

Monitoraggio della presenza di deossinivalenolo (DON) nella granella di frumento tenero

INTRODUZIONE

Alcune specie fungine appartenenti al genere *Fusarium* producono, nei tessuti vegetali infetti, sostanze tossiche chiamate micotossine, tra le quali prevalenti sono fumonisine e tricoteceni (e.g. deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina, T2 e HT2) (Plizzari et al., 2008). La contaminazione da micotossine può essere un problema molto grave, come testimoniato da passate epidemie. Per ridurre i possibili danni alla salute umana e agli animali in produzione zootecnica (Piva et al., 2008), molte nazioni hanno perciò emanato leggi che fissano i livelli della loro presenza nelle colture e nei prodotti trasformati. I limiti massimi ammessi per deossinivalenolo e zearalenone nel frumento tenero sono rispettivamente di 1250 ppb (parti per miliardo o ng/g) e 100 ppb (regolamento Ce 856/2005); il limite massimo per l'ocratossina è di 5 ppb (regolamenti Ce n. 472/02 e 123/05) mentre quelli relativi a T2 e HT2 sono in corso di definizione da parte dell'UE.

Allo scopo di monitorare e, eventualmente, contenere la contaminazione da micotossine nei cereali, è stato avviato un apposito progetto di ricerca di durata triennale (2005-2008) denominato "Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali – MICO-CER", coordinato dal CRA – QCE di Roma.

Nell'ambito di tale Progetto, nel biennio 2006-2007 è stata allestita una rete di monitoraggio della produzione di frumento tenero nel Centro-Nord Italia per la presenza di deossinivalenolo (tab. 1) che ha consentito di analizzare, con metodica immunoenzimatica (test ELISA), numerosi campioni di fru-

* *Cra-Scv, S. Angelo Lodigiano (Lodi)*

** *CRA-QCE, Roma*

PROGETTO	UNITÀ OPERATIVE E STRUTTURE COINVOLTE
MICOCER Periodo: 2006-2007	<ul style="list-style-type: none"> – CRA-SCV (ex ISPECER) di S. Angelo Lodigiano (LO) – Centro Ricerche Produzioni Vegetali (CRPV) – Az. Sper.le Stuard (Parma) – Coop. Terremerse di Bagnacavallo (RA) – Consorzio Agrario di Piacenza – Consorzio Agrario di Reggio Emilia – Consorzio Agrario di Bologna e Modena – Consorzio Agrario di Forlì-Cesena-Rimini – Consorzio Agrario di Ferrara – Consorzio Agrario di Ravenna – O.P. Grandi Coltive, Ferrara – O.P. Progeo, Granarolo (BO) – Unione Seminativi – Molini Popolari Riuniti di Umbertide (PG) – Aproceve (Mestre, VE) – Consorzio Agrario di Pesaro-Urbino – Agroselviter, Università di Torino

Tab. 1 *Unità Operative e Strutture coinvolte nel progetto MICOCER*

mento tenero provenienti da aziende e centri sperimentali ubicati nelle principali aree cerealicole di Piemonte, Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto, Toscana, Umbria e Marche. Ultimate le analisi con il metodo immunoenzimatico, il 10-15% dei campioni monitorati è stato inviato al laboratorio dell'ISPA-CNR di Bari per la determinazione del DON con metodica HPLC.

In seguito all'andamento climatico della primavera 2008, classificata tra le più piovose degli ultimi due secoli, sulla base dei dati dell'Istituto di Scienze dell'Atmosfera e del Clima del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Isac-Cnr), è stato ritenuto opportuno effettuare anche per l'annata agraria 2007-08 un certo numero di analisi inizialmente non previste all'interno del progetto. Le abbondanti precipitazioni che hanno caratterizzato soprattutto l'areale del Nord Italia nel periodo di fioritura, uno degli stadi di crescita delle piante più vulnerabili nei confronti dell'attacco da parte dei patogeni, hanno portato, in seguito a una smisurata crescita del micelio fungino, a un massiccio attacco delle spighe di quasi la totalità dei cereali a paglia coltivati, con un conseguente contenuto in micotossine, almeno per quanto riguarda il deossinivalenolo, decisamente insolito e di molto superiore alla media degli altri due anni di sperimentazione.

PIANO DI CAMPIONAMENTO

Nel biennio 2006-07, il monitoraggio predisposto dal CRA-SCV di S. Ange-

lo Lodigiano, in collaborazione con il CRPV, ha permesso l'analisi con test ELISA di 1267 campioni (657 nel 2006 e 610 nel 2007), così suddivisi:

- 388 campioni, prelevati al momento della trebbiatura presso aziende di 6 regioni del Centro-Nord e riferiti a 38 varietà di frumento tenero;
- 532 campioni derivati dalla rete “on farm” delle Regioni Lombardia e Piemonte, riguardanti 22 varietà;
- 347 campioni provenienti da prove parcellari della Rete nazionale di confronto tra varietà di frumento tenero, dislocate in 13 Regioni, e riferiti a 6 varietà (Bilancia, Basco, Bolero, Bologna, Isengrain e Mieti).

Nel 2008 i campioni di frumento tenero monitorati per la presenza di deossinivalenolo sono stati in totale 196, così suddivisi:

- 96 campioni denominati “aziendali” prelevati in campo al momento della trebbiatura oppure all'arrivo nei centri di stoccaggio;
- 100 campioni derivati dalla rete “on farm” della regione Lombardia.

RISULTATI

Premettendo che come negativi sono stati considerati campioni che hanno mostrato un contenuto di deossinivalenolo inferiore a 18.5 ppb (parti per miliardo) che rappresenta il limite di rilevabilità del metodo rapido immunoenzimatico ELISA (mentre il limite di rilevabilità del metodo HPLC è pari a 20 ppb), i risultati del monitoraggio effettuato sulla granella prodotta nel 2005-06 (tabb. 2, 3 e 4) mostrano una limitata incidenza di contaminazione da DON, pari al 34% dei campioni analizzati (48% dei campioni del Nord, 6% del Centro), e un livello medio di contaminazione dei campioni positivi pari a 133 ppb per il monitoraggio della rete nazionale, a 185 ppb per il monitoraggio aziendale e a 301 ppb per la sperimentazione “on farm”, valori largamente inferiori al limite massimo di 1250 ppb fissato dall'UE. Da rilevare, comunque, che sono stati riscontrati, pur se in un limitatissimo numero di microareali e per alcune varietà, poco diffuse, valori di DON superiori al suddetto limite di 1250 ppb. In particolare, nessuna delle sei varietà della Rete nazionale ha mostrato valori superiori al limite massimo di 1250 ppb, mentre solo due varietà, una del monitoraggio aziendale (non precisata) e PR22R58 della sperimentazione “on farm” hanno superato tale limite.

I risultati relativi alla stagione 2006-07 (tabb. 5, 6 e 7) evidenziano un quadro simile o lievemente più critico di quello rilevato nella stagione prece-

REGIONI	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Piemonte	20	6	14	70	151	608
Lombardia	46	16	30	65	157	621
Veneto	30	26	4	13	337	1605
Emilia Romagna	72	31	41	57	84	503
Marche/Umbria	35	1	34	97	50	50
Totale	203	80	123	61	–	–
Varietà						
Aubusson	16	3	13	81	268	367
Blasco	23	8	15	65	147	718
Bolero	8	0	8	100	–	–
Bologna	29	6	23	79	68	180
Guadalupe	8	4	4	50	283	415
Isengrain	22	14	8	36	132	608
Mieti	24	13	11	46	58	196
Totale 7 cv	130	48	82	63	–	–
Altre 30 cv	73	32	41	56	271	1605
Totale	203	80	123	61	–	–

Tab. 2 *Monitoraggio aziendale frumento tenero 2005-06. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

VARIETÀ	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Africa	27	7	20	74	117	353
Agadir	14	1	13	93	418	418
Artico	26	10	16	62	147	319
Aubusson	27	11	16	59	175	628
Avorio	27	15	12	44	278	1178
Blasco	27	10	17	63	154	483
Bologna	14	3	11	79	109	147
Bramante	14	3	11	79	81	169
Guarni	27	8	19	70	114	213
Isengrain	9	5	4	44	338	890
Nomade	27	6	21	78	120	296
PR22R58	26	11	15	58	573	1848
Altre varietà	3	1	2	67	83	83
Totale	268	91	177	66	–	–

Tab. 3 *Monitoraggio sperimentazione “on farm” frumento tenero 2005-06. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

VARIETÀ	LOCALITÀ	CAMPIONI NORD		CAMPIONI CENTRO		CAMPIONI SUD		CAMPIONI POSITIVI	
		TOTALI	POSITIVI	TOTALI	POSITIVI	TOTALI	POSITIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Bilancia	31	16	10	10	1	5	0	146	521
Blasco	31	16	9	10	1	5	0	144	337
Bolero	31	16	8	10	2	5	0	134	307
Bologna	31	16	6	10	0	5	0	61	107
Isengrain	31	16	7	10	1	5	0	174	429
Mieti	31	16	7	10	0	5	0	109	300
AREALE	CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI				
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX			
Nord	96	47	49	51	143	521			
Centro	60	5	55	92	34	46			
Sud	30	0	30	100	—	—			

Tab. 4 Progetto "MICOCER" - Monitoraggio rete nazionale frumento tenero 2005-06. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON

REGIONI	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Piemonte	20	10	10	50	393	1794
Lombardia	39	26	13	33	253	4358
Veneto	30	15	15	50	127	326
Emilia Romagna	75	20	55	73	439	6896
Marche/Umbria	21	1	20	95	537	537
Totale	185	72	113	61	—	—
Varietà						
Aubusson	15	10	5	33	689	4358
Blasco	15	4	11	73	72	125
Bolero	9	1	8	89	537	537
Bologna	22	6	16	73	36	92
Guadalupe	12	2	10	83	50	53
Isengrain	19	16	3	16	216	938
Mieti	23	4	19	83	1123	4356
Totale 7 cv	115	43	72	63	—	—
Altre 31 cv	70	27	41	59	—	6896
Totale	185	72	113	61	—	—

Tab. 5 Monitoraggio aziendale frumento tenero 2006-07. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON

dente, con un'incidenza di contaminazione da DON mediamente pari al 44% dei campioni analizzati (52% al Nord, 11% al Centro), con un livello medio di contaminazione dei campioni positivi pari a 187 ppb per il moni-

VARIETÀ	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
A416	8	6	2	25	548	2175
Abate	26	14	12	46	113	436
Africa	18	13	5	28	147	425
Anapo	7	6	1	14	110	207
Apache	25	14	11	44	67	263
Aubusson	16	10	6	38	121	527
Avorio	26	14	12	46	147	715
Blasco	10	10	0	0	122	246
Bokaro	26	12	14	54	172	438
Bologna	25	11	14	56	75	186
Bramante	10	6	4	40	77	146
Isengrain	5	3	2	40	249	625
Kalango	26	16	10	39	155	490
Altre varietà	36	30	6	17	239	724
Totale	264	165	99	38	–	–

Tab. 6 *Monitoraggio sperimentazione “on farm” frumento tenero 2006-07. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

VARIETÀ	LOCALITÀ	CAMPIONI NORD		CAMPIONI CENTRO		CAMPIONI SUD		CAMPIONI POSITIVI	
		TOTALI	POSITIVI	TOTALI	POSITIVI	TOTALI	POSITIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Bilancia	27	10	3	12	1	5	0	114	222
Blasco	27	10	6	12	3	5	0	92	549
Bologna	27	10	1	12	1	5	1	192	499
Isengrain	27	10	4	12	2	4	0	352	1705
Mieti	27	10	2	12	0	5	0	165	284
PR22R58	27	10	3	12	2	5	0	229	761
AREALE	CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI				
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX			
Nord	60	19	41	68	249	1705			
Centro	72	9	63	88	78	168			
Sud	29	1	28	97	20	20			

Tab. 7 *Progetto “MICOCER” Monitoraggio aziendale frumento tenero 2006-07. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

REGIONI	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Piemonte	4	4	0	0	1922	4627
Lombardia	23	23	0	0	970	3458
Veneto	15	15	0	0	690	1869
Emilia Romagna	42	40	2	5	722	17659
Marche/Umbria	12	4	8	67	53	161
Totale	96	86	10	10	–	–

Tab. 8 *Monitoraggio aziendale frumento tenero 2007-08. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

toraggio della rete nazionale, 302 ppb per il monitoraggio aziendale e 315 ppb per la sperimentazione “on farm”. Anche nel secondo anno alcuni campioni hanno presentato un livello di contaminazione da DON superiore al limite di 1250 ppb fissato dall’UE per la granello di frumento tenero. In particolare, un solo campione (Isengrain) nell’ambito delle sei varietà della Rete nazionale ha mostrato un valore superiore al limite di 1250 ppb al Nord; una varietà (A416) ha superato il limite comunitario nella sperimentazione “on farm” condotta in Lombardia; tre varietà del monitoraggio aziendale (una non individuata, Aubusson in Piemonte e Mieti in Emilia Romagna) hanno mostrato livelli di DON superiori a quelli fissati dalla UE (Plizzari et al., 2008).

Relativamente al terzo anno di monitoraggio (2007-2008), dei 96 campioni di frumento tenero prelevati direttamente dal campo al momento della trebbiatura solo il 10% è risultato negativo, cioè con un contenuto di Don inferiore a 18.5 ppb (tab. 8). I valori medi di contaminazione riflettono un quadro abbastanza preoccupante in particolare per quanto riguarda il Piemonte (forse a causa dell’esiguo numero di campioni analizzati), ma anche, nei valori massimi, per alcuni areali della Lombardia, del Veneto e, con un valore particolarmente elevato, dell’Emilia Romagna.

Le cause di una contaminazione così marcata di tutti i campioni sono molteplici: la scelta varietale, il ringrano, la semina dopo mais, eventualmente senza l’ulteriore interrimento dei residui colturali (Blandino et al., 2008) e le condizioni meteorologiche sembrerebbero essere le cause principali di sviluppo del patogeno. Le rotazioni colturali con specie appartenenti a famiglie tassonomiche diverse sembrerebbero avere un effetto contrario a parità di trattamenti o altro; fattore principale rimangono in ogni caso le condizioni atmosferiche della specifica annata agraria, che per il 2007-08 si sono rivelate sfavorevoli per la qualità igienico-sanitaria delle coltivazioni di frumento tenero

VARIETÀ	NUMERO CAMPIONI				CAMPIONI POSITIVI	
	TOTALI	POSITIVI	NEGATIVI	% NEGATIVI	VALORE MEDIO	VALORE MAX
Aubusson	10	10	0	0	1761	4021
Azzorre	10	10	0	0	848	2253
Blasco	10	10	0	0	918	1933
Bologna	10	10	0	0	683	2071
Botticelli	10	10	0	0	805	2096
Copernico	10	10	0	0	1249	3123
Egizio	10	10	0	0	1601	3198
Exotic	10	10	0	0	1193	3199
Profeta	10	10	0	0	1887	3632
PR22R59	10	10	0	0	2706	6634
Totale	100	100	0	0	–	–

Tab. 9 *Monitoraggio sperimentazione “on farm” Lombardia frumento tenero 2007-08. Risultati delle analisi con test ELISA per la valutazione della contaminazione da DON*

nel nord Italia. In queste condizioni climatiche sfavorevoli può risultare necessario intervenire con trattamenti fusaricidi anche ripetuti, con evidenti aggravii di costi di produzione e con risvolti non sempre positivi in annate così piovose.

Nella sperimentazione “on farm” della regione Lombardia sono state messe a confronto dieci varietà di frumento tenero in dieci località della Lombardia: Albairate (MI), Cuggiono (MI), Gazzo Bigarello (MN), Montichiari (BS), Orzivecchi (BS), S. Angelo Lodigiano (LO), S. Rocco al porto (LO), Samarate (VA), Silvano Pietra (PV), Vigevano (PV). I dati delle analisi con test ELISA sui 100 campioni delle 10 varietà testate (tab. 9) hanno evidenziato che il 100% dei campioni sono positivi e che tutte le varietà analizzate presentano valori massimi di contaminazione di gran lunga superiori al limite di 1250 ppb.

Nonostante la tecnica colturale adottata non sia risultata omogenea tra le diverse località (anche se in ogni caso è stata eseguita l’aratura del terreno e sulle colture non sono stati effettuati trattamenti fungicidi), la media della contaminazione per varietà può fornire un’indicazione sulla tolleranza alla malattia; le varietà meno suscettibili sembrerebbero essere Bologna e Blasco, mentre PR22R58 risulterebbe molto sensibile a *Fusarium*, a conferma anche dei risultati dei due anni precedenti di sperimentazione.

I risultati delle analisi ripetute su circa il 10-15% dei campioni con metodica HPLC presso il laboratorio ISPA-CNR di Bari hanno evidenziato l’ottima rispondenza del metodo immunoenzimatico (test ELISA) come test di screening rapido, con valori del coefficiente di correlazione tra i due metodi

altamente significativi nel 2005-06 ($r=0,87$), nel 2006-07 ($r=0,96$) e nel 2007-08 ($r=0,98$).

CONCLUSIONI

La commissione Europea ha stilato una raccomandazione (Raccomandazione 2006/583/CE, del 17 Agosto 2006, pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L234 del 29 agosto 2006) a tutti gli attori della filiera dei cereali affinché adottino tutte quelle misure in grado di contenere il livello di infezione da *Fusarium* spp. nei cereali e la conseguente contaminazione delle derrate prodotte; misure peraltro ben note come, tra le altre, l'avvicendamento delle colture, la scelta di varietà meno sensibili, densità di investimento non troppo elevate e soprattutto la scelta di colture maggiormente adatte alle caratteristiche climatiche dei singoli areali. Infatti la problematica delle micotossine nel frumento è decisamente più sviluppata in quelle aree in cui le piante risultano meno adattate alle condizioni climatiche medie dell'areale stesso (per il frumento ad esempio il nord Europa), ma anche in quegli areali in cui si verificano insoliti e deleteri andamenti climatici, come è accaduto durante la primavera del 2008 al nord Italia. Osservazione avvalorata dal fatto che il contenuto di micotossine in campioni di frumento sia tenero che duro (quest'ultimo molto più sensibile all'attacco di patogeni come *Fusarium* in quanto adattato a climi più caldi e secchi) provenienti dagli areali del centro e del sud Italia è risultato pressoché trascurabile.

In conclusione, è possibile affermare che nel biennio 2005-2007 l'incidenza della contaminazione da DON è stata generalmente bassa, con valori quasi sempre al di sotto dei limiti legislativi citati in precedenza. Ben più grave è invece risultata la situazione dell'annata agraria 2007-08 con livelli medi di contaminazione prossimi o uguali al 100% e valori massimi di DON sempre superiori al limite di 1250 ppb negli areali del Nord, anche se mai superiori a tale limite negli areali dell'Italia centrale.

Infine, sembra opportuno segnalare che nel 2006 è stato effettuato un "ring test" per la validazione del metodo immunoenzimatico (test ELISA) che, anche se non validato per l'esiguità dei laboratori coinvolti, ha comunque fornito risultati validi per il laboratorio del CRA-SCV che ha effettuato le analisi con test ELISA sul frumento tenero, presentate in questo lavoro. Un secondo "ring test" effettuato nel 2008 con la partecipazione di un congruo numero di laboratori ha pienamente validato il metodo immunoenzimatico, con bassi valori di deviazione standard e di limite di detezione (Brera et al., 2008).

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Dott.ssa Cattaneo M. (CRA-SCV) per il coordinamento delle attività relative alle analisi ELISA del frumento tenero.

RIASSUNTO

Il monitoraggio della presenza della micotossina deossinivalenolo in campioni di farina integrale di frumento tenero previsto dal progetto MICOCER ha consentito negli anni 2006, 2007 e 2008 l'analisi di circa 1500 campioni, principalmente originari dell'Italia centro-settentrionale. Il 33% di questi campioni provenivano da prelievi durante la trebbiatura, il 43,2% dalla rete "On farm" e il 23,7% dalla "Rete nazionale". La contaminazione è risultata trascurabile in tutti i campioni durante i primi due anni di sperimentazione, mentre durante l'annata agraria 2007-2008 le avverse condizioni meteorologiche hanno provocato un deciso incremento della diffusione delle Fusariosi, con un significativo aumento della concentrazione della micotossina soprattutto nei campioni provenienti dal nord Italia.

ABSTRACT

The monitoring of the mycotoxin deoxynivalenole in wheat wholemeal flour during the MICOCER project, performed in the 2006, 2007 and 2008 years, allowed the analysis of about 1500 samples, mostly from northern Italy. The samples came from: collection at harvest (33%), "On farm" network (43.2%) and "National network" (23.7%). Mycotoxins contamination was negligible during the first two years of testing, while the difficult meteorological conditions of the 2007-2008 led to a strong head blight increase and, of consequence, to a significant raise of mycotoxin concentration, particularly in the northern Italy samples.

BIBLIOGRAFIA

- BLANDINO M., REYNERI A., CORBELLINI M., HAIDUKOWKI M., MAZZIERI G., SCUDELLARI D., DESIDERIO E. (2008): *La giusta tecnica colturale per il controllo della fusariosi*, «L'Informatore Agrario», 32, pp. 46-50.
- BRERA C., DEBEGNACH F., DE SANTIS B., PANNUNZI E., BERDINI C., PRANTERA E., MIRAGLIA M. (2008): *Validazione di metodi immunoenzimatici per la determinazione delle micotossine in campioni di cereali*, «I Georgofili. Quaderni», II.
- PIVA G., PIETRI A., GALLO A. (2008): *Micotossine: fattore limitante nelle produzioni animali*, «I Georgofili. Quaderni», II.
- PLIZZARI L., D. SCUDELLARI, M. CATTANEO, A. BRANDOLINI, M. PASCALE, E. DESIDERIO (2008): *Tenero, bassi livelli di micotossine ma la guardia resta alta*, «L'informatore Agrario», 32, pp. 42-44.