particolare quando la maturazione del prodotto si raggiunge in un periodo tardivo della stagione a causa della scelta di ibridi tardivi o quando il mais rappresenta un secondo raccolto.

Dai dati a disposizione, si evince che il frumento duro presenta una maggiore suscettibilità rispetto a quello tenero (Moretti *et al.*, 2002). Tale aspetto può essere la conseguenza dell'assenza di adeguati programmi di selezione varietale per la resistenza alle fusariosi nel frumento duro che, introdotto nelle regioni del Nord Italia, ed esposto, quindi, a condizioni favorevoli allo sviluppo della fusariosi, non ha ancora sviluppato resistenza a questo patogeno.

In Italia non ci sono dati riguardanti il tipo di lignaggi o specie di FGC isolati dai cereali, nonostante siano disponibili molti dati sull'incidenza delle fusariosi dei cereali e sulla contaminazione da *F. graminearum* nelle diverse regioni italiane.

In Italia è poco nota la diffusione dei principali chemiotipi fra le popolazioni di *F. graminearum* isolate da frumento nelle varie regioni.

Tutto questo evidenzia l'importanza di definire con precisione i diversi chemiotipi che possono essere isolati da frumento nelle varie aree geografiche in cui tale coltura è diffusa, in quanto si possono avere informazioni più accurate sul potenziale rischio legato alla contaminazione di tricoteceni in presenza di infezioni del frumento da parte di *F. graminearum*. In Italia è poco nota la diffusione dei principali chemiotipi fra le popolazioni di *F. graminearum* isolate da frumento nelle varie regioni.

I diversi profili di produzione di tricoteceni sembrano non aver correlazione con l'evoluzione filogenetica del *Fusarium Graminearum Complex (FGC)* (O'Donnell *et al.*, 2000), per questo motivo, la rivalutazione tassonomica di *F. graminearum*, eseguita nell'ultimo decennio, aumenta l'importanza di chiarire le relazioni esistenti tra i chemiotipi e le nuove specie descritte all'interno del *FGC*, sia a livello chimico sia a livello molecolare.

A questo riguardo, la conoscenza approfondita del profilo filogenetico di *F. graminearum* in Italia potrebbe fornire informazioni sulla sua diversità genetica che saranno preziose per sviluppare strategie di difesa che limitino la presenza di questo fungo e delle relative micotossine sui cereali e sugli alimenti derivati.

La conoscenza della struttura filogenetica di *F. graminearum* e dei chemiotipi principali in Italia fornirebbe importanti informazioni per sviluppare strategie di lotta finalizzate alla riduzione degli attacchi di *F. graminearum* su frumento.

Le informazioni sull'ecologia, l'epidemiologia e le dinamiche di popolazione di *F. graminearum* permetterebbero, inoltre, lo sviluppo di efficienti programmi di miglioramento genetico per la selezione varietale, al fine di indurre un'ampia resistenza nei cereali interessati alla malattia.

Quindi i principali obiettivi di questo studio sono di seguito descritti.

- 1) Raccolta di una ampia collezione di isolati di *F. graminearum* da cariossidi di frumento, provenienti dalle principali realtà agricole a vocazione cerealicola (frumento duro e tenero) del territorio italiano; isolati di *F. graminearum* sono stati anche richiesti a collezioni fungine di qualificate Istituzioni italiane.
- 2) Caratterizzazione genetica degli isolati di *F. graminearum* mediante l'amplificazione e il sequenziamento delle regioni geniche EF-1 α BenA, H3 e TRI101.
- 3) Caratterizzazione dei profili micotossinogenici dei vari lignaggi identificati sia attraverso analisi genetico-molecolari dei principali geni coinvolti nella biosintesi dei tricoteceni (genotipi), sia attraverso l'analisi chimica dei diversi tricoteceni prodotti (chemiotipi).

MATERIALI E METODI

Isolati esaminati e condizioni di crescita delle colture fungine

Gli isolati di *Fusarium graminearum* analizzati in questo studio sono elencati nella tabella 1. Gli isolati, prelevati da colture su PDA (Potato Dextrose Agar) in attivo accrescimento, sono stati inoculati in beute contenenti 100 ml di brodo nutritivo di Wickerham (4% glucosio, 0.3% estratto di malto, 0.3% estratto di lievito e 0.5% peptone), precedentemente sterilizzate in autoclave a 115°C per 20 min. Le beute sono state incubate alla temperatura controllata di 26 °C in agitazione a 120 rpm per 2 giorni. Il micelio fungino è stato recuperato mediante filtrazione del terreno liquido di crescita, congelato e sottoposto a 24 ore di liofilizzazione.

Tabella 1. Isolati di *Fusarium graminearum* esaminati in questo studio.

ITEM	Ospite	Origine geografica
126	Triticum durum	Lombardia
127	Zea mays	Lombardia
346	Zea mays	Basilicata
351	Zea mays	Basilicata
646	Triticum durum	Basilicata
2270	Zea mays	Friuli Venezia Giulia, Pordenone
2302	Zea mays	Lombardia, Bergamo
2303	Zea mays	Lombardia, Bergamo
2305	Zea mays	Lombardia, Bergamo
3445	Zea mays	Friuli Venezia Giulia, Pordenone
3446	Zea mays	Friuli Venezia Giulia, Pordenone
4576	Triticum durum var. Svevo	Marche, Macerata
4577	Triticum durum var. Svevo	Marche, Macerata
4578	Triticum durum var. Svevo	Marche, Macerata
4579	Triticum durum var. Svevo	Marche, Macerata
4580	Triticum durum var. Svevo	Marche, Macerata
4581	Triticum durum var. Svevo	Marche, Macerata
4582	Triticum durum var. Svevo	Marche, Macerata
4584	Triticum durum var. Svevo	Marche, Macerata
6350	Triticum durum	Emilia Romagna, Ravenna
6352	Triticum durum	Emilia Romagna, Ravenna

6353	Triticum durum	Emilia Romagna, Ravenna
6354	Triticum durum	Emilia Romagna, Ravenna
6355	Triticum durum	Emilia Romagna, Ravenna
6358	Triticum durum	Emilia Romagna, Ravenna
6376	Triticum	Marche, Macerata
6380	Triticum	Marche, Macerata
6382	Triticum	Marche, Macerata
6383	Triticum	Marche, Macerata
6403	Triticum durum	Marche, Ancona
6404	Triticum durum	Marche, Ancona
6405	Triticum durum	Marche, Ancona
6406	Triticum durum	Marche, Ancona
6407	Triticum durum	Marche, Ancona
6409	Triticum durum	Marche, Ancona
6410	Triticum durum	Marche, Ancona
6411	Triticum durum	Marche, Ancona
6412	Triticum durum	Marche, Ancona
6413	Triticum durum	Marche, Ancona
6414	Triticum durum	Marche, Ancona
6415	Triticum durum	Marche, Ancona
6416	Triticum durum	Marche, Ancona
6417	Triticum durum	Marche, Ancona
6418	Triticum durum	Marche, Ancona
6419	Triticum durum	Marche, Ancona
6448	Triticum durum	Marche, Ancona
6471	Triticum durum	Marche, Ancona
6472	Triticum durum	Marche, Ancona
6473	Triticum durum	Marche, Ancona
6474	Triticum durum	Marche, Ancona
6475	Triticum durum	Marche, Ancona
6476	Triticum durum	Marche, Ancona
6477	Triticum durum	Marche, Ancona
6478	Triticum durum	Marche, Ancona
6479	Triticum durum	Marche, Ancona
6506	Triticum aestivum	Emilia Romagna, Bologna

6509	Triticum aestivum	Emilia Romagna, Bologna
6510	Triticum aestivum	Emilia Romagna, Piacenza
6530	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
9305	Triticum	Molise, Campobasso
10029	Triticum	Marche, Jesi
10031	Triticum	Marche, Jesi
10041	Triticum	Marche, Osimo
10042	Triticum	Marche, Osimo
11030	Triticum	Puglia, Foggia
11230	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
11256	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
11992	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
11993	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
11994	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
11995	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
11998	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12001	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12002	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12003	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12004	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12006	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12007	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12010	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12011	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12017	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12020	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12021	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12027	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12029	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12030	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12035	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12036	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12037	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12038	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12039	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza

12040	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12041	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza
12081	Triticum	Emilia Romagna, Piacenza

Estrazione del DNA, amplificazioni e sequenziamento

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita secondo il protocollo del kit commerciale "DNA Purification System for food" (Wizard Magnetic, PROMEGA) utilizzando 10 mg di micelio liofilizzato polverizzato. Le prime fasi, condotte manualmente, hanno previsto la disgregazione delle componenti cellulari e l'omogeneizzazione dei campioni in seguito all'agitazione meccanica in presenza di tamponi di lisi e l'azione enzimatica dell'RNasi. Dopo la centrifugazione del lisato a 13000 g per 10 min, le fasi successive sono state automatizzate con l'uso del robot epMotion 5075 (Eppendorf). Questo tipo di estrazione del DNA genomico si basa sull'utilizzo di biglie paramagnetiche che hanno la capacità di legare reversibilmente gli acidi nucleici, separandoli dalle altre componenti. Il robot ha eseguito numerosi lavaggi con i tamponi del kit per eliminare eventuali contaminanti e residui delle biglie con gli acidi nucleici adesi, trattenute sul fondo della provetta grazie ad un magnete. L'eluizione finale del DNA è stata effettuata in un buffer di eluizione. Per verificare l'assenza di RNA o di altri contaminanti, il DNA genomico estratto è stato controllato qualitativamente mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8%. La stima quantitativa, invece, è stata condotta tramite lettura spettrofotometrica al NanoDrop (ND 1000 Spectrophotometer, Celbio).

Le regioni genomiche corrispondenti ai geni del fattore di elongazione (*EF-1 α*), della β -tubulina (*β -TUB*), dell'istone 3 (*H3*) e del tricotecene 3-O-acetiltrasferasi, (*TR1101*) sono state amplificate utilizzando i seguenti primer: EF1 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3' e EF2 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3' per il EF-1 α (O' Donnell *et al.*, 2000), Bt2a 5'-

GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3' e T22 5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3' per la β -TUB (Glass *et al.*, 1995; O' Donnell *et al.*, 1997), H3-1a 5'-ACTAAGCAGACGGCCCGCAGG-3' e H3-1b 5'-GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT- 3' per H3 (Glass *et al.*, 1995), AT1 5'-AAAATGGCTTTCAAGATACAG-3' e AT2 5'CATACTGCGCATAATTGGTCCA-3' per Tri101 (O'Donnell *et al.*,2000).

Le reazioni di PCR dei campioni sono state eseguite in un volume finale di 25 μ l, contenente 30 ng di DNA genomico, 0,75 μ l di ogni primer 10 μ M, 2,5 μ l di tampone 10X, 0,5 μ l di dNTP 10 mM e 0,13 μ l di Taq 5 U/ μ l (Hot master Taq DNA Polymerase 5 PRIME).

Per ognuno dei quattro geni è stato impostato un programma di PCR specifico, le cui condizioni sono schematizzate nella tabella 2:

Tabella 2. Fasi delle PCR utilizzate per i geni EF-1 α , β -TUB, H3 e Tri101 il numero dei cicli si riferisce alle fasi di *denaturazione*, *annealing* ed *extension*.

Step PCR	EF-1α	β-TUB	H3	Tri101
<i>Denaturazione iniziale</i>	10' a 94°C	10' a 94°C	10' a 94°C	10' a 94°C
<i>Denaturazione</i>	30'' a 94°C	30'' a 94°C	30'' a 94°C	30'' a 94°C
<i>Annealing</i>	30'' a 53°C	30'' a 57°C	30'' a 58/60°C	30'' a 55/57°C
<i>Extension</i>	60'' a 72°C	90'' a 72°C	30'' a 72°C	2' a 72°C
<i>Extension finale</i>	10' a 72°C	10' a 72°C	10' a 72°C	10' a 72°C

× 30 cicli

Al termine della PCR, la rilevazione e la dimensione dei frammenti attesi sono state verificate su gel d'agarosio all'1,5%, in presenza del marker di riferimento "GelPilot 1kb Plus Ladder" (QUIAGEN). La dimensione degli amplificati ottenuti è stata di circa 600 pb per il EF-1 α , 900 pb per β -TUB, 600 pb per H3 e 1300 pb per Tri101.

Successivamente i frammenti sono stati purificati con il kit ExoSAP-IT che consiste di due enzimi idrolitici, l'esonucleasi I (20 U/μl) e la fosfatasi alcalina da *Pandalus borealis* 1 U/μl, necessari per allontanare l'eccesso di primer e dNTP. La purificazione si conclude con uno step di incubazione a 37 °C per 30 min e uno di inattivazione degli enzimi idrolitici ad 80°C per 15 min.

Il sequenziamento bidirezionale dei prodotti di amplificazione purificati è stato effettuato mediante il sequenziatore automatico ABI PRISM[®] (3100 Genetic Analyzer). La reazione di marcatura è stata allestita in un volume di 5 μl comprendente 1 μl di MMIX (Big Dye[®] Terminator v 3.1 Cycle sequencing RR-100, Applied Biosystem), 1 μl di diluente (Big Dye[®] Terminator v 1.1, Applied Biosistem) e 0,5 μl di primer 1 μM. Le condizioni di marcatura hanno previsto 25 cicli impostati come segue: 96 °C per 10 s, 50 °C per 5 s e 60 °C per 4 min. Il frammento marcato è stato purificato su colonnine resinose di Sephadex[®] G50 (SIGMA-ALDRICH), denaturato a 96 °C per 5 min in presenza di formammide ed infine caricato nel sequenziatore automatico di DNA.

Analisi filogenetiche

Le sequenze nucleotidiche sono state messe a confronto con le sequenze depositate nei database database NCBI e Fusarium Database utilizzando il *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*. L'allineamento multiplo delle sequenze dei frammenti di EF-1α, β-TUB, H3 e Tri101 è stato effettuato mediante MEGA5 e il metodo Maximum Likelihood utilizzando il software Bionumerics[®] (version 5.1, Applied Maths).

Per poter attribuire con certezza la specie e/o il lignaggio ad ognuno dei campioni analizzati, sono state inserite nell'analisi dei dati le sequenze dei tredici lignaggi dell'FGC definiti da O'Donnell (2000, 2004), Ward (2002), Starkey (2007), O'Donnell (2008) e Yli-Mattila (2009)

e di due specie (*F. crockwellense* e *F. culmorum*) utilizzate come *outgroup*, depositate nel database NCBI (Tabella 3).

Tabella 3. Elenco degli isolati dei quali sono state considerate le sequenze depositate per ciascun gene nel database NCBI.

Sequenze di riferimento depositate sul Database NCBI			
NRRL	Specie	NRRL	Specie
28585	<i>F. austroamericanum</i> (FG1)	37605	<i>F. vorosii</i> (FG10)
2903	<i>F. austroamericanum</i> (FG1)	38208	<i>F. vorosii</i> (FG10)
28721	<i>F. meridionale</i> (FG2)	36905	<i>F. gerlachii</i> (FG11)
29010	<i>F. meridionale</i> (FG2)	38380	<i>F. gerlachii</i> (FG11)
26196	<i>F. boothii</i> (FG3)	46722	<i>F. aethiopicum</i> (FG12)
29020	<i>F. boothii</i> (FG3)	46710	<i>F. aethiopicum</i> (FG12)
25797	<i>F. mesoamericanum</i> (FG4)	45665	<i>F. ussurianum</i> (FG13)
29148	<i>F. mesoamericanum</i> (FG4)	45681	<i>F. ussurianum</i> (FG13)
26754	<i>F. acaciae-mearnsii</i> (FG5)		
26156	<i>F. asiaticum</i> (FG6)		
6101	<i>F. asiaticum</i> (FG6)		Specie outgroup
29169	<i>F. graminearum</i> (FG7)		
5883	<i>F. graminearum</i> (FG7)		
29297	<i>F. cortaderiae</i> (FG8)	NRRL	Specie
29306	<i>F. cortaderiae</i> (FG8)	6484	<i>F. crockwellwense</i>
31238	<i>F. brasiliicum</i> (FG9)	7160	<i>F. culmorum</i>
31281	<i>F. brasiliicum</i> (FG9)	7161	<i>F. culmorum</i>

Analisi di geni coinvolti nella biosintesi dei tricoteceni

Per il rilevamento di geni del *cluster* biosintetico dei tricoteceni è stata eseguita una “Multiplex PCR” utilizzando primer specifici per i geni Tri5 e Tri7 (Quarta *et al.*, 2005; 2006) utili a differenziare i genotipi DON (ceppi potenzialmente produttori di DON) da quelli NIV

(ceppi potenzialmente produttori di NIV), primer per l'identificazione del gene *Tri3* per determinare la potenziale capacità dei diversi ceppi di produrre i derivati del DON, 3ADON e 15ADON (Quarta *et al.*, 2006) e infine primer specifici per il gene *Tri13* (Wang *et al.*, 2008) che discrimina chemiotipi potenzialmente produttori di 15ADON, 3ADON e NIV.

E' stata eseguita una multiplex PCR per distinguere genotipi DON (ceppi potenzialmente produttori di DON) da quelli NIV (ceppi potenzialmente produttori di NIV) utilizzando primers *Tri5* (3551H: 5'-ACTTCCCACCGAGTATTTT-3', 4056H: 5'-CAAAAAGTGTGTTCCACTGCC-3') e *Tri7* (*Tri7F340*: 5'-ATCGTGTACAAGGTTTACG-3', *Tri7R965*: 5'-TTCAAGTAACGTTTCGACAAT-3') in accordo con Quarta *et al.* (2005, 2006), e primers per rilevare la presenza di *Tri3* (*Tri3F971*: 5'-CATCATACTCGCTCTGCT-3', *Tri3F1325*: 5'-GCATTGGCTAACACATGA-3', *Tri3R1679*: 5'-TT(AG)TAGTTTGCATCATT(AG)TAG-3') per determinare la potenziale produzione dei derivati acetilati 3-ADON and 15-ADON (Quarta *et al.*, 2006).

Per ogni chemiotipo il frammento atteso è di: 525 bp e 354 bp per 3-ADON, 525 bp e 708 bp per 15-ADON, 625 bp per NIV e 625 bp e 525 bp per gli isolati produttori di NIV e DON.

Le reazioni di PCR per l'amplificazione dei geni *Tri5*, *Tri7* e *Tri3* sono state condotte in un volume totale di 50 µl, 10 ng di DNA genomico, 5 µl 10X Hot Master Taq Buffer con MgCl₂ (5PRIME), 1 µl 10 mM dNTPs (Applied Biosystem), 1 µl di ogni primer (10 pmol/µl) e 0,4 µl 5U/µl Hot Master Taq DNA polymerase (5PRIME). Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in termocicizzatore Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems adottando le seguenti condizioni: 94 °C per 10 min, seguito da 35 cicli a 94 °C 30 s 53 °C 30 s 72 °C 30 s ed estensione finale a 72 °C per 10 min.

La reazione per l'amplificazione del gene *Tri13* è stata condotta in un volume di 25 µl contenenti 30 ng DNA genomico, 2,5 µl 10X Hot Master Taq Buffer con MgCl₂ (5PRIME), 0,5 µl 10 mM dNTPs (Applied Biosystem), 0,5 µl primer (10 pmol/µl) e 0,2 µl 5U/µl Hot Master

Taq DNA polymerase (5PRIME). Le reazioni di PCR sono state eseguite in termocicizzatore Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems con i seguenti parametri di amplificazione: 94 °C per 10 min, seguito da 30 cicli a 94 °C 1 min 58 °C 40 s 72 °C 40 s ed estensione finale a 72 °C per 7 min.

Al termine delle PCR, la rilevazione e la dimensione dei frammenti attesi sono state verificate su gel d'agarosio all'1,5%, in presenza del marker di riferimento "GelPilot 1kb Plus Ladder" (QUIAGEN).

Analisi delle micotossine mediante HPLC

La capacità degli isolati di *F. graminearum* di produrre micotossine è stata saggiata utilizzando il metodo cromatografico High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Per favorirne la crescita, gli isolati sono stati inoculati in PDA (Potato Dextrose Agar), e successivamente trasferiti su 50g di riso precedentemente sterilizzato (45% di umidità) e posto ad incubare a 26°C per circa tre settimane (Leslie e Summerell 2006). In seguito, le colture sono state poste ad essiccare in stufa a 50° C per 2-3 giorni, macinate e analizzate con l'HPLC.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Identificazione degli isolati mediante amplificazione e sequenziamento dei geni TEF, β -tub, H3 e Tri101.

L'elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti dagli isolati fungini ha evidenziato un unico amplicone delle dimensioni attese per ciascuna regione genica bersaglio (Figura 3).

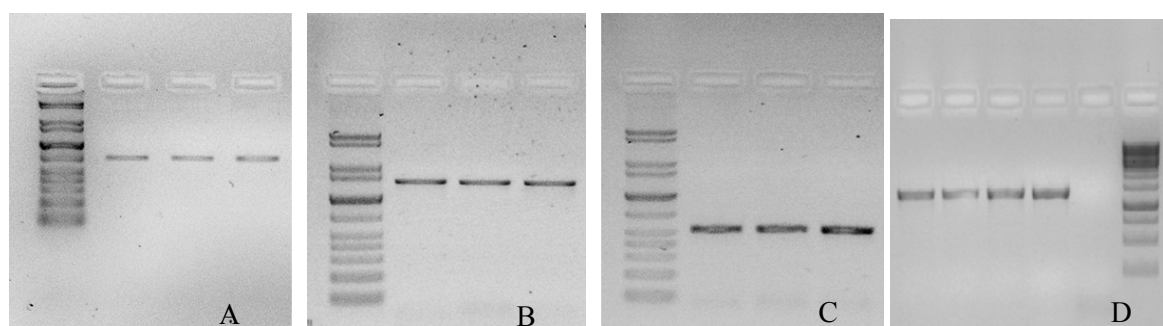


Figura 3. Prodotti di amplificazione per EF-1 α (A), β -TUB (B), H3 (C) e TRI101 (D).

Marker 1Kb

Gli elettroferogrammi delle singole sequenze sono stati analizzati mediante il software Sequencing Analysis 5.2.

Le sequenze *forward* e *reverse* risultanti da ciascun isolato fungino 5' e 3', poiché frequentemente, in queste regioni, viene riscontrata una lettura di bassa qualità da parte del sequenziatore, e successivamente assemblate in sequenze "contig" in modo da ottenere sequenze sovrapponibili.

La lunghezza delle sequenze nucleotidiche è risultata di 463 bp per EF-1 α , 247 bp per β -TUB, 1211 bp per Tri101 e 406 bp per H3.

In fase preliminare, le sequenze sono state messe a confronto con le sequenze depositate nei database NCBI e Fusarium Database utilizzando il programma *BLAST* che permette di confrontare la sequenza di

interesse con un database di sequenze già conosciute, e di identificare tra queste ultime quelle che presentano somiglianze con la sequenza di interesse. È stata considerata, come termine di comparazione tra le sequenze ottenute per gli isolati di *F. graminearum* italiani e quelle corrispondenti ai lignaggi depositati nei database, la percentuale di somiglianza.

L'allineamento multiplo delle sequenze dei frammenti di EF-1 α , β -TUB e H3 e Tri101 è stato effettuato mediante l'algoritmo MEGA5 utilizzando il software Bionumerics[®] (version 5.1, Applied Maths).

Per poter attribuire con certezza la specie e/o il lignaggio ad ognuno dei campioni analizzati, sono state inserite nell'analisi dei dati le sequenze (Tabella 3) dei tredici lignaggi dell'FGC definiti da O'Donnell (2000, 2004), Ward (2002) e Starkey (2007) O'Donnell (2008) e Yli-Mattila (2009) e di due specie (*F. crockwellense* e *F. culmorum*) utilizzate come *outgroup*, depositate sul database NCBI. Sono stati elaborati quattro alberi filogenetici, ognuno dei quali ha evidenziato la variabilità dei geni EF-1 α , β -TUB, H3 e Tri101 (Figure 4 A, B, C, D e E).

Figura 4A Albero filogenetico del gene TEF con il metodo Maximum Likelihood.

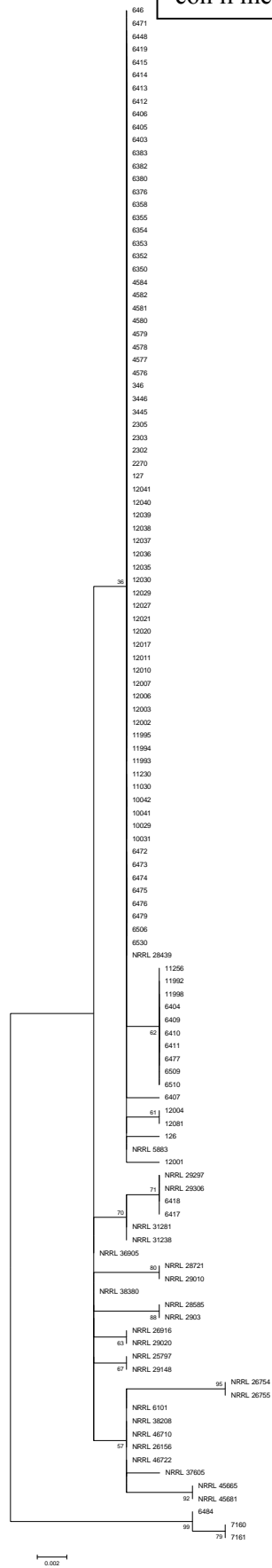


Figura 4A TEF Analisi filogenetica molecolare basata su analisi di sequenze di TEF, utilizzando il metodo *Maximum Likelihood*

La storia evolutiva è stata ottenuta utilizzando il metodo *Maximum Likelihood* basato sul modello di Tamura-Nei [Tamura K. and Nei M. (1993)]. Viene visualizzato l'albero con il valore logaritmico di probabilità più alto (-829.9570). La percentuale degli alberi nei quali i taxa correlati si raggruppano insieme è mostrata accanto ai rami. L'albero iniziale per la ricerca euristica è stato ottenuto automaticamente, come segue: quando il numero di siti comuni era <100 o meno di un quarto del numero totale di siti, è stato utilizzato il metodo *Maximum Likelihood*; in alternativa, è stato utilizzato il metodo BIONJ con matrice di distanza MCL. L'albero è disegnato in scala, con le lunghezze dei rami misurate nel numero di sostituzioni per sito. L'analisi ha coinvolto 119 sequenze nucleotidiche. Posizioni dei codoni inserite sono state: 1° + 2° + 3° + Non codificante. Tutte le posizioni che contengono lacune e dati mancanti sono stati eliminati. C'erano un totale di 450 posizioni nel *dataset* finale. Le analisi evolutive sono state condotte in MEGA5 [Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011)].

Figura 4B Albero filogenetico del gene β -TUB con il metodo Maximum Likelihood.

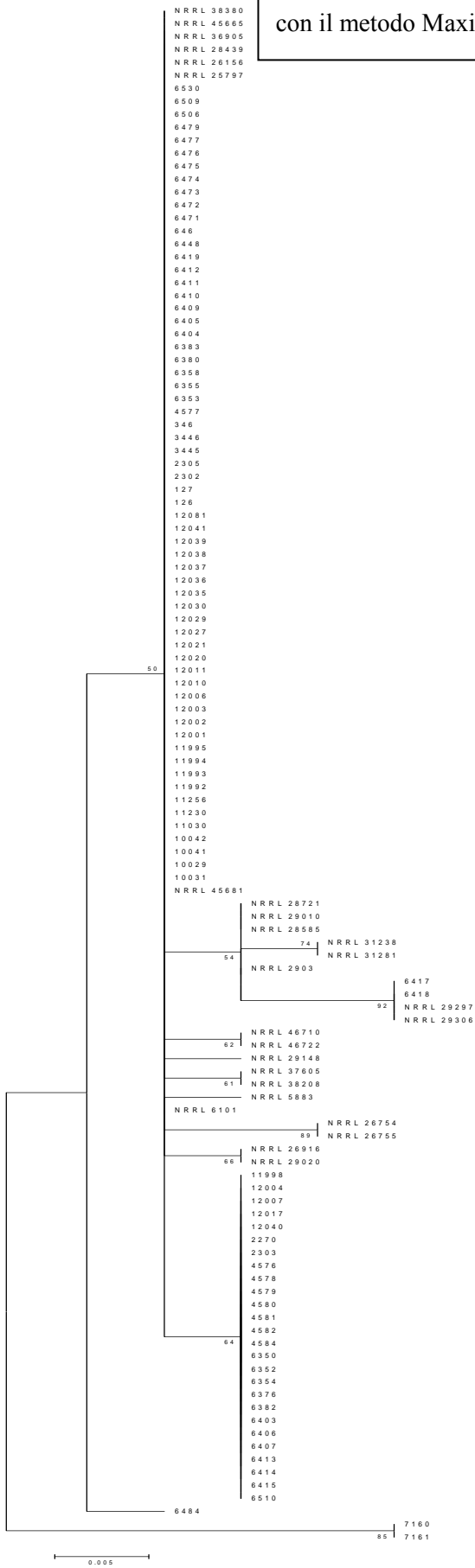


Figura 4B β TUB. Analisi filogenetica molecolare basata su analisi di sequenze di β TUB, utilizzando il metodo *Maximum Likelihood*

La storia evolutiva è stata ottenuta utilizzando il metodo *Maximum Likelihood* basato sul modello di Tamura-Nei [Tamura K. and Nei M. (1993)]. Viene visualizzato l'albero con il valore logaritmico di probabilità più alto (-464.0253). La percentuale degli alberi nei quali i taxa correlati si raggruppano insieme è mostrata accanto ai rami. L'albero iniziale per la ricerca euristica è stato ottenuto automaticamente, come segue: quando il numero di siti comuni era <100 o meno di un quarto del numero totale di siti, è stato utilizzato il metodo *Maximum Likelihood*; in alternativa, è stato utilizzato il metodo BIONJ con matrice di distanza MCL. L'albero è disegnato in scala, con le lunghezze dei rami misurate nel numero di sostituzioni per sito. L'analisi ha coinvolto 119 sequenze nucleotidiche. Posizioni dei codoni inserite sono state: 1° + 2° + 3° + Non codificante. Tutte le posizioni che contengono lacune e dati mancanti sono stati eliminati. C'erano un totale di 245 posizioni nel *dataset* finale. Le analisi evolutive sono state condotte in MEGA5 [Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011)].

Figura 4C Albero filogenetico del gene Tri101 con il metodo Maximum Likelihood.

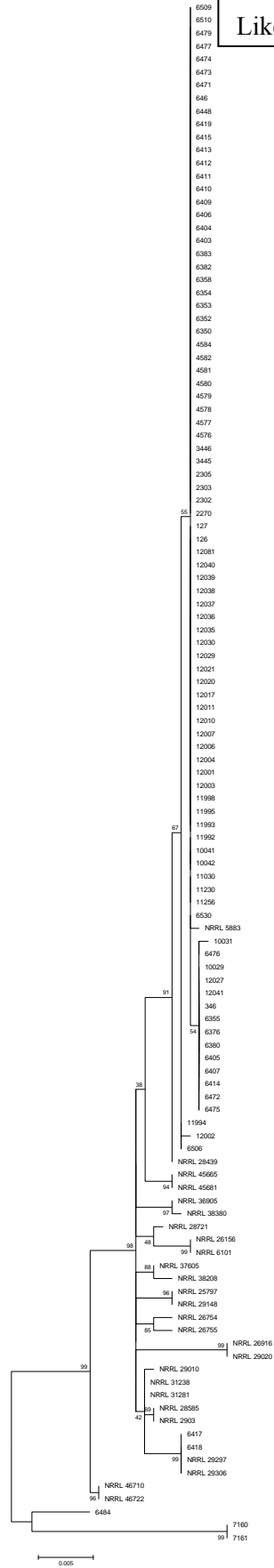


Figura 4C Tri101. Analisi filogenetica molecolare basata su analisi di sequenze di Tri101, utilizzando il metodo *Maximum Likelihood*

La storia evolutiva è stata ottenuta utilizzando il metodo *Maximum Likelihood* basato sul modello di Tamura-Nei [Tamura K. and Nei M. (1993)]. Viene visualizzato l'albero con il valore logaritmico di probabilità più alto (-2388.7334). La percentuale degli alberi nei quali i taxa correlati si raggruppano insieme è mostrata accanto ai rami. L'albero iniziale per la ricerca euristica è stato ottenuto automaticamente, come segue: quando il numero di siti comuni era <100 o meno di un quarto del numero totale di siti, è stato utilizzato il metodo *Maximum Likelihood*; in alternativa, è stato utilizzato il metodo BIONJ con matrice di distanza MCL. L'albero è disegnato in scala, con le lunghezze dei rami misurate nel numero di sostituzioni per sito. L'analisi ha coinvolto 119 sequenze nucleotidiche. Posizioni dei codoni inserite sono state: 1° + 2° + 3° + Non codificante. Tutte le posizioni che contengono lacune e dati mancanti sono stati eliminati. C'erano un totale di 1211 posizioni nel *dataset* finale. Le analisi evolutive sono state condotte in MEGA5 [Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011)].

Figura 4D Albero filogenetico del gene H3 con il metodo Maximum Likelihood.

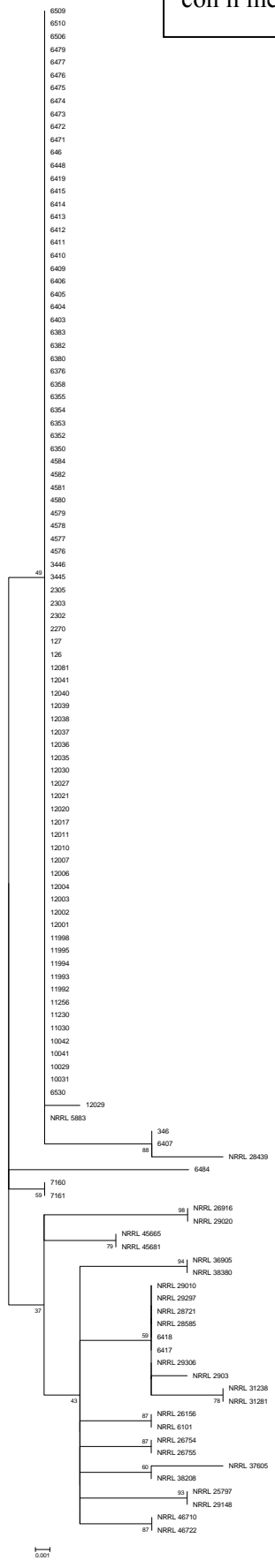


Figura 4D H3. Analisi filogenetica molecolare basata su analisi di sequenze di H3, utilizzando il metodo *Maximum Likelihood*

La storia evolutiva è stata ottenuta utilizzando il metodo *Maximum Likelihood* basato sul modello di Tamura-Nei [Tamura K. and Nei M. (1993)]. Viene visualizzato l'albero con il valore logaritmico di probabilità più alto (-833.6317). La percentuale degli alberi nei quali i taxa correlati si raggruppano insieme è mostrata accanto ai rami. L'albero iniziale per la ricerca euristica è stato ottenuto automaticamente, come segue: quando il numero di siti comuni era <100 o meno di un quarto del numero totale di siti, è stato utilizzato il metodo *Maximum Likelihood*; in alternativa, è stato utilizzato il metodo BIONJ con matrice di distanza MCL. L'albero è disegnato in scala, con le lunghezze dei rami misurate nel numero di sostituzioni per sito. L'analisi ha coinvolto 119 sequenze nucleotidiche. Posizioni dei codoni inserite sono state: 1° + 2° + 3° + Non codificante. Tutte le posizioni che contengono lacune e dati mancanti sono stati eliminati. C'erano un totale di 406 posizioni nel *dataset* finale. Le analisi evolutive sono state condotte in MEGA5 [Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011)].

Figura 4E Albero totale. Analisi filogenetica molecolare basata su analisi di sequenze di TEF, β -TUB, Tri101 e H3, utilizzando il metodo *Maximum Likelihood*

La storia evolutiva è stata ottenuta utilizzando il metodo *Maximum Likelihood* basato sul modello di Tamura-Nei [Tamura K. and Nei M. (1993)]. Viene visualizzato l'albero con il valore logaritmico di probabilità più alto (-4709.2192). La percentuale degli alberi nei quali i taxa correlati si raggruppano insieme è mostrata accanto ai rami. L'albero iniziale per la ricerca euristica è stato ottenuto automaticamente, come segue: quando il numero di siti comuni era <100 o meno di un quarto del numero totale di siti, è stato utilizzato il metodo *Maximum Likelihood*; in alternativa, è stato utilizzato il metodo BIONJ con matrice di distanza MCL. L'albero è disegnato in scala, con le lunghezze dei rami misurate nel numero di sostituzioni per sito. L'analisi ha coinvolto 119 sequenze nucleotidiche. Posizioni dei codoni inserite sono state: 1° + 2° + 3° + Non codificante. Tutte le posizioni che contengono lacune e dati mancanti sono stati eliminati. C'erano un totale di 2312 posizioni nel *dataset* finale. Le analisi evolutive sono state condotte in MEGA5 [Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011)].

Gli alberi filogenetici (figure 4A, 4B, 4C, 4D, 4E), mostrano che tutti gli isolati analizzati sono membri del lignaggio 7 o *F. graminearum sensu stricto* ad eccezione degli isolati 6417 e 6418 che invece appartengono al lignaggio 8 o *F. cortaderiae*. Questo risultato non è assolutamente ovvio, in quanto le diverse condizioni climatiche, il flusso genico e altri parametri agronomici, avrebbero potuto rivelare anche una composizione genetica più complessa.

A questo riguardo è interessante notare che diversi studi confermano l'influenza delle condizioni ambientali, come la temperatura e l'umidità, sulla distribuzione geografica delle specie di *Fusarium*.

Sulla base della variabilità dei quattro geni analizzati, è interessante notare l'omogenea presenza sul territorio italiano di *F. graminearum sensu stricto* considerata la specie (lignaggio) più pericolosa a causa del profilo tossicologico che include tutti i chemio tipi (3A-DON, 15A-DON e NIV).

Caratterizzazione genotipica dei profili micotossinogenici dei principali geni coinvolti nella biosintesi dei tricoteceni

In questo studio, inoltre, sono stati analizzati un gruppo di 94 campioni isolati dai cereali in Italia appartenenti al *FGC* per identificare il profilo molecolare e chimico dei chemiotipi (Desjardins, 2008). Tutti i prodotti di amplificazione hanno rispecchiato le dimensioni attese, come si può vedere in figura, in cui è riportato l'esempio di una corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione dei frammenti amplificati.

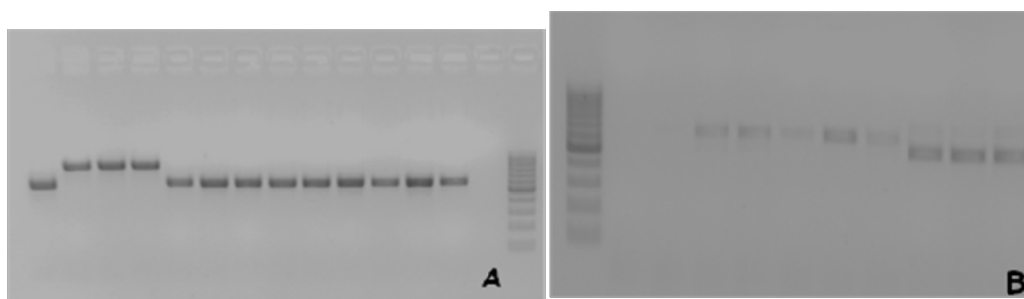


Figura 5. Prodotti di amplificazione per TRI13 (A) e TRI3, TRI5, TRI7 (B).

La tabella 4 mostra la frequenza dei chemiotipi molecolari presenti nella popolazione italiana di *F. graminearum* analizzata in questo studio.

Tabella 4. Chemiotipo molecolare degli isolati appartenenti al *FGC*

Chemotipo molecolare	Numero di isolati	ITEM
3 AcDON	1	126
15 AcDON	80	646-2270-2302-2303-2305-4576-4577-4578-4579-4580-4581-4582-4584-6350-6352-6353-6354-6355-6358-6376-6380-6382-6383-6403-6404-6405-6406-6407-6409-6410-6411-6412-6413-6416-6448-6471-6472-6473-6474-6475-6476-6477-6478-6479-6506-6509-6510-6530-9305-10029-10041-10042-11030-11230-11256-11992-11993-11994-11995-11998-12001-12002-12003-12004-12006-12007-12010-12011-12017-12020-12021-12027-12029-12036-12037-12038-12039-12040-12041-12081
NIV	13	127-346-351-3445-3446-6414-6415-6417-6418-6419-10031-12030-12035

Tutti e tre i chemiotipi sono presenti nella popolazione di *F. graminearum* studiata. Infatti, in seguito alle analisi molecolari, circa l'86% degli isolati risulta essere potenzialmente produttore di DON, mentre solo il 14% è potenziale produttore di NIV. Il chemiotipo più presente è stato il 15A-DON, e solo un isolato è risultato potenzialmente produttore di 3A-DON, mentre è stata riscontrata una minor presenza di chemiotipi NIV.

Questi risultati sono stati confermati dai due differenti set di primer utilizzati (Quarta *et al.*, 2006 Wang *et al.*, 2008).

I risultati sulla frequenza di distribuzione del chemiotipo sono comparabili con quelli ottenuti da altri autori. Jennings e collaboratori (2004), in uno studio in cui sono stati analizzati isolati inglesi e gallesi, hanno evidenziato che il chemiotipo predominante è DON rispetto piuttosto che NIV. Similmente, una ricerca condotta su isolati canadesi dimostra che il chemiotipo più diffuso è quello DON, con una predominanza del chemiotipo 15A-DON rispetto al 3 A-DON (Guo *et al.*, 2008).

Studi precedenti condotti in Italia hanno considerato solo aree geografiche più ristrette, (Prodi *et al.*, 2009), invece, la variabilità dei chemiotipi, riscontrata nella popolazione di *F. graminearum* considerata in questo studio, è presente su tutto il territorio italiano, dato che, gli isolati analizzati provengono da zone a coltivazione cerealicola della Puglia, Basilicata, Marche, Emilia Romagna, Lombardia e Friuli Venezia Giulia, anche se le condizioni ambientali sono differenti.

Caratterizzazione chimica (chemotipi) dei profili micotossinogenici dei principali geni coinvolti nella biosintesi dei tricoteceni

Poiché la presenza di un prodotto di amplificazione esprime solo la possibilità di una particolare tossina di essere prodotta, sono state eseguite le analisi chimiche per avere conferma dell'effettiva biosintesi della tossina.

Per saggiare la capacità degli isolati di produrre micotossine è stata effettuata un'analisi con il metodo cromatografico *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Tali analisi, svolte su 51 isolati, confermano i dati molecolari, infatti, il chemiotipo più presente è stato il 15A-DON; inoltre solo un isolato è risultato potenzialmente produttore di 3A-DON, ed è stata riscontrata una minor presenza di chemiotipi NIV. La tabella 5 mostra il confronto tra i dati molecolari e quelli chimici.

Tabella 5. Confronto tra dati molecolari e dati chimici.

Molecolare	3A-DON	15A-DON	DON	NIV
3A -DON	126		126	
15 A -DON			646	
15 A -DON		2302	2302	
15 A -DON			2303	
15 A -DON			2305	
NIV				3445
15 A -DON			4576	
15 A -DON			4577	
15 A -DON		4578	4578	
15 A -DON			4579	
15 A -DON			4580	
15 A -DON			4582	
15 A -DON			4584	
15 A -DON			6350	
15 A -DON		6352	6352	
15 A -DON			6354	
15 A -DON			6357	
15 A -DON		6358	6358	
15 A -DON			6376	
15 A -DON			6380	
15 A -DON			6382	
15 A -DON			6383	
15 A -DON		6403	6403	
15 A -DON			6404	
15 A -DON		6405	6405	
15 A -DON			6406	
15 A -DON			6407	
15 A -DON			6409	
15 A -DON			6410	
15 A -DON			6411	
15 A -DON			6412	
15 A -DON		6413	6413	
15 A -DON			6416	

NIV				6419
15 A -DON			6448	
15 A -DON			6471	
15 A -DON			6472	
15 A -DON			6473	
15 A -DON			6474	
15 A -DON			6475	
15 A -DON			6476	
15 A -DON			6478	
15 A -DON			6479	
15 A -DON			6506	
15 A -DON			6509	
15 A -DON			6510	
15 A -DON		6530	6530	
15 A -DON		9305	9305	
15 A -DON		10029	10029	
NIV				10031
15 A -DON		10042		

E' interessante notare che diversi studi confermano l'influenza delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, sulla distribuzione geografica delle specie di *Fusarium* sui cereali in Europa.

Infatti, mentre nel nord Europa (Scandinavia) e Russia settentrionale, specie produttrici di tricoteceni B, come *F. sporotrichioides* e *F. langhsethiae*, sono fra le più diffuse sul frumento, in quanto probabilmente più adattabili a basse temperature, al centro Europa, nelle isole Britanniche e al sud Europa, *F. graminearum* si alterna con altre specie associate alla fusariosi della spiga come *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *F. poae* nell'essere la specie predominante su frumento tenero e duro (Logrieco *et al.*, 2005, 2006).

D'altro canto, su mais, mentre *F. graminearum* prevale nelle regioni a clima più severo insieme a *F. subglutinans* (Polonia, Germania, Francia, Austria), nelle regioni più meridionali d'Europa caratterizzate da un clima più mite (sud Francia, Italia e Spagna) specie come *F. proliferatum* e *F. verticilloides* sono quelle predominanti.

Considerando la prevalente responsabilità delle condizioni climatiche sull'incidenza della fusariosi, le strategie di lotta da adottare devono essere essenzialmente preventive, basate quindi sulle pratiche colturali e sull'utilizzo di varietà resistenti. La conoscenza della struttura filogenetica italiana di *F. graminearum* fornisce molteplici indicazioni per la lotta e il ridimensionamento degli eventi patologici sui cereali provocati da questo agente eziologico, permettendo una migliore gestione della malattia.

L'omogeneità riscontrata rende infatti relativamente semplice lo sviluppo di efficienti programmi di miglioramento genetico per la selezione varietale, al fine di indurre una larga resistenza nei cereali interessati alla malattia, soprattutto nel frumento duro, dimostratosi più suscettibile agli attacchi di fusariosi (Moretti *et al.*, 2002).

I dati ottenuti mostrano che la struttura genetica di FGC italiano è omogenea per quel che riguarda la filogenesi, e che un'ampia variabilità dei chemiotipi potrebbe essere presente anche all'interno di una singola specie del FGC. Inoltre, la predominanza del chemiotipo 15A-DON rispetto a quello 3A-DON espone il frumento italiano a un minor rischio di tossicità perché è noto che il chemiotipo 3A-DON è molto più tossico rispetto al 15A-DON (O'Donnell *et al.*, 2004).

Infine, questi dati forniscono informazioni utili per la gestione della malattia, i regolamenti di quarantena e le strategie di coltivazione delle piante per comprendere meglio l'ecologia, l'epidemiologia e la dinamica delle popolazioni della FGC.

Un gruppo di 94 campioni isolati dai cereali in Italia appartenenti al FGC sono stati analizzati per identificare il profilo chimico e molecolare dei chemiotipi (Desjardins, 2008). Le analisi molecolari hanno dimostrato che il chemiotipo più diffuso è stato il 15A-DON, mentre è stata riscontrata una minor presenza di chemiotipi DON e NIV, e solo un isolato è potenzialmente produttore di 3A-DON.

Inoltre, le analisi chimiche effettuate su 51 isolati confermano i dati molecolari.

I dati ottenuti mostrano che la struttura genetica di FGC italiano è omogenea per quel che riguarda la filogenesi, e che un'ampia variabilità dei chemiotipi potrebbe essere presente anche all'interno di una singola specie del FGC. Inoltre, la predominanza del chemiotipo 15A-DON rispetto a quello 3A-DON espone il frumento italiano a un minor rischio di tossicità visto che è risaputo che il chemiotipo 3A-DON è molto più tossico rispetto al 15A-DON (O'Donnell *et al.*, 2004).

**Caratterizzazione di specie fungine
tossigene isolate da specie officinali
della flora mediterranea**

INTRODUZIONE

Le proprietà terapeutiche di molte piante sono tradizionalmente note agli uomini che, fin dall'antichità, le hanno utilizzate come "erbe curative". Infatti, le piante si sono rivelate le uniche risorse medicamentose che l'uomo abbia potuto utilizzare per quasi tutto il percorso della sua storia. L'impiego primitivo delle piante per scopi medicinali avveniva sulla base di esperienze empiriche maturate utilizzando direttamente la pianta stessa, fresca o essiccata (droga), oppure sottoposta a procedimenti di estrazione molto semplici, probabilmente di origine domestica, quali gli infusi e i decotti con acqua o i macerati con alcool o liquidi alcolici (tinture). L'attenzione alle piante medicinali e al loro potenziale terapeutico è un fatto tutt'altro che negativo se motivato dal desiderio di ottenere nuovi benefici dal mondo vegetale.

In Italia, l'impiego delle erbe utilizzate nella cura delle malattie ha tradizioni antichissime e raggiunge il suo maggior interesse tra il XVI e XVIII secolo, periodo in cui si ha la testimonianza di una approfondita cultura botanica. Tuttavia, dagli ultimi decenni del XX secolo fino ad oggi, tale interesse per le piante è nuovamente in auge a causa di una maggior attenzione per la salute, il benessere individuale e l'interesse per il naturale che, in quanto tale, è considerato, anche se erroneamente, sicuro. Ciò è testimoniato dal fatto che, guardando il panorama mondiale, l'impiego dei prodotti medicinali vegetali da parte della popolazione generale degli USA è cresciuto del 380% fra il 1990 e il 1997; l'aumento annuale è stato del 2,5% nel 1990 e ha raggiunto il 12,1% nel 1997. Nel Regno Unito, la fitoterapia costituisce oggi la più popolare pratica medica fra tutte le terapie complementari e in Germania una media annuale della popolazione generale pari al 65% fa ricorso ai farmaci vegetali (Frias, 2004).

Aspetto giuridico e campi di applicazione delle sostanze naturali

Nel settore erboristico per molto tempo si è operato senza precisi riferimenti normativi, così, in questi ultimi anni, i prodotti erboristici commercializzati hanno finito per essere oggetto di prelievo e valutazione da parte delle autorità sanitarie soprattutto per stabilire se dovessero essere considerati farmaci a tutti gli effetti e, quindi, da assoggettare ai criteri previsti dalla normativa di settore (DL.vo 178/91 modificato/integrato dal DL.vo 44/97) oppure potevano essere assimilati agli integratori alimentari e quindi, come tali, di libera vendita o tutt'al più da sottoporre al solo regime della notifica dell'etichetta (art. 7 del DL.vo 111/92) (Decreto legislativo 1991, 1992, 1997).

Una prima svolta orientativa è stata impressa dal Ministero della Salute che ha ritenuto opportuno collocare nel settore *alimentare* i derivati da piante utilizzati in associazione e a complemento della componente nutrizionale di integratori alimentari, proposti e consumati per ottimizzare lo stato nutrizionale o favorire le condizioni di benessere, coadiuvando le funzioni fisiologiche dell'organismo (Circolare n. 3 del 18 luglio 2002).

Questa posizione ministeriale ha utilizzato come riferimento la Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio (Direttiva 2002/46/CE) relative agli integratori alimentari che nel definirli ammettono che “essi possono costituire una fonte concentrata di sostanze aventi un effetto *fisiologico* e che nella gamma delle sostanze nutritive e d'altri elementi che possono far parte della loro composizione ci possono essere anche, in particolare, ma non in via esclusiva, gli estratti di origine vegetale” (Direttiva 2002/46/CE)

Tuttavia, la questione interpretativa della natura “alimentare” o “terapeutica” dei prodotti a base di piante è stata riaperta dalla Direttiva 2004/24/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004, che modifica la Direttiva 12 2001/83/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano e che definisce *farmaco* “ogni sostanza o associazione di sostanze presentate come aventi proprietà curative o profilattiche delle malattie umane o ogni sostanza o associazione di sostanze che possono essere utilizzate sull'uomo o somministrate all'uomo allo scopo di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche esercitando un'azione farmacologica, immunologica o metabolica ovvero di stabilire una diagnosi medica” (Direttiva 2004/24/CE e Direttiva 2001/83/CE).

La stessa Direttiva stabilisce anche la prevalenza della normativa farmaceutica per un prodotto che, tenuto conto dell'insieme delle sue caratteristiche, può rientrare contemporaneamente nella definizione di “medicinale” e nella definizione di un prodotto disciplinato da altra normativa.

La definizione di criteri distintivi, dunque, per il riconoscimento di una pianta a fini medicinali o alimentari rimane dal punto di vista della sicurezza d'uso, dell'immissione in commercio e ai fini legislativi una questione di non poco conto, soprattutto per la composizione complessa e variabile che la caratterizza.

Rischi ed effetti collaterali dei preparati a base vegetale

Quello dei rischi e dei possibili effetti collaterali indesiderati o decisamente tossici è un problema concreto, e solitamente sottovalutato per una serie di ragioni. La prima è che le

conoscenze in tema di piante e derivati sono scarse o nulle, e non solo in Italia (Wharton *et al.*, 1986).

D'altronde, diversamente da quanto si ritiene, non esiste purtroppo una tutela a priori del consumatore da parte delle istituzioni, tranne il fatto che i produttori sono tenuti a riportare sulla confezione solo i presunti effetti biologici della preparazione, ma non specifici effetti terapeutici.

Mancando un preciso ordinamento in proposito, la dimensione esatta delle reazioni tossiche, o comunque avverse, per i derivati vegetali è di difficile definizione. Ci si avvale prevalentemente di rapporti aneddotici, solitamente riguardanti reazioni gravi o casi letali, e soprattutto su segnalazioni spontanee pervenute all'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

La coltivazione delle piante officinali

In Italia, la produzione di piante officinali è stata soddisfacente nel periodo compreso fra le due guerre mondiali, tanto che era possibile l'esportazione. Dopo tale periodo si è assistito ad una riduzione della raccolta spontanea e ad una forte contrazione della coltivazione.

In realtà, in Italia, le piante officinali non sono mai state oggetto di studi approfonditi, probabilmente perché come comparto produttivo non risulta importante, anche se negli ultimi anni si è iniziato a rivolgere particolare attenzione alla possibilità di incentivare la coltivazione di piante officinali, per favorire la diversificazione della produzione agricola mediante nuovi indirizzi produttivi. La coltivazione delle officinali può contribuire ad integrare il reddito delle aziende esistenti e portare nuove iniziative.

Le piante officinali, proprio grazie alla loro rusticità e al loro uso peculiare, si prestano meglio di altre colture ad essere coltivate secondo i dettami di un'agricoltura ecocompatibile e biologica così come disciplinato dai Regolamenti UE 2078/92 e 2092/91, quest'ultimo specifico per le produzioni biologiche.

Inoltre, la coltivazione delle officinali, permettendo una diversificazione delle attuali produzioni agricole, risulta in sintonia con il Regolamento 2085/93 che stabilisce di finalizzare parte dei finanziamenti alla "riconversione, diversificazione, riorientamento e adeguamento del potenziale della produzione, comprese le produzioni di prodotti agricoli non alimentari" (AA.VV., 2000).

La decisione di coltivare piante officinali in un dato territorio non può prescindere, anzitutto, da un'approfondita indagine di mercato relativa alla verifica dei requisiti richiesti dall'industria di trasformazione e dai consumatori. Questo permetterà di selezionare un certo numero di specie particolarmente promettenti, di cui comunque dovrà essere ancora accertata l'adattabilità bio agronomica dell'ambiente in esame.

Uno dei motivi per cui i coltivatori dimostrano poco interesse per le piante officinali è senz'altro dovuto alla scarsità d'informazione e di aggiornamento tecnico nel settore. La carenza di conoscenze necessarie per effettuare in modo corretto le scelte relative alle migliori tecniche e pratiche colturali è attualmente un problema molto sentito in tutta Italia.

Le piante officinali: aromatiche e medicinali

Vengono definite "officinali" tutte le specie vegetali che, direttamente o tramite i principi attivi estratti da esse, possiedono interesse medicinale o aromatico e vengono comunemente utilizzate in erboristeria. Il termine comprende quindi sia le classiche specie aromatiche e medicinali sia un gran numero di colture destinate alla preparazione dei prodotti più diversi: cosmetici, profumi, liquori, coloranti, concianti, insetticidi, ma anche additivi alimentari ad azione conservante ed antiossidante e integratori dietetici.

Si definiscono "piante aromatiche" le specie dotate di una o più sostanze che conferiscono particolari odori e sapori e che vengono impiegate nella preparazione di bevande, profumi, cosmetici e per condire alimenti.

Esse si suddividono in specie "da essenza" e "spezie" o "piante aromatiche da condimento".

Le prime sono piante dotate di una elevata concentrazione di principi attivi ad azione profumante, costituiti da miscele complesse di sostanze organiche volatili, estratte generalmente per distillazione o mediante trattamento con solventi. Esse costituiscono un'importante materia prima per l'industria chimica fine (alimentare, farmaceutica o cosmetica).

Le maggiori produzioni mondiali di specie da essenza provengono principalmente da Paesi industrializzati. I principali Paesi produttori sono, quindi, l'Unione Europea, gli USA, il Giappone e il Canada, e le produzioni ottenute in questi Paesi alimentano un settore industriale di notevolissime proporzioni. Basti pensare che nella sola Francia il volume d'affari delle industrie del profumo e dei cosmetici nel 1990 è stato valutato pari a 6 miliardi di dollari,

mentre, la coltivazione di tali piante nei Paesi in via di sviluppo è basata sull'esistenza di mercati di esportazione.

Sotto la denominazione di “piante aromatiche da condimento” vengono invece individuate le specie comunemente adoperate in erboristeria e/o in cucina, tal quali o sottoposte a minime trasformazioni (macinazione, essiccazione ecc), eseguite soprattutto con lo scopo di aumentarne la conservabilità e la trasportabilità fuori dai luoghi di produzione.

Dal punto di vista commerciale, il settore delle spezie presenta connotazioni del tutto particolari. In linea generale, i due fattori che influenzano maggiormente la domanda delle spezie sono le abitudini culinarie delle popolazioni che ne fanno uso e le dimensioni di queste ultime.

Al contrario di quanto già visto per le specie da essenza, il cospicuo flusso commerciale che ne deriva proviene principalmente da alcuni Paesi particolarmente poveri delle aree tropicali, la produzione delle spezie gioca in queste aree un ruolo economico cruciale, in quanto rappresenta spesso la loro fondamentale risorsa per le esportazioni.

Di fatto, i Paesi in via di sviluppo, a differenza dei Paesi industrializzati, possono usufruire di ingenti quantità di manodopera a costi relativamente bassi, sul piano della qualità e dei controlli fitosanitari, le loro produzioni lasciano sovente molto a desiderare. Su questo punto sembra possibile costruire e rafforzare la competitività dei nostri prodotti.

In base alla definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, le piante medicinali, sono “tutte le specie vegetali contenenti, in uno o più dei loro organi, sostanze che possono essere utilizzate a fini terapeutici o preventivi, o che sono i precursori di sintesi chemio-farmaceutiche”. Le specie medicinali sono destinate all'industria e quindi a potenziali acquirenti assai esigenti sotto il profilo qualitativo. Per questo motivo, esse devono rispettare il triplice vincolo “qualità, sicurezza, efficacia”. La maggior parte delle specie vegetali indirizzate verso questo segmento di mercato deriva da Paesi industrializzati, in cui esse vengono coltivate con agrotecniche intensive che presuppongono largo dispendio di mezzi tecnici.

Un discorso a parte riguarda le specie per uso erboristico, utilizzate per la preparazione di infusi, tisane, decotti e preparazioni fitoterapiche per automedicazione. Questo rappresenta un settore di mercato che negli ultimi dieci anni ha avuto un incremento notevolissimo e che ancora non sembra avere esaurito la sua ascesa. Al contrario di quanto visto in precedenza, la maggior parte dei prodotti presenti sul mercato e appartenenti a questa categoria proviene da Paesi in via di sviluppo, in grado di saturare i mercati europei con merce che, dato il basso costo della manodopera, si presenta fortemente competitiva sul piano del prezzo al consumo.

Funghi tossigeni in piante officinali

Questa parte della ricerca ha avuto come oggetto di studio alcune delle piante officinali tipiche della zona Mediterranea, appartenenti alle famiglie delle Labiatae, Myrtaceae, Lauraceae, Verbenaceae. Sebbene la loro distribuzione sia cosmopolita, sono molto più diffuse nella zona mediterranea, che rappresenta il principale centro di differenziazione della famiglia. Allo stato spontaneo, molte di esse prediligono habitat nemorali, tuttavia la maggior parte preferisce ambienti aperti e soleggiati, contribuendo alla costituzione di macchie e garighe, pascoli aridi montani o pascoli umidi. Alla base del loro ampio utilizzo vi è una caratteristica istologica che le accomuna: la presenza di ghiandole e peli secretori contenenti oli essenziali lungo l'intera pianta, in particolare sul fusto e sulle foglie.

Tali piante sono conosciute per le loro proprietà antisettiche, antimicrobiche, antiossidanti, balsamiche, toniche, antispasmodiche, carminative.

Infatti, la letteratura scientifica dimostra e conferma le diverse proprietà precedentemente menzionate dovute soprattutto agli oli essenziali in esse contenuti: “*gli oli essenziali sono antibatterici (Kivanc and Akgul, 1986), antifungini (Pandey et al, 1996), e terapeutici nei trattamenti contro il cancro (Crowell, 1999)*”.

L'aumento del consumo delle piante officinali, come medicina alternativa, rende necessario l'utilizzo di corrette metodiche di raccolta, manipolazione, produzione e distribuzione che potrebbero rendere le piante sensibili a contaminazione e ad alterazione di diversa natura.

Contaminazioni e alterazioni possono manifestarsi spontaneamente in seguito all'instaurarsi di processi chimici endogeni determinati da condizioni ambientali, quali umidità, luce e temperatura, oppure possono essere indotti da agenti biotici esterni, come insetti, batteri e funghi, responsabili della produzione di micotossine.

Infatti, durante il processo di produzione, essiccamento, taglio, impacchettamento, stoccaggio e distribuzione, questi prodotti non sono sottoposti a nessun tipo di controllo che potrebbe prevenire la contaminazione e la crescita microbica.

La scarsa letteratura riguardante funghi tossigeni su piante officinali conferma la larga distribuzione e incidenza di funghi dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*.

Solo alcuni autori (Chourasia 1995, Aziz *et al.*, 1998, e Rizzo *et al.*, 2004) hanno evidenziato la presenza del genere *Fusarium* su piante officinali.

In particolare, Rizzo *et al.*(2004), per la prima volta, in Argentina, hanno identificato una elevata diversità delle specie di *Fusarium* isolate da piante officinali essiccate. Fra le 29 specie di specie di *Fusarium* isolate, la maggior parte appartengono a *F. verticillioides* e a *F.*

proliferatum che sono specie produttrici di micotossine conosciute col nome di Fumonisine (Desjardins 2006).

In minore percentuale sono state isolate specie produttrici di Tricoteceni e Zearalenoni.

Questa diversità potrebbe dipendere sia da fattori *estrinseci*, ambientali e geografici, sia da fattori *intrinseci*, relativi alle caratteristiche di ogni singola pianta officinale (Efuntoye, 1996).

Un dato interessante è che la varietà di specie fungine isolate da “*piante fresche*” è diversa rispetto a quella isolata da “*piante stoccate*”. Tali risultati potrebbero suggerire che i microrganismi presenti sulle piante officinali stoccate potrebbero essere dei contaminanti della fase del post-raccolta, poiché raramente sono rintracciabili nella normale flora microbica delle piante fresche, e probabilmente migliori metodi di stoccaggio ridurrebbero la presenza di tali microrganismi o addirittura li eliminerebbero (Efuntoye, 1996).

Per quanto concerne la realtà italiana, il fatto che non esistano dati, se non sporadici, sulla contaminazione di funghi tossigeni sulle piante officinali, rende tale campo di indagine estremamente interessante ed innovativo.

Diagnosi molecolare di funghi tossigeni su piante officinali

Molte delle sequenze utilizzate per effettuare una diagnosi molecolare della presenza di funghi tossigeni, appartengono all'operone ribosomiale nucleare, alcune di queste regioni, però, sono molto conservate e poco utili per una corretta analisi.

Per la sua variabilità intra e inter specifica, la regione ITS (*Internal Transcribed Spacer*) ribosomiale, compresa tra le sequenze 18S e 28S di rRNA, è generalmente considerata adatta ad

Essere utilizzate come *marker* diagnostico per lo studio e la caratterizzazione molecolare e per la differenziazione di specie diverse.

Il gene ITS riesce a dare un buon livello di identificazione, ma il supporto di un altro gene è necessario per una identificazione ottimale. Uno dei geni che mostra un alto livello di discriminazione tra le specie è l'ACTINA, gene definito “housekeeping”, presente in tutte le cellule eucariotiche che codifica una proteina del citoscheletro coinvolta nel movimento e nei processi cellulari.

Attività antimicrobica degli oli essenziali estratti da piante officinali

Gli oli essenziali sono composti naturali, volatili e complessi, estratti da piante aromatiche che li producono come metaboliti secondari. Molte varietà di queste piante sono localizzate in zone a clima temperato, come i paesi mediterranei e quelli tropicali, e rappresentano un patrimonio importante della farmacopea tradizionale. Gli oli essenziali possono essere prodotti da tutti gli organi della pianta: fiore, foglie, gemme, semi, frutti ed anche legno e radici ed essere raccolti in cellule secretorie, cavità, canali, cellule epidermiche o tricomi secretori. Esempari di diversa origine della stessa specie vegetale possono avere una composizione chimica quantitativamente o talvolta anche qualitativamente differente, a causa della differenza nelle caratteristiche ambientali, quali la temperatura, l'umidità dell'atmosfera e del suolo, la composizione del suolo (presenza e/o assenza di determinati sali, alcalinità e/o acidità, ecc.), il tipo delle radiazioni luminose in dipendenza dalla latitudine, i tempi di esposizione al sole, ecc. Sono questi parametri che possono influire sul metabolismo secondario delle piante. È infinito il numero delle varianti prodotte in rapporto alla specie, al genere ed alla varietà della pianta, all'altitudine, alla composizione e all'esposizione del luogo dove cresce, agli agenti atmosferici, al clima, in ogni caso al "tempo balsamico" termine con il quale si indica il periodo in cui esiste una maggiore concentrazione dei principi attivi. Questo particolare momento può variare in relazione alle diverse parti della pianta (per esempio foglie e fiori) o anche a seconda del giorno e dell'ora di raccolta (Bakkali *et al.*, 2008).

Altra fonte di variazioni nella composizione delle droghe e delle preparazioni vegetali nominalmente uguali è costituita dai processi di lavorazione che le piante medicinali subiscono dopo la raccolta e la mietitura, o ancora la composizione chimica di una pianta non è uniforme in tutte le parti che la compongono, poiché determinati principi attivi possono essere molto concentrati in uno specifico organo, per esempio le radici, ed essere invece meno concentrati o assenti in altri.

Oggi, gli oli essenziali sono largamente impiegati come antibatterici, antifungini e insetticidi. Se ne conoscono circa 3.000 tipi, di cui circa 300 commercialmente importanti, in particolare nell'industria farmaceutica, agronomica, alimentare, sanitaria, cosmetica, e profumiera. Gli oli essenziali sono una miscela naturale molto complessa, che contiene da 20 a 60 composti in concentrazioni differenti ma che si possono distinguere in due grossi gruppi: terpeni e terpenoidi (geraniolo, citronella, timolo, mentolo), e composti aromatici e alifatici (safrolo, estrapolo, eugenolo). (Bakkali *et al.*, 2008). Molte piante sintetizzano normalmente un gran numero di sostanze chimiche aventi proprietà antifungine, e che pertanto possono rivestire un interesse applicativo nella difesa delle colture agrarie. Alcune sostanze naturali, difatti, possono

integrare quei fungicidi di sintesi che costituiscono un problema per l'ambiente e la salute dei consumatori. E' dunque di grande interesse la ricerca di molecole naturali ad efficace azione antifungina.

Lo studio dell'attività inibitrice di sostanze vegetali sulla crescita di microrganismi fitopatogeni rappresenta una delle linee più promettenti della ricerca fitoiatrica.

Sempre più numerosi sono i risultati di evidenze sperimentali che documentano gli effetti di queste sostanze, specialmente di oli essenziali, nei confronti di funghi e batteri fitopatogeni (Dixit *et al.*, 1995; Daferera *et al.*, 2003). E' ben nota, infatti, l'attività antifungina ed antibatterica degli oli essenziali di mirto, origano, timo, dittamo, maggiorana, lavanda, rosmarino, menta piperita e ruta (Zambonelli *et al.*, 2003; Pirajno *et al.*, 2004); del gel contenuto nelle cellule parenchimatiche delle foglie di *Aloe vera* L. (Saks e Barkai-Golan, 1995), delle saponine presenti negli estratti fogliari di alcune *Asteraceae* (Cammарeri *et al.*, 2002), dei flavonoli, glucosidi e cumarine estratte da piante ornamentali (Curir *et al.*, 2002), di miscele di estratti di chiodi di garofano, olio di neem, pepe, olio di senape ed olio di cannella e di altre sostanze naturali; di estratti di seme di pompelmo; ed, infine, di sostanze estratte da diverse specie di *Salvia* (Minuto *et al.*, 2006).

Gli oli essenziali sono conosciuti per le loro proprietà antibatteriche, antivirali e antifungine, ma il meccanismo di azione degli oli essenziali sui microrganismi è stato finora poco conosciuto.

Alcuni autori hanno attribuito l'attività antimicrobica degli oli essenziali alla interazione del loro gruppo funzionale (essenzialmente il fenolo) con lo sviluppo delle cellule microbiche, mentre altri autori hanno evidenziato che gli oli essenziali causano un deterioramento della membrana citoplasmatica (Knoblock *et al.*, 1986).

E' stato anche ipotizzato che la complessa costituzione degli oli essenziali rappresenti una forte barriera all'adattamento dei patogeni che avrebbero preferito una più semplice miscela di monoterpeni.

Deans e Ritchie (1987) hanno esaminato 50 diversi oli essenziali per le loro proprietà antibatteriche contro 25 generi di batteri, usando la tecnica dell'agar-diffusione. Gli oli essenziali hanno esercitato un'inibizione nella crescita di microrganismi, dipendente dalla concentrazione dell'olio e dalla composizione chimica. Di particolare interesse è l'attività antimicrobica degli oli essenziali nei confronti dei microrganismi degli alimenti (Fyfe *et al.*, 1998; Tassou *et al.*, 1995).

SCOPO DELLA RICERCA

Nonostante vi siano molti studi riguardanti la contaminazione da micotossine e l'eventuale presenza dei funghi tossigeni sui prodotti agricoli, pochissime sono le conoscenze relative alle varie specie di piante officinali in Italia, anche se queste specie vegetali sono impiegate nella nostra alimentazione e giocano un importante ruolo economico nel nostro paese.

Per questo motivo, uno degli obiettivi di questa ricerca è stato quello di caratterizzare a livello molecolare le specie fungine eventualmente presenti sulle piante officinali tipiche della flora mediterranea, prendendo in esame geni fungini utili per studi di popolazione e speciazione, quali i geni ITS e actina.

Un altro aspetto affrontato collateralmente in questa tesi ha riguardato gli effetti degli oli essenziali sulle specie fungine tossigene di interesse alimentare; l'attività antifungina degli oli essenziali di alcune piante officinali è stata saggiata verso alcune specie fungine considerate contaminanti comuni di alimenti.

In particolare, è stata valutata *in vitro* l'attività antifungina di estratti fogliari grezzi di timo (*Thymus capitatus*) e delle infiorescenze di camomilla (*Anthemis aetnensis*) su sette isolati di funghi fitopatogeni.

Infine, è stata valutata anche l'attività citotossica degli oli essenziali su *Artemia salina*, invertebrato marino utilizzato nei saggi di tossicologia. Per citotossicità si intende l'effetto di un agente di tipo chimico, fisico o biologico in grado di indurre danno ad una cellula. Quindi, tale test ha permesso di saggiare *in vivo* l'eventuale citotossicità degli oli essenziali estratti da piante officinali.

MATERIALI E METODI

Isolamento da tessuti vegetali

L'attività svolta è stata condotta su 21 piante aromatiche provenienti da diversi vivai della provincia di Catania (vedi Tabella 6) e ha previsto l'isolamento di specie fungine da diverse piante officinali.

Per ogni singola pianta sono stati analizzati: radici, colletto, fusto, foglie laterali e foglie apicali. Gli isolamenti sono stati effettuati utilizzando le procedure di micologia classica che hanno previsto: sterilizzazione superficiale dei campioni con immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio al 2% per 1 minuto, due lavaggi con acqua distillata sterile; i frammenti di tessuto sono stati quindi in piastre Petri contenenti PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid) addizionato con PentaCloruroNitroBenzene (PCNB), neomicina e streptomina; le piastre sono state poste ad incubare per 5-6 giorni a 26°C.

Dopo tale periodo di incubazione, le colonie fungine eventualmente sviluppatesi sono state trasferite e poi si è proceduto all'isolamento mono-sporico. Quindi si è proceduto alla loro identificazione su base morfologica secondo il sistema tassonomico di Leslie e Summerell (2006).

Gli isolati fungini analizzati in questo studio (vedi Tabella 7) sono stati prelevati da piastre di PDA (Potato Dextrose Agar) e inoculati in beute contenenti 100 ml di brodo nutritivo di Wickerham (4% glucosio, 0.3% estratto di malto, 0.3% estratto di lievito e 0.5% peptone), precedentemente sterilizzate in autoclave a 115°C per 20 min e poi raffreddate a temperatura ambiente. Per consentire la crescita del micelio fungino, le beute sono state poste in agitazione a 120 rpm alla temperatura controllata di 26°C per 2 giorni. Al termine di questo periodo, il micelio è stato recuperato mediante filtrazione, congelato e sottoposto a liofilizzazione.

Tabella 6. Piante aromatiche da cui sono stati isolati i ceppi fungini oggetto di analisi.

Campione	Anno	Pianta	Vivaio	Località
1	2010	Rosmarinus officinalis prostratus	Sicilia in Fiore	Mascali (Ct)
2	2010	Rosmarinus officinalis prostratus	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
3	2010	Rosmarinus officinalis	Il Geraneo	Piedimonte Etneo (Ct)
4	2010	Mentha	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
5	2010	Myrtus communis tarentina	Il Geraneo	Piedimonte Etneo (Ct)
6	2010	Myrtus communis	Starflora	Fiumefreddo Sicilia (Ct)
7	2010	Lippia citriadora	Starflora	Fiumefreddo Sicilia (Ct)
8	2010	Laurus nobilis	Sicilia in Fiore	Mascali (Ct)
9	2010	Salvia	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
10	2010	Timo	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
11	2010	Origano	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
12	2011	Rosmarinus officinalis	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
13	2011	Myrtus communis tarentina	Il Geraneo	Piedi monte Etneo (Ct)
14	2011	Lippia citriodora	Starflora	Pedimonte Etneo (ct)
15	2011	Timo	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
16	2011	Mentha	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
17	2011	Salvia	Il Geraneo	Piedimonte Etneo (Ct)
18	2011	Rosmarinus officinalis prostratus	Sicilia In Fiore	Mascali (Ct)
19	2011	Lippia citriodora	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
20	2011	Origano	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
21	2011	Salvia	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)

Tabella 7. Ceppi fungini analizzati in questo lavoro:

ITEM	TESSUTO	PIANTA	VIVAIO	LOCALITA'
13398	Radici	Rosmarino officinale p.	Sicilia in fiore	Mascali (Ct)
13399	Radici	Menta	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
13400	Radici			
13401	Colletto			
13404	Radici			
13405	Radici			
13406	Radici			
13407	Radici			
13408	Radici			
13409	Radici	Mirto comune	Starflora	Fiumefreddo di S. (Ct)
13410	Radici			
13411	Radici			
13412	Radici			
13413	Radici			
13414	Radici			
13415	Radici			
13416	Colletto			
13417	Colletto			
13418	Fusto			
13420	Foglie laterali			
13421	Foglie laterali			
13423	Radici	Lippia citriodora	Starflora	Fiumefreddo di S. (Ct)
13424	Radici			
13425	Radici			
13426	Radici			
13427	Radici			
13428	Radici			
13429	Colletto			
13430	Fusto			
13432	Radici	Alloro	Sicilia in fiore	Mascali (Ct)
13433	Radici			

13434	Colletto			
13435	Colletto			
13436	Fusto			
13437	Fusto			
13438	Foglie apicali			
13439	Foglie apicali			
13440	Foglie Apicali			
13441	Radici	Salvia	Linea verde	Piedimonte Etneo (Ct)
13442	Radici			
13443	Radici			
13444	Colletto			
13445	Colletto			
13446	Colletto			
13447	Fusto			
13448	Foglie Apicali			
13450	Foglie laterali			
13451	Radici	Rosmarino officinale p.	Linea verde	Piedimonte Etneo (Ct)
13453	Fusto			
13454	Fusto			
13455	Foglie apicali			
13456	Foglie apicali			
13457	Foglie laterali			
13458	Radici	Rosmarino officinale	Il Geraneo	Piedimonte Etneo (Ct)
13459	Colletto			
13460	Fusto			
13461	Foglie laterali			
13462	Colletto	Mirto comune t.	Il Geraneo	Piedimonte Etneo (Ct)
13464	Foglie laterali			
13465	Radici	Timo	Linea verde	Piedimonte Etneo (Ct)
13466	Radici			
13467	Radici			
13468	Radici			
13469	Colletto			

13470	Colletto			
13471	Colletto			
13472	Colletto			
13473	Fusto			
13475	Fogli Apicali			
13476	Radici	Origano	Linea verde	Piedimonte Etneo (Ct)
13477	Radici			
13478	Radici			
13479	Radici			
13480	Radici			
13481	Radici			
13482	Radici			
13483	Radici			
13484	Colletto			
13485	Fusto			
13486	Fusto			
13487	Fusto			
13488	Fusto			
14587	Foglie apicali	Rosmarino officinale	Linea verde	Piedimonte Etneo (Ct)
14588	Foglie apicali			
14589	Foglie apicali			
14590	Fusto			
14591	Fusto			
14592	Colletto			
14593	Radici			
14594	Radici			
14595	Foglie apicali			
14596	Foglie apicali	Mirto comune t.	Il Geraneo	Piedimonte Etneo (Ct)
14597	Foglie apicali			
14598	Fusto			
14599	Colletto			
14600	Radici			
14601	Radici			

14602	Fusto	Lippia citriodora	starflora	Fiumefreddo di S. (Ct)
14603	Fusto			
14604	Colletto			
14605	Colletto			
14606	Colletto			
14607	Radici			
14608	Radici			
14609	Radici			
14611	Fusto	Timo	Linea verde	Piedimonte Etneo (Ct)
14612	Colletto			
14613	Colletto			
14615	Radici			
14617	Radici			
14618	Foglie apicali	Menta		
14619	Fusto		Linea verde	Piedimonte Etneo (Ct)
14620	Colletto			
14621	Colletto			
14622	Radici			
14623	Radici			
14624	Foglie apicali			
14626	Fusto			
14627	Fusto			
14629	Colletto			
14630	Radici			
14631	Radici			
14632	Foglie apicali	Rosmarino officinale p.	Sicilia in fiore	Mascoli (Ct)
14633	Fusto			
14634	Fusto			
14637	Radici			
14638	Radici			
14639	Foglie apicali	Lippia citriodora	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
14640	Fusto			
14641	Colletto			

14642	Radici			
14643	Colletto			
14644	Radici			
14645	Radici			
14646	Radici			
14647	Foglie apicali	Origano	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
14648	Fusto			
14649	Colletto			
14650	Radici			
14651	Radici			
14652	Radici			
14653	Foglie apicali	Salvia	Linea Verde	Piedimonte Etneo (Ct)
14654	Fusto			
14655	Fusto			
14657	Radici			
14658	Radici			

Estrazione del DNA degli isolati fungini, amplificazioni e sequenziamento

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita secondo il protocollo del kit commerciale "DNA Purification System for food" (Wizard Magnetic, PROMEGA) su 10 mg di micelio liofilizzato polverizzato. Le prime fasi, condotte manualmente, hanno previsto la disgregazione delle componenti cellulari e l'omogeneizzazione dei campioni in seguito all'agitazione meccanica in presenza di tamponi di lisi e all'azione enzimatica dell'RNasi. Dopo la centrifugazione del lisato per 20 min alla velocità di 13000 g, le fasi successive sono state automatizzate con l'uso del robot epMotion 5075 (Eppendorf). Questo tipo di estrazione del DNA genomico si basa sull'utilizzo di biglie paramagnetiche che hanno la capacità di legare reversibilmente gli acidi nucleici, separandoli dalle altre componenti. Il robot ha eseguito numerosi lavaggi, con i tamponi del *kit*, per eliminare eventuali contaminanti e residui delle biglie con gli acidi nucleici adesi, trattenute sul fondo della provetta grazie ad un magnete. L'eluizione finale del DNA è stata effettuata in un tampone di eluizione. Per verificare l'assenza di RNA o di altri contaminanti, il DNA genomico estratto è stato controllato qualitativamente mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8%. La stima quantitativa, invece, è stata condotta tramite lettura spettrofotometrica al NanoDrop (ND 1000 Spectrophotometer, Celbio).

Successivamente, sono state amplificate le regioni genomiche corrispondenti ai geni ACT e ITS.

Le sequenze oligonucleotidiche dei primer usati per questo studio sono state: per ACT: 512F 5'-ATGTGCAAGGCCGTTTCGC-3' e 783R 5'-TACGAGTCCTTCTGGCCAT-3' (Carbone and Kohn 1999) e per ITS: ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990).

Le amplificazioni dei campioni sono state eseguite in un volume finale di 25µl, contenente 30 ng di DNA genomico, 0.75 µl di ogni primer 10 µM, 2.5 µl di buffer 10X, 0.5 µl di dNTP 10 mM ognuno e 0.13 µl di Taq 5 U/µl (Hot master Taq DNA Polymerase 5 PRIME). Per ognuno dei geni è stato impostato un programma di PCR specifico, le cui condizioni sono schematizzate nella tabella 8.

Tabella 8. Fasi delle PCR utilizzate per i geni ACT e ITS, il numero di cicli si riferisce alle fasi di *denaturazione*, *annealing* ed *extension*.

Step PCR	ACT			ITS		
Denaturazione iniziale	10'	94°C		10'	94°C	
Denaturazione	30"	94°C	30 cicli	30"	94°C	30 cicli
Annealing	30"	53°C		30"	55°C	
Extension	30"	72°C		50"	72°C	
Extension finale	7'	72°C		10'	72°C	

Al termine della PCR, la rilevazione e la dimensione dei frammenti attesi sono state verificate su gel d'agarosio all'1,5%, in presenza del *marker* di riferimento "GelPilot 1kb Plus Ladder" (QUIAGEN). La dimensione degli amplificati ottenuti è stata di circa 700 pb per ITS e 250pb per ACT.

Successivamente i frammenti sono stati purificati con il *kit* ExoSAP-IT che consiste di due enzimi idrolitici, l'esonucleasi I 20 U/μl e la fosfatasi alcalina da *Pandalus borealis* 1 U/μl, necessari per allontanare l'eccesso di primer dNTP. La purificazione si conclude con una fase di incubazione a 37°C per 30 min e una inattivazione degli enzimi idrolitici ad 80°C per 15 min.

Il sequenziamento bidirezionale dei prodotti di amplificazione purificati è stato effettuato mediante il sequenziatore automatico ABI PRISM® (3100 Genetic Analyzer). La reazione di marcatura è stata allestita in un volume di 5 μl comprendente 1 μl di MMIX (Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle sequencing RR-100, Applied Biosystem), 1 μl di diluente (Big Dye® Terminator v 1.1, Applied Biosistem) e 0,5 μl di primer 1 μM. Le condizioni di marcatura hanno previsto 25 cicli impostati come segue: 96 °C per 10 s, 50 °C per 5 s e 60 °C per 4 min. Il frammento marcato è stato purificato su colonnine resinose di Sephadex® G50 (SIGMA-ALDRICH), denaturato a 96 °C per 5 min in presenza di formammide ed infine caricato nel sequenziatore automatico di DNA.

Saggi di attività antifungina degli oli essenziali estratti da piante officinali

Gli estratti vegetali sui quali è stata valutata l'attività antifungina sono stati forniti dalla Prof.ssa L. Iauk dell'Università di Catania e sono i seguenti:

Thymus capitatus foglie (20 g)

Thymus capitatus estratto metanolico (circa 1 g) ed estratto esanico (circa 0,5 g).

Le foglie essiccate e polverizzate sono state macerate in metanolo. Il residuo ottenuto dall'evaporazione dell'estratto è stato ripreso con acqua e cloroformio. L'estratto di cloroformio è stato portato a secco e quindi estratto con n-esano e metanolo in rapporto 1:1. Successivamente entrambi gli estratti sono stati portati a secco.

Anthemis aetnensis capolini (40g)

Anthemis aetnensis estratto etilacetico-esanico

Le infiorescenze essiccate sono state macerate in 2-propanolo, per circa 24 ore. Il residuo ottenuto dall'evaporazione dell'estratto è stato trattato con una miscela 1:1 di etile acetato ed esano. Successivamente l'estratto è stato portato a secco.

Per poter condurre i saggi antifungini, gli estratti sono stati ripresi con 5 ml di metanolo e tenuti in agitazione per 24 ore.

Successivamente, sono stati trasferiti in Falcon in vetro e ridotti al Thermoblock PIERCE ReactiTherm a 70°C con flusso di azoto per essiccare la parte liquida ed infine, in base al volume raggiunto sono stati aggiunti 1ml o 2 ml di metanolo (per l'estratto di camomilla 1 ml, per il timo 2 ml).

Le specie fungine utilizzate per il nostro saggiare l'attività antifungina *in vitro* degli estratti vegetali appartengono ai generi *Aspergillus* e *Fusarium*, e, più precisamente, sono appartenenti alle seguenti specie *A. flavus*, *A. carbonarius*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, *F. verticillioides*, per saggiare l'attività antifungina degli estratti valutando lo sviluppo radiale delle colonie (Thompson, 1989; Shahi *et al.*, 2003).

Gli isolati fungini testati appartengono alla collezione della Micoteca dell'ISPA-CNR sono stati isolati da diversi prodotti alimentari e sono tutti produttori di micotossine (Vedi tabella 9).

Tabella 9. Specie fungine saggiate

Numero ITEM	Specie tossigena
7495	<i>Aspergillus carbonarius</i>
8111	<i>Aspergillus flavus</i>
11018	<i>Fusarium langsethiae</i>
11402	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
12101	<i>Fusarium proliferatum</i>
12006	<i>Fusarium graminearum</i>
12107	<i>Fusarium verticilloides</i>

Per ogni isolato sono state fatte 4 prove: con *Thymus capitatus* estratto metanolico, *Thymus capitatus* estratto esanico, *Anthemis aetnensis* e acqua sterile.

Sono state utilizzate piastre di PDA di 10 cm sulle quali sono stati adagiati i 2 dischetti (Diametro dei dischetti 0.5, OXOID Antimicrobial Susceptibility TEST DISCS) con 10µl e 40µl di estratto depositato con un capillare della capacità di 20µl.

Per ogni isolato è stata preparata una sospensione conidica in 10 ml di acqua sterile (abbiamo prelevato una quantità di micelio pari a metà piastra piccola e messo in 10 ml di acqua sterile).

La sospensione è stata spruzzata con bomboletta Ecospray Labs Chimie France.

Le colonie di tutti gli isolati sono state fatte accrescere in incubatore per 5-7 giorni su piastre di PDA a 26 °C.

L'effetto dovuto all'estratto vegetale è stato valutato nelle piastre quando le colonie delle piastre testimoni avevano ricoperto completamente la superficie del settore a propria disposizione. La crescita anche parziale delle colonie avrebbe indicato un'azione fungistatica dell'estratto, mentre l'assenza di accrescimento avrebbe indicato un'azione fungicida.

Nel primo step della ricerca è stata effettuata la semina delle specie fungine su piastre di PDA, nel secondo step, è stata effettuata l'apposizione, sulle stesse piastre, di dischetti di carta da filtro imbibiti con quantità differenti di olio di timo metanolico, timo esanico e camomilla ed un quarto dischetto di "controllo", imbibito con acqua sterile. Parallelamente, le stesse specie fungine sono state trapiantate sui terreni di coltura come bianco, verificando quotidianamente lo sviluppo del micelio fungino. La sperimentazione è stata effettuata in doppio.

Saggio biologico di citotossicità con *Artemia salina*

Il saggio biologico in questione, si avvale di animali da laboratorio invertebrati, *Artemia salina*, in genere viene usato come screening preliminare per individuare composti bioattivi.

L'*Artemia salina* è tra gli invertebrati marini di grande interesse nei saggi di tossicologia per la sua alta fecondità, il corto ciclo di vita e la possibilità di essere studiata in condizioni di laboratorio. E' un filtratore continuo e non selettivo, vive in acque salate ed ha un espressivo valore commerciale in quanto è un elemento fondamentale nella catena alimentare di molti ambienti marini.

Il saggio è stato allestito in una piastra per colture cellulari con 24 pozzetti, contenente ognuno un volume totale di 505µl così composto: una quantità di 20/30 nauplii di *Artemia salina* in 500 µl di soluzione salina e 5µl della sostanza di cui si deve testare la citotossicità.

I naupli, schiusi da 48 ore, sono sottoposti alla sostanza da testare nel mezzo di coltura a 25°C, la tossicità di solito si avverte dopo 18-24 ore.

La prova è stata ripetuta 4 volte: con *Thymus capitatus* estratto metanolico, *Thymus capitatus* estratto esanico, *Anthemis aetnensis* e acqua marina, utilizzata come controllo. L'attività citotossica è stata valutata rilevando allo stereomicroscopio il numero di larve morte rispetto al totale delle larve presenti in ogni pozzetto. I saggi sono stati ripetuti 2 volte.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Identificazione degli isolati mediante amplificazione e sequenziamento dei geni ITS e ACTINA.

Al fine di identificare i 144 ceppi fungini oggetto di studio del presente elaborato il DNA di ciascun campione è stato utilizzato per l'amplificazione e il sequenziamento di regioni parziali dei geni ITS e ACT.

Tutti i prodotti di amplificazione hanno rispecchiato le dimensioni attese, come si può vedere in figura 6, in cui è riportato l'esempio di una corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione dei quattro frammenti amplificati.

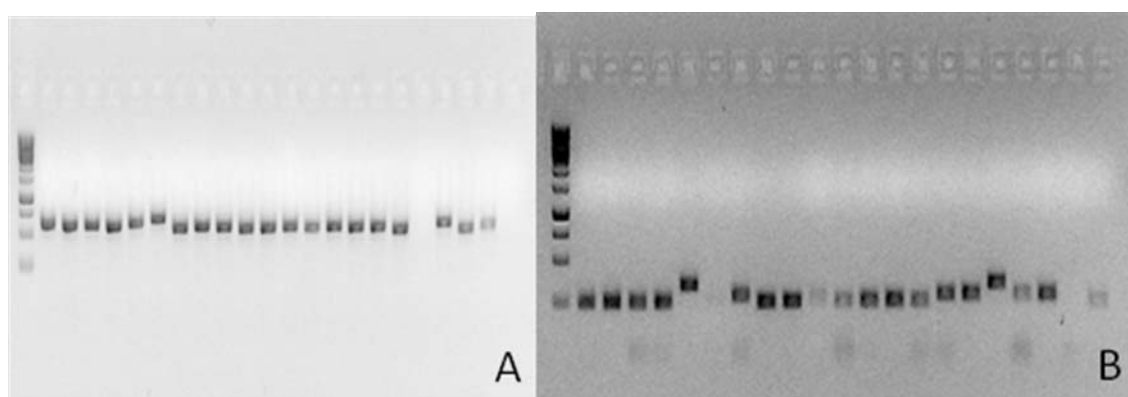


Figura 6. Prodotti di amplificazione per ITS(A) e ACT (B). Marker 1Kb

Tutti i frammenti di amplificazione marcati sono stati sottoposti a sequenziamento e i risultati grezzi della lettura sono stati acquisiti dal software Sequencing Analysis 5.2 che è stato utilizzato per visualizzare gli elettroferogrammi delle singole sequenze. Le sequenze *forward* e *reverse* risultanti da ciascun ceppo fungino, assemblate in sequenze contig, sono state tagliate all'estremità, poiché frequentemente, in queste regioni, viene riscontrata una lettura di bassa qualità da parte del sequenziatore, in modo da ottenere sequenze sovrapponibili.

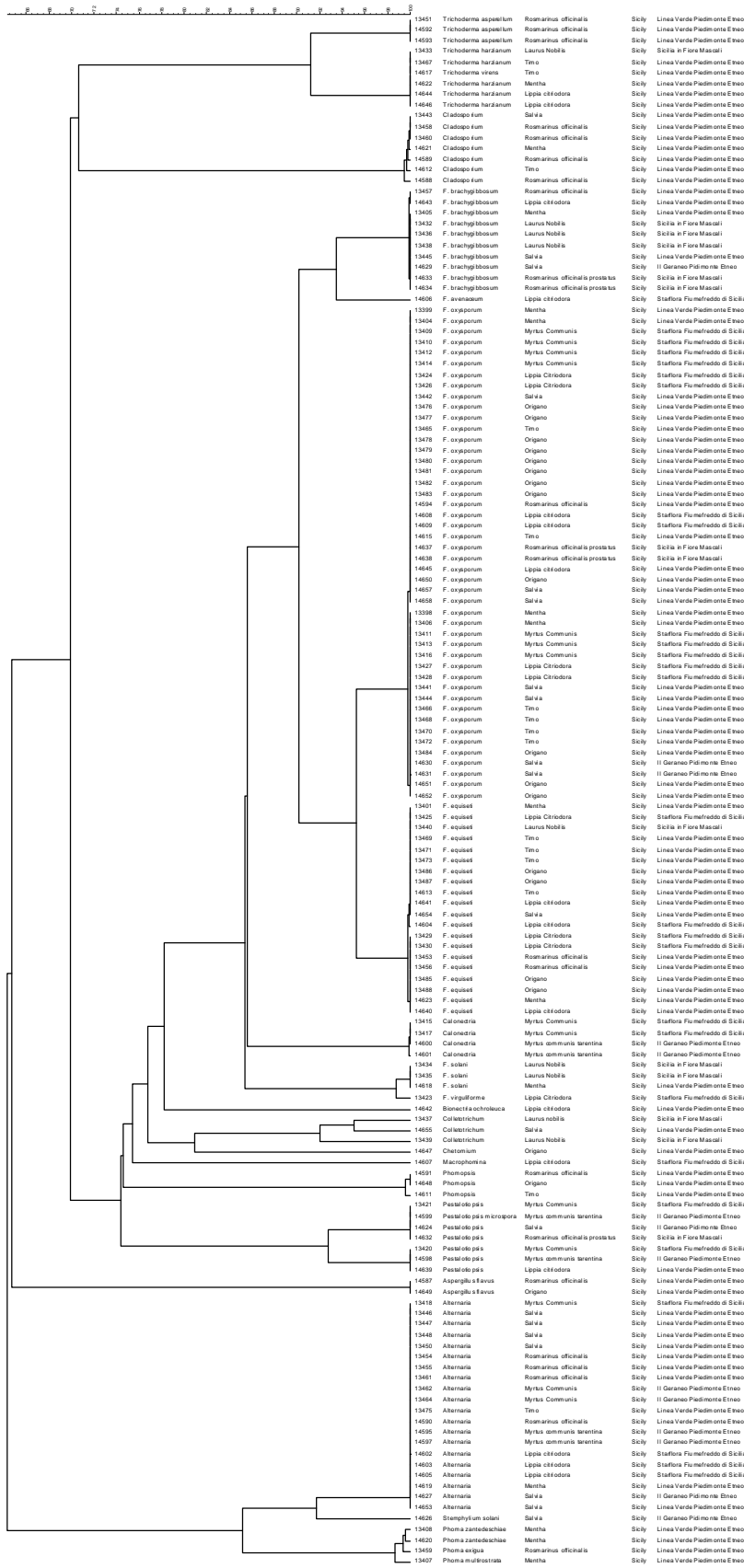
Le sequenze nucleotidiche dei frammenti di ITS e ACT sono state analizzate ed allineate con il software Bionumerics[®] (version 5.1, Applied Maths).

Le sequenze sono state anche messe a confronto con le sequenze depositate nei database NCBI e Fusarium Database utilizzando il *BLAST*, un algoritmo che permette di confrontare la sequenza di interesse con un database di sequenze già conosciute, e di identificare tra queste ultime quelle che presentano somiglianze con la sequenza di interesse. Sono stati elaborati due alberi filogenetici, ognuno dei quali ha evidenziato la variabilità dei geni ITS e ACT.

In figura 7A (ITS) e 7B (ACT) vengono riportati gli alberi delle sequenze dei geni relative a 144 isolati.

Figura 7A Albero filogenetico del gene ITS.

PhyML (CONJUG) by RAJ2.10 Gascón et al.



Gli alberi filogenetici (figure 7A e 7B), analizzati in questo studio, mostrano che i 144 isolati appartengono a 13 generi differenti. In particolare ceppi appartenenti ai generi *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Calonectria*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, e *Trichoderma* erano più rappresentati, mentre, in misura minore sono anche presenti i generi *Aspergillus*, *Stemphylium*, *Chetomium*, *Macrophomina* e *Bionectria*.

Il genere più presente è *Fusarium*. Infatti sono state identificate 6 specie tra cui: *F. oxysporum* (31,94%), *F. equiseti* (13,9%), *F. brachygibbosum* (6,94%), *F. solani* (2,1%), *F. avenaceum* (0,7%) e *F. virguliforme* (0,7%).

L'altro genere più comune è *Alternaria* e la specie predominante *A. alternata* (13,9%).

Fusarium oxysporum attacca diverse piante di una certa rilevanza commerciale. Esistono circa 120 sottospecie (formae speciales) di questo fungo (Armstrong *et al.*, 1981), ognuna delle quali colpisce in maniera selettiva una specie ospite e non ha alcun effetto su altre specie. Le varie sottospecie sono distinte fisiologicamente, ma restano indistinguibili morfologicamente. Anche *F. equiseti* è un fungo cosmopolita, e può essere presente su numerose piante ospiti. Entrambe queste specie hanno la capacità di sopravvivere molto a lungo nel suolo, sotto forma di micelio, in assenza di un organismo ospite per poi introdursi nel sistema vascolare (xilema), nel quale poi si diffonde e si moltiplica fino a provocare la morte dell'ospite. In genere, gli attacchi si manifestano sulle coltivazioni precoci in coltura forzata e semi-forzata, quando la temperatura media si assesta sui 18-20° C. Si possono però avere gravi perdite anche in pieno campo, soprattutto in caso di decorso estivo fresco; le basse temperature e gli sbalzi termici rallentano invece l'evoluzione dei sintomi.

F. oxysporum e *F. equiseti* sono potenziali produttori della tossina T-2 e altri tricoteceni, moniliformina e beavericina, micotossine dotate di elevata attività citotossica, che si evidenzia sia come inibizione della sintesi proteica e degli acidi nucleici, sia come inibizione della divisione cellulare, e sia come interferenza sull'attività di membrana. *Alternaria* è un genere di fungo colonizzatore di diversi prodotti vegetali, la specie che riveste un particolare significato micotossicologico è *A. alternata*, alla quale appartengono i ceppi tossigeni agenti di "marciume nero" dei frutti di molte piante. Nei prodotti così colonizzati possono cumularsi diversi metaboliti tossici come ad esempio, derivati dell'acido tetramico (acido tenuazonico), dibenzonopiroli (alternaioli, altenuene, altenuisolo) e perilenchinoni (alternotossine), (Bottalico e Logrieco, 1998). L'interesse micotossicologico riguarda l'elevata attività mutagena.

Valutazione dell'attività antifungina degli estratti

Gli estratti di *Thymus capitatus* saggiati hanno mostrato in genere un'azione inibitrice dello sviluppo delle colonie, ma solo in pochi casi è stata rilevata un'inibizione totale della crescita di micelio, come nei confronti degli isolati 7495 *A. carbonarius* potenziale produttore di Aflatossine e Ocratossine, e 12006 *F. graminearum sensu stricto* produttore di Tricoteceni. Inoltre, l'attività antifungina degli estratti è risultata correlata alla dose impiegata. L'estratto di *Anthemis aetnensis*, al contrario, non ha manifestato alcuna azione inibitrice nell'accrescimento delle colonie in nessuno dei funghi saggiati, inoltre, non sembra esserci correlazione fra l'attività antifungina e la dose di estratto impiegata.

L'analisi statistica dei valori medi dell'indice MGI (percentuale di inibizione della crescita del micelio) (Thompson, 1989; Shahi *et al.*, 2003), (vedi tabella 10), ha inoltre dimostrato che l'attività maggiore è stata rilevata per gli estratti metanolici di *Thymus capitatus* rispetto agli estratti esanici di *Thymus capitatus* a tutte le concentrazioni saggate e per tutti i funghi considerati, ad eccezione di due isolati (11018 e 12107), sui quali mostrano la stessa azione inibitoria. Inoltre, entrambi gli estratti di *Thymus capitatus*, risultano avere una bassa azione inibitoria nei confronti dell'isolato 12107 *Fusarium verticilloides* potenziale produttore di Fumonisine.

Tabella 10 Calcolo della percentuale di inibizione della crescita del micelio (MGI%) per gli isolati testati.

ITEM	Thymus capitatus metanolico		Thymus capitatus esanico		Anthemis aetnensis		Bianco	
	10µl	40µl	10µl	40µl	10µl	40µl	10µl	40µl
7495	100%	100%	20%	80%	0%	0%	0%	0%
8111	40%	60%	20%	60%	0%	0%	0%	0%
11018	80%	100%	80%	100%	0%	0%	0%	0%
11402	40%	60%	20%	60%	0%	0%	0%	0%
12006	100%	100%	80%	100%	0%	0%	0%	0%
12101	40%	60%	20%	40%	0%	0%	0%	0%
12107	20%	40%	20%	40%	0%	0%	0%	0%

MGI% = $(dc-dt) \times 100/dc$ in cui: dc = Crescita del diametro micelio nel controllo dt = Crescita del diametro del micelio del trattato

È probabile che l'effetto inibitorio di un olio essenziale sia dovuto al sinergismo di tutte le molecole che rientrano nella composizione, anche se sembra che l'attività delle componenti principali, i terpeni e fenoli, sia modulata dai composti minoritari, i composti aromatici. Negli ultimi anni i monoterpeni hanno trovato un largo impiego per le loro proprietà antibatteriche, antifungine e antivirali, si ritiene che i monoterpeni vengano prodotti dalle piante come difesa chimica contro insetti, batteri e funghi.

I sesquiterpeni sono, fra i composti terpenoidici quelli dotati di maggiori e più interessanti attività biologiche e farmacologiche, oltre all'attività antitumorale di attività antimicrobiche e antisettiche. In particolare, l'attività antifungina sembra sia dovuta al timolo e carvacrolo, composti fenolici, fungitossici e fungistatici di ampio spettro.

Attività zootossica degli estratti su *Artemia salina*

L'attività citotossica degli estratti metanolici ed esanici di *Thymus capitatus* e di *Anthemis aetnensis* è stata valutata rilevando allo stereomicroscopio il numero di larve morte rispetto al totale delle larve presenti in ogni pozzetto, nella tabella 11 sono schematizzati i risultati.

Tabella 11. Risultati del test di citotossicità

Tipo di estratto vegetale	Percentuale iniziale di individui	Percentuale di individui dopo 24 ore	Percentuale di individui dopo 72 ore
Timo Metanolico	100%	0	0
Timo Esanico	100%	0	0
Camomilla	100%	0	0
Acqua marina	100%	100%	75%

Già 24 ore dopo la somministrazione degli estratti ai nauplii, si osserva un effetto totale di citotossicità, infatti, tutte le larve risultano morte (figura 8A), mentre nel pozzetto "controllo" in cui è contenuta solo acqua marina non si osserva alcun cambiamento nel numero di larve presenti (figura 8B).

Dopo 72 ore, si osserva una diminuzione anche del numero delle larve del pozzetto controllo, determinato probabilmente dal naturale ciclo biologico.

Alla luce di tale risultati, si può affermare che tale saggio riesce ad identificare la presenza di qualsiasi tossina, indipendentemente dal fatto che sia conosciuta e determinabile con altri metodi, è relativamente veloce e poco costoso, di facile applicazione e fornisce indicazioni di tossicità.

Figura 8A. Effetto degli estratti dopo 24 ore

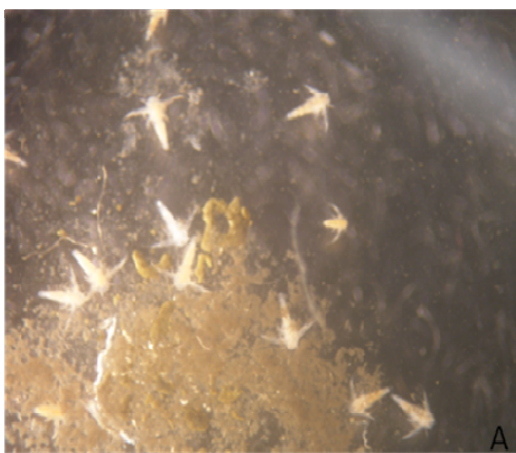
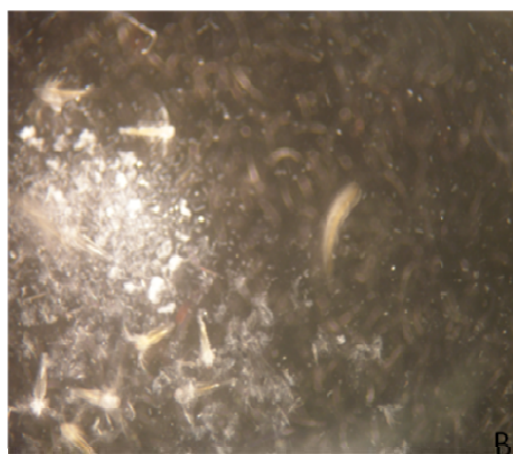


Figura 8B. Controllo.



Alla luce dei risultati ottenuti possiamo affermare che gli estratti testati in questo lavoro hanno attività antifungina determinati probabilmente da terpeni, composti fenolici e aromatici. Uno dei campi di applicazione delle potenzialità degli oli essenziali può essere quello medico-farmacologico, ma anche quello alimentare.

Ad esempio, molti terpeni o composti derivati sono tossici per le cellule dell'organismo stesso che li produce; tale tossicità costituisce un vero e proprio schermo biochimico contro l'attacco di agenti patogeni. E' proprio l'area del metabolismo secondario che fornisce la maggior parte delle sostanze naturali farmacologicamente attive. Attualmente, nonostante la crescente introduzione di farmaci di sintesi, circa il 45% degli agenti terapeutici riportati nelle farmacopee, sono di origine naturale o derivano direttamente da molecole naturali; basti pensare, ad alcune molecole ad attività antitumorale.

La diversità chimica che caratterizza le molecole naturali rende l'esplorazione delle loro caratteristiche biologiche, non solo una delle principali fonti di nuovi composti potenzialmente utilizzabili per la realizzazione di nuovi farmaci, ma anche uno strumento utile per la scoperta di nuovi meccanismi d'azione. È per questo che gli studi fitochimici rappresentano un campo in

continua evoluzione ed in continuo progresso, grazie soprattutto a nuove tecniche che hanno permesso di raggiungere con maggiore facilità e in minor tempo gli scopi desiderati; di pari passo anche gli studi di botanica, di etnobotanica, di farmacologia e di medicina hanno subito un incremento e ad oggi grazie a questa interdisciplinarietà è possibile avere molte più informazioni sulle piante medicinali e sul loro impiego razionale in campo medico.

Inoltre, al momento vengono utilizzati additivi di origine chimica come antifungini nell'industria di preparazione delle bevande ed in quella alimentare, compresa quella della produzione di pane e altri prodotti da panetteria, latticini, gelatine, sciroppi, vini ed altre bevande. Oggi però i consumatori richiedono un minor utilizzo di additivi di origine chimica, ma l'aspettativa è che gli alimenti siano il più possibile privi di microrganismi, tossine e altri fattori deterioranti. L'utilizzo di oli essenziali potrebbe quindi rivestire una grossa importanza per la conservazione di molti alimenti.

BIBLIOGRAFIA

AA.VV., 2000. Gli aspetti critici e i punti di forza di un settore emergente. Terra e Vita, Speciale Piante officinali, 1: 6-9.

Armstrong, G. M., and Armstrong, J. K. 1981. Formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. Pages 391-399 in: Diseases, Biology and Taxonomy. P. E. Nelson, T-A. Toussoun and R. J. Cook, eds Pennsylvania State University Pressa, university Park. 457pp.

Aziz, N. H., Youssef, Y.A., El-Fouly M.Z., and Moussa L. A. 1998. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins., Bot. Bull. Acad. Sin. **39**: 279–28

Bakkali F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.

Betchel, D.B., Kaleikau L.A., Gaines R.L., Seitz L.M., 1985, The effect of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernel, *Cereal chemistry*, **62**: 191-197

Bottalico A, Logrieco A. 1998 Toxigenic alternaria species of economic importance. In Sinha KK, Bhatnagar D (eds). *Mycotoxins in agriculture and food safety*, marcel dekker, new York, pp 65-108.

Bottalico A., 2002, Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali, *Informatore fitopatologico* **12**:10-16.

Brown DW., McCormick SP., Alexander HJ., Proctor RH., Desjardins AE., 2001 A genetic and biochemical approach to study trichotecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*, *Fungal Genetic Biol* 32: 121-133

Cammareri M., M. Zaccardelli, A. Errico, C. Conicella, 2002. Effetto di estrattigrezzi di diverse specie di *Aster* sulla crescita, *in vitro*, di funghi fitopatogeni. Atti IX Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia Vegetale (SIPaV), Roma, 1-2 Ottobre 2002.

Carbone, I., and Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.

Caron D. (1993) - Les fusarioses. In: «Maladies des blés et des orges». Institut Technique des Céréales et des Fourrages ITCF, Paris, 30-39.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology 2003 Mycotoxins: Risk in plant, animal and human system. Council for Agricultural Science and Technology, Task Force Report No. 139, Ames, Iowa, USA, 199 pp.

Chourasia, H. K. 1995. Micobyota and mycotoxins in herbal drugs of Indian pharmaceutical industries ., *Micol. Res.* **99**: (6) 697-703.

Corticelli, C., D'Imperio R., Assincer, Bologna Agricoltura, Settembre 2004.

Crowell, P. L. 1999. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes. *Nutrition.*, **129**: 775-778.

Curir P., C. Pasini, M. Sacco, F. D'Aquila, 2002. Risultati sperimentali di composti antifungini estratti da piante ornamentali. Atti IX Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia Vegetale (SIPaV), Roma, 1-2 Ottobre 2002.

Daferera D. J., B. N. Ziogas, M.G. Polissiou, 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, **22**, 39-44.

Deans, SG e Ritchie, G (1987) 'Antibacterial properties of plant essential oils.' *International Journal of Food Microbiology* 5:165-180

Desjardins AE, Jarosz AM, Plattner RD, Alexander NJ, Brown DW, Jurgenson JE, 2004. Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from smallholder farms in Nepal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6341-6346.

Desjardins A. E., 2006. *Fusarium* mycotoxins: Chemistry Genetics and Biology. American Phythopatological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA.

DESJARDINS A. E., 2008. Natural products Chemistry Meets Genetics: When is a Genotype a Chemotype? *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7587-7592.

Dixit S.N., H. Chandra, R. Tiwari, V. Dixit, 1995. Development of a botanical fungicide against blue mold of mandarins. *Journal of stored products research*, **31** (2), 165-172.

Efuntoye, M. O., 1996. Fungi associated with herbal drug plants during storage., *Mycopathologia* **136**: 115-118.

FYFE, L., F. ARMSTRONG J. STEWART (1998): Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plant oils and derivatives of benzoic acid: the development of synergistic antimicrobial combinations. *Int. J. Antimicrob. Agents* 9, 195-199

Frias, ENEA, Relazione in occasione della Giornata di Studio del Gruppo Scientifico Italiano Studi e Ricerche. Milano, 12 maggio 2004.

Goswami, R. S., Kistler, H.C., 2004 Heading for disaster: fusarium graminearum on cereal crops *Molecular plant pathology*, 5 (6): 515-525.

Grovey J. F., 2007, The trichothenes and their biosynthesis, *Fortschr. Chem. Org. Naturst*, 88: 63-130.

Guo X. W., Fernando W. G. D., and Seow-Brock H. Y.(2008) Population Structure, Chemotype Diversity, and Potential Chemotype Shifting of *Fusarium graminearum* in Wheat Fields of Manitoba *Plant Disease* / Vol. 92 No. 5

Forsell, J.H., Jensen, R., Tai, J.H., Witt, M., Lin, W.S., Pestka, J.J., 1987. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. *Food Chem. Toxicol.* 25, 155–162.

Italia. Decreto legislativo 29 maggio 1991, n.178. Recepimento delle direttive della Comunità Economica Europea in materia di specialità medicinali. *Gazzetta Ufficiale* n. 139, 15 giugno 1991.

Italia. Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 111. Attuazione della Direttiva 89/398/CEE concernente i prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare. *Gazzetta Ufficiale* n. 33, 17 febbraio 1992 (Suppl Ord n. 31).

Italia. Decreto legislativo n. 44 del 18 febbraio 1997. Attuazione della direttiva 93/39/CEE, che modifica le direttive 65/65/CEE, 75/318/CEE e 75/319/CEE relative ai medicinali. *Gazzetta Ufficiale* n. 54 del 6 marzo 1997 (Suppl Ord n. 49). Rettifica *Gazzetta Ufficiale*. n. 84, 11 aprile 1997.

Italia. Circolare n. 3 del 18 luglio 2002. Applicazione della procedura di notifica di etichetta di cui all'art. 7 del decreto legislativo n. 111/1992, ai prodotti a base di piante e derivati aventi finalità salutistiche. *Gazzetta Ufficiale* n. 188, 12 agosto 2002.

Hohn T.M., and Beremand P.D., 1989 Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichotecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*, *Gene* 79, 131-138

Jennings P., Coates M.E., Walsh K., Turner J.A., Nicholson P. (2004) Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales *Plant Pathology* **53**: 643-652

Laday M, Juhász A, Mulè G, Moretti A, Szécsi A, Logrieco A, 2004. Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). *European Journal of Plant Pathology* 110: 545-550.

Lee T., Han Y.K., Kim K.H., Yun S. H., Lee Y.W. 2002 Tri13 and tri7 determine deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Gibberella zeae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2148-2154

Leslie J. F., Summerell B.A., 2006. The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell Publishing; Iowa, USA*.

Leslie J. F., Anderson L., Bowden R. L., Lee Y., 2007 Inter- and intraspecific genetic variation in *Fusarium*, *International Journal of Food Microbiology*, **119**: 25-32

Logrieco A., Moretti A., Mulè G., Perrone G., Bottalico A., 2005-2006, Micotossine e funghi tossigeni nei cereali e nei prodotti cerealicoli (con particolare riferimento alla situazione europea) estratto da I GEORGOFILI-QUADERNI 2005 III

Kimura, M., I. Kaneko, *et al.* (1998). "Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101." *J Biol Chem* 273(3): 1654-61.

Kimura M., Tokai T., Takahashi-Ando N., Ohsato S., Fujimura M., 2007 Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis. Pathways, genes and evolution, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71 (9), 2105-2123

King, R.R., McQueen, R.E., Levesque, D., Greenhalgh, R.E., 1984. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 32, 1181–1183.

Kivanc, M., and Akgul, A., 1986. Antibacterial Activities of Essential Oils from Turkish Species and Citrus. *Flavour Fragr. J.*, **1**:175-179.

Knobloch, K., Weis, N e Weigand, H (1986) 'Mechanisms of antimicrobial activity of essential oils'. *Planta Medica* 52:556-557

Marasas, W.F.O., Gelderblom, W.C.A., Shepard, G. S., Wismer, H. F., 2008 Mycotoxins: A global problem, in *Mycotoxins*, edited by Leslie, J., Bandyopadhyay, R., and Visconti, A., CABI, Oxfordshire, UK, pp.139

Mc Cormick S.P., Hohn T.M., Desjardins A.E., 1996 Isolation and characterization of Tri3, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*, *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 353-359

McCormick, S. P., N. J. Alexander, *et al.* (1999). "Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*." *Appl Environ Microbiol* 65(12): 5252-6.

Miller, J. D., 1995, Fungi and mycotoxins in grain. Implication for stored product research, *Journal of Stored Products Research*, **31**: 1-16

Minuto G, C. Bruzzone, G. Romussi, A. Bisio, A. Garibaldi, 2006. Valutazione dell'efficacia antifungina di sostanze ottenute da specie di *Salvia*: primi risultati. Atti Incontri Fitoiatrici, Torino, 2-3 Marzo 2006.

Moretti A., Corazza L., Balmas V., Santori A., Ritieni A., 2002, Funghi tossigeni e micotossine: filieracerealicola. *Informatore fitopatologico* **12**:17-22

O'Donnell K., Tacke B. K., Casper H. H., 2000. Gene genealogies reveal global phylogenetic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus wheat scab. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 97:7905-7910.

O'Donnell K., Ward T. J., Geiser D. M., Kistler H. C., Aoki T., 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41:600-623.

O'Donnell, K., Ward, T. J., Aberra, D., Corby Kistler, H., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjornstad, A., Klemsdal, S. S., 2008 Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1514-1522.

Pancaldi D., Casulli F., Grazzi G., Grifoni F. (1997) - Indagine sulla fusariosi della spiga del frumento duro in Emilia-Romagna. *Informatore Fitopatologico*, 10: 43-48.

Pancaldi D., Alberti I. (2001) - Le principali malattie su foglia e spiga del frumento. *L'Informatore Agrario*, 20: 63-69.

Pandey, M. C., Sharma, J. R., and Dikshit, A. 1996. Antifungal Evaluation of the Essential Oils of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex Steud.) Wats. Cv. Praman. *Flavour Frag. J.*, **11**: 257-260.

Pasquini M., Cacciatori P., Cardone A.M., Casini F., Conca G., Corazza L., De Ninno M., Di Giambattista G., Gazza L., Infantino A., Iori A., Natalini G., Notario T., Pietrangeli F., Pancaldi D., Peruzzi P., Porta-Puglia A., Pucci N., Raimondo I., Ratti C., Riccardi M., Rubies-Autonell C., Santori A., Sarti A., Sereni L., Tassi D., Vallega V., Virzi N. (2003) - Le malattie dei frumenti in Italia. *L'Informatore Agrario*, 30: 49-56.

Pirajno G., G. Scarito, A. Salamone, 2004. Attività inibente degli oli essenziali di *Laurus nobilis* L., *Menta x piperita* L. e *Ruta graveolens* L. su *Rhizoctonia solani* Kühn e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Atti XI Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia Vegetale (SIPaV), Milano, 29 Settembre-1 Ottobre 2004.

Prodi, S. Tonti P. Nipoti, D. Pancaldi and A. Pisi (2009) IDENTIFICATION OF DEOXYNIVALENOL AND NIVALENOL PRODUCING CHEMOTYPES OF *FUSARIUM GRAMINEARUM* ISOLATES FROM DURUM WHEAT IN A RESTRICTED AREA OF NORTHERN ITALY *Journal of Plant Pathology* 91 (3), 727-731

Quarta A, Mita G, Haidukowski M, Santino A, Mulè G, Visconti A, 2005. Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Food Additives and Contaminants*, 22, 309-315.

Quarta A, Mita G, Miriam Haidukowski, Antonio Logrieco, Giuseppina Mule` & Angelo Visconti (2006) Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium* FEMS *Microbiol Lett* 259 7-13.

Rasmussen PH, Ghorbani F, Berg T, 2003. Deoxynivalenol and other *Fusarium* toxins in wheat and rye flours on the Danish market. *Food Additives and Contaminants* 20:396-404

Rizzo, I., Vedoya, G., Maurutto, S., Haidukowski, M., Varsavsky, E., 2004. Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs., *Microbiological Research* **159**: 113-120.

Saks Y., R. Barkai-Golan, 1995. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology and Technology*, **6**, 159-165.

Shahi S.K., M. Patra, A. C. Shukla, A. Dikshit, 2003. Use of essential oil as botanical- pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruits. *BioControl*, **48**, 223-232.

STARKEY D.E., T.J.WARD, T. AOKI, L.R. GALE, H.C. KISTLER, D.M. GEISER, H. SUGA, B. TÓTH, J. VARGA, K. O'DONNELL, 2007. Global molecular surveillance reveals novel Fusarium head blight species and trichothecene toxin diversity, *Fungal Genet. Biol.*, **44**, 1191.

Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**:512-526.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).

Taylor J, Jacobson D.J, Kroken S., Kasuga T., Geiser D. M., Hibbett D. S., and Fisher M. C. (2000) Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi *Fungal Genetics and Biology* **31**, 21–32

TASSOU, C., E.H. DROSINOS u. G.-J.E. NYCHAS (1995): Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. *J. Appl. Microbiol.* **78**, 593-600

Thompson D.P., 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia*, **81**, 1, 151-153.

Unione Europea. Direttiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 giugno 2002, per il ravvicinamento delle legislazioni degli stati membri relative agli integratori alimentari. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L183/51, 12 luglio 2002.

Unione Europea. Direttiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 6 novembre

2001, recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L311/67, 28 novembre 2002.

Unione Europea. Direttiva 2004/24/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004, che modifica la direttiva 2001/83/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L136/85, 30 aprile 2004.

Ward T. J., Bielawski J. P., Kistler H. C., Sullivan E., O'Donnell K., 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99 (14):9278-9283.

Wang JH, Li H-P, Qu B, Zhang J-B, Huang T, Chen F-F, Liao Y-C. (2008) Development of a generic PCR detection of 3-acetyldeoxynivalenol-,15-acetyldeoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum* clade. *Int J Mol Sci* 9:2495–2504.

Wharton R, Lewith G. Complementary medicine and the general practitioner. *BMJ* 1986; 292:1498-1500.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, New York.

Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Takayuki A., Corby Kistler, H., O'Donnell, K., 2009 A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East *Mycologia*, 101(6), 841-852.

Zambonelli A., Bianchi, M. Curini, F. Epifano, R. Bruni, M. Iotti, 2003. Effetto degli oli essenziali di *Erigeron canadensis* e *Myrtus communis* sullo sviluppo di funghi fitopatogeni *in vitro*. Atti Convegno Nazionale dell'Associazione Italiana per la Protezione delle Piante (AIPP), Sanremo, 27-28 Novembre 2003.