UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di Agraria

Corso di Laurea Magistrale in

Scienze e tecnologie agrarie

(Classe LM-69 - classe delle lauree in SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE)

Materia della tesi:

Fattori agronomici, genetici e ambientali che incidono sulle malattie del frumento dell'areale toscano.

Relatore
Prof.ssa Laura Mugnai

Correlatore:
Dott.re Marco Nocentini,
Prof.re Stefano Benedettelli

Candidato
Antonia Salerno

Anno Accademico 2016/2017

INDICE:

1. INTRODUZIONE 4

1.1. Miglioramento genetico e recupero di varietà antiche 4

2. MALATTIE FUNGINE DEL FRUMENTO 6

2.1. Ruggine gialla 7

2.2. Ruggine bruna 9

2.3. Septoriosi 11

2.4. Fusariosi della spiga 12

2.5. Mal del piede 16

3. MICOTOSSINE DEL FRUMENTO 18

3.1. Aflatossine 19

3.2. Ocratossine 20

3.3. Fumonisine 20

3.4. Tricoteceni 20

3.5. Zearalenone 22

3.6. Moniliformine 22

3.7. Quadro normativo europeo sulle micotossine maggiormente presenti nei frumenti 22

4. SCOPO DELLA TESI 23

5. MATERIALI E METODI 25

5.1. Impostazione dell'indagine campionaria 25

5.1.1. Reperimento dei dati epidemiologici 26

5.1.2. Reperimento dei dati agronomici 27

5.1.3. Reperimento dei dati varietali 29

5.1.4. Reperimento dei dati climatici 29

5.1.5. Conversione dei dati epidemiologici 30

5.2. Analisi delle cariossidi 34

5.2.1. Determinazione della percentuale di colonizzazione fungina, di Alternaria spp. e di Fusarium spp. presente sulle cariossidi 35

5.2.2. Determinazione delle micotossine 36

5.3. Analisi statistica dei dati 38

5.3.1. Regressione lineare multipla con coefficienti standardizzati 38

5.3.2. Distribuzione chi-quadrato 39
5.3.3. Analisi univariata della varianza (ANOVA) 39
6. RISULTATI 40
6.1. Analisi grafica dei dati 40
6.1.2. Incidenza degli interventi agronomici 41
6.1.3. Incidenza degli effetti genetici 46
6.2. Effetti dei fattori climatici 49
6.2.1. Risultati della regressione multipla 51
6.3. Analisi statistica dei risultati di laboratorio delle cariossidi 57
6.3.1. Risultati della distribuzione chi-quadrato 57
6.3.2. Risultati dell'analisi univariata di varianza 60
7. DISCUSSIONE DEI RISULTATI 62
7.1. Incidenza degli interventi agronomici osservati 62
7.2. Effetti genetici osservati 63
7.3. Comparazione dei risultati della regressione lineare multipla con l'andamento termopluviometrico 63
7.3.1. Effetti dei fattori climatici sullo sviluppo di ruggine gialla 64
7.3.2. Effetti dei fattori climatici sullo sviluppo di ruggine bruna 68
7.3.3. Effetti dei fattori climatici sullo sviluppo di septoriosi 72
7.4. Effetti climatici comparati 76
7.5. Discussione dei risultati del test del chi-quadro effettuato sui risultati delle analisi di laboratorio dei 100 campioni di cariossidi 80
7.6. Discussione dei risultati dell'analisi univariata effettuata sui risultati delle analisi di laboratorio dei 35 campioni di cariossidi provenienti dalla varietà monitorate. 83
8. CONCLUSIONI 86
BIBLIOGRAFIA 89

1. INTRODUZIONE

Questo studio ha lo scopo di approfondire le relazioni che intercorrono tra le modalità di coltivazione del frumento nell'areale toscano, la variabilità ambientale e genotipica delle specie coltivate e come questi fattori incidono sulle sue principali malattie.

La cerealicoltura ha sempre avuto un peso molto importante nell'agricoltura italiana.
Nel 2014 la superficie italiana dedicata alla coltivazione del grano è stata nel complesso pari a quasi 2 milioni di ettari con una produzione totale di quasi 7,7 milioni di tonnellate.
Nel dettaglio la coltivazione di grano in Toscana nel 2014 ha coperto il 5,2 % della superficie italiana, pari a circa 100 mila ettari e il 4, 8 % della produzione, pari a circa 240 mila tonnellate.
All'interno della regione si possono individuare due macro-aree di produzione: la fascia litoranea comprendente le provincie di Livorno, Pisa e Grosseto predisposte maggiormente alla coltivazione di grano duro, e l'entroterra costituito dalle provincie di Firenze, Siena e Arezzo in cui ancora prevale la produzione di grano duro ma è stata affiancata in questi ultimi anni anche dalla coltivazione di grano tenero.
La varietà maggiormente coltivate sono varietà moderne ossia varietà geneticamente migliorate e successivamente coltivate a partire dallo sviluppo industriale della prima metà del 1900.

1.1. Miglioramento genetico e recupero di varietà antiche

Agli inizi del '900, l'obiettivo primario del miglioramento varietale era quello di incrementare le rese, pertanto i primi criteri di selezione furono maggiore fertilità della spiga, maggiore precocità, resistenza all'allettamento e resistenza alle malattie. Successivamente, alla fine della Grande Guerra, la necessità economica di smaltire le enormi quantità di esplosivi avanzati sotto forma di concime chimico, aggiunse ai precedenti criteri di selezione la capacità del grano di adattarsi a tecniche colturali intensive e conseguentemente, che le grandi quantità di farina derivanti da piante maggiormente produttive, avessero buone caratteristiche tecnologiche. Fu così che il

miglioramento genetico s'incentrò infine su un maggior contenuto in glutine della granella, che ne determina una migliore proprietà panificatoria della farina.

Per quasi un secolo quindi la selezione non fu più improntata sul fenotipo migliore, aspettando che questo spontaneamente si manifesti al seguire della variabilità ambientale, ma su esigenze di mercato sementiero, di materie prime e trasformati tanto che le pratiche agronomiche a lungo e tuttora utilizzate per ottenere un prodotto finale che risponda a tutte queste esigenze, sconvolsero, e ancora oggi impoveriscono, i tradizionali agro-ecosistemi.

In seguito all'entrata in vigore dell'agricoltura biologica (1 gennaio 2009, disciplinata dal Regolamento CE n. 834/2007) i sistemi cerealicoli intensivi di tutta l'Europa sono stati messi in discussione: laddove per più di 50 anni è stato coltivato grano in maniera intensiva e standardizzata, adottando varietà ibride, uniformi, altamente produttive ma enormemente esigenti di input esterni, con l'avvento del biologico e del “pensiero sostenibile” è inevitabilmente emersa la contraddizione di aver, fino ad allora, modificato l'ambiente alla coltura e non viceversa.

È così che, soprattutto in un sistema cerealicolo di coltivazione biologica, riacquistano importanza le antiche varietà locali, le quali, grazie a una maggiore capacità di adattamento all’ambiente, non hanno solo mostrato di avere rese più stabili nel tempo rispetto alle varietà moderne, ma hanno anche un migliore profilo di metaboliti secondari e una migliore qualità alimentare del glutine.

Recentemente in Toscana sono nate associazioni che preservano e diffondono tramite un programma di miglioramento partecipato le vecchie varietà di grano. Gli obiettivi perseguiti sono quelli di riprodurre e scambiare i propri semi, pianificando ogni anno le superfici da seminare in purezza per la riproduzione e quelle da seminare in miscela o con popolazioni (Associazione grani antichi di Montespertoli, “DISCIPLINARE DI PRODUZIONE DEL PANE E DELLA PASTA DEI GRANI ANTICHI DI MONTESPERTOLI”, 2014). Lo scopo di queste neo formate associazioni è quindi quello di tutelare sia il produttore dandogli la possibilità di autodeterminare la propria attività in modo che questa sia economicamente, socialmente ed ecologicamente sostenibile che, conseguentemente il

consumatore che ha così la possibilità di reperire sul mercato prodotti locali e salutari.
"Possiamo dire che è opportuno conservare in vivo queste varietà, aumentandone la coltivazione e avviare nuovi programmi di sviluppo genetico finalizzati a ottenere un nuovo ideotipo di frumento determinato dalla giusta combinazione di caratteristiche tecnologiche e nutraceutiche" (Benedettelli, Ghiselli, Martinelli, "Pane nuovo da grani antichi", 2013).

2. MALATTIE FUNGINE DEL FRUMENTO

La coltura del grano, a partire dalla domesticazione dei suoi antenati selvatici, si è rivelata fin dal principio particolarmente suscettibile all'attacco di numerosi microrganismi responsabili di varie malattie che in casi estremi, in concomitanza di condizioni favorevoli, sfociavano in vere e proprie pandemie. Queste hanno assunto un ruolo rilevante nel corso della storia, poiché spesso furono preludio di carestie che determinarono sconvolgimenti sociali e migrazione di popoli.
I principali parassiti del grano sono di natura fungina, secondariamente vi sono anche batteriosi e virosi.
L'attacco e la parassitizzazione della pianta implica il danneggiamento della stessa, talvolta di lieve entità, con piccole perdite di produzione, talvolta di grave entità con ingenti cali produttivi, se non addirittura con la perdita totale dell'intero raccolto o la contaminazione irreversibile della granella.
Affinché l'attacco abbia buon esito, il triangolo della malattia deve essere completo, quindi, all'interno dell'agro-ecosistema in cui si verifica l'infezione, oltre la presenza dell'inoculo, è necessario che la pianta sia ricettiva al patogeno e che le condizioni ambientali siano favorevoli ad esso.
Nei moderni sistemi monocolturali e intensivi è molto facile che questi tre elementi siano presenti: "vaste aree geografiche sono densamente coltivate con un'unica specie vegetale e, spesso, con una o poche varietà, peraltro fortemente ingentilite da una selezione finalizzata a ridurre la rusticità e accrescere la resa produttiva. Queste piante,

inoltre, vengono coltivate in modo intensivo, così che le condizioni ambientali diventano più favorevoli allo sviluppo dei parassiti: elevate densità di semina, concimazioni spinte e irrigazione aumentano la fittezza della coltura e ostacolano la circolazione dell'aria, aumentando in tal modo l'umidità e la temperatura". (Rossi, "Il grano", 2007)
La fitoiatria preceduta da un efficiente monitoraggio, assume un ruolo chiave nel controllo delle malattie.

2.1. Ruggine gialla

La ruggine gialla, causata dal *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Pst), è una grave malattia del grano diffusa prevalentemente in aree con clima fresco e umido. Tra le ruggini che affliggono il grano in Italia, *Pst* è la più precoce.

I sintomi si presentano principalmente sulle foglie ma in caso di gravi infezioni anche le spighe, le glume, le reste, le cariossidi, le guaine fogliare e i culmi possono essere colpiti. Segni tipici del patogeno sono pustole che virano dal giallo all'arancione, chiamate uredosori, polverulente, generalmente disposte in modo lineare lungo le nervature fogliari. Altri segni meno tipici sono i teleutosori, striature nero-brune che contengono teleutospore, più rare e meno visibili poiché ricoperti dall'epidermide.

Pst appartiene al phylum dei Basidiomiceti, è un parassita obbligato, biotrofo, difficile da coltivare su substrati artificiali. È un fungo macrociclico ed eterociclico che ha bisogno sia di un ospite primario che secondario per completare il suo ciclo vitale attraverso una fase sessuata altrimenti detta ecidiosorica. *Pst* infetta come ospite primario il grano tenero (*Triticum aestivum* L.), il grano duro (*T. turgidum* var. *durum* L.), il farro (*T. dicoccum* Schrank) e il triticale (*Triticosecale*); può infettare alcune varietà di orzo coltivato (*Hordeum vulgare* L.) e di segale (*Secale cereale* L.) senza causarne gravi epidemie. Recentemente sono stati riconosciuti come ospiti secondari piante appartenenti al genere *Berberis* spp., in particolare il crespino (*Berberis vulgaris*), già noto come ospite alternativo della ruggine nera (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*), e la maonia (*Mahonia aquifolium*) (Jin *et al.* 2010).

Le ecidiospore, provenienti dal soro sessuato dell'ospite secondario quando captano l'ospite primario suscettibile cominciano a germinare dando vita agli uredosori.
Gli uredosori, di colore giallo-arancione, differenziano le uredospore che hanno capacità di dispersione anemofila per lunghe distanze, anche centinaia di chilometri dall'iniziale sito di infezione.
La ruggine gialla è la prima delle ruggini a manifestarsi in primavera (già dall'accestimento-levata). Le infezioni si sviluppano rapidamente a temperature comprese tra i 9 e 15°C; mentre sono ostacolate a temperature superiori a 23°C (Chai *et al.*, 2014). A temperature costantemente maggiori di 15° C, o nelle ultime fasi di crescita della pianta, le basidiospore si sviluppano in teleutosori, corpi fruttiferi neri che differenziano le teliospore. Queste attraverso la cariogenesi e la meiosi si trasformano in basidi che danno origine alle basidispore, le quali concludono il ciclo andando ad infettare l'ospite secondario.

A fine inverno, inizio primavera (levata dei cereali) la malattia si sviluppa rapidamente per raggiungere il massimo entro la spigatura e la fine fioritura. Dato il precoce inizio di sviluppo si possono avere parecchie generazioni nel corso della stagione vegetativa. La sua comparsa dipende prevalentemente da focolai d'infezione situati spesso a notevoli distanze. Le spore sono trasportate dai venti anche per migliaia di chilometri (Chen *et al.*, 2013). Sverna come uredospora o sopravvive allo stadio latente su cereali spontanei, ospiti secondari o su resti di piante precedentemente attaccate.

La sporulazione del fungo dagli uredosori e dai teleutosori causa ingenti lacerazioni alle parti colpite, pertanto i tessuti si disidratano e si disseccano, la respirazione aumenta e l'attività fotosintetica si riduce. In caso di forti epidemie, viene pregiudicata addirittura la raccolta. In Italia la malattia è endemica, si manifesta in maniera latente e circoscritta, per lo più su varietà suscettibili. Il frumento tenero è più suscettibile del frumento duro.

La difesa si attua a livello preventivo tramite l'utilizzo di varietà resistenti e semine

autunnali ritardate o primaverili anticipate. I trattamenti con fungicidi (IBS) si effettuano o in fase di spigatura o alla comparsa dei primi sintomi se la malattia si manifesta precocemente.

2.2. Ruggine bruna

P*uccina triticina* è l'agente causale della più comune malattia del grano. La ruggine bruna infetta il grano molto più regolarmente e in areali maggiormente estesi rispetto la ruggine gialla e la ruggine nera. Le uredospore possono essere trasportate anche per centinaia di chilometri dal sito di inoculo iniziale, di conseguenze l'epidemia, in annate particolarmente sfavorevoli, può raggiungere scale continentali (Bolton *et al.*, 2008).

I sintomi sono visibili sulle foglie circa sei giorni dopo l'infezione tramite circoscritte macchie clorotiche al cui centro è facile osservare pustole rotondeggianti di colore rosso mattone (uredosori) contenenti le uredospore (di colore bruno arancione), disposte irregolarmente sulla lamina fogliare e aperte da un'incisione centrale. Verso la fine del ciclo vegetativo della coltura o con il disseccamento delle foglie attaccate, il fungo differenzia, in prevalenza sulla pagina inferiore delle foglie, i teleutosori, di colore marrone scuro, contenenti le teleutospore.

Puccinia triticina appartiene al phylum dei Basidiomiceti, è un parassita obbligato, biotrofo, difficile da coltivare su substrati artificiali. È un fungo macrociclico ed eterociclico che ha bisogno sia di un ospite primario che secondario per completare il suo ciclo vitale attraverso una fase sessuata altrimenti detta ecidiosorica. L'agente patogeno infetta come ospite primario il grano tenero (*Triticum aestivum* L.), il grano duro (*T. turgidum* var. *durum* L.), il farro (*T. dicoccum* Schrank), il triticale (*Triticosecale*) e alcune foraggere spontanee. Rispetto all'ospite secondario, *Puccinia triticina* ha più volte cambiato tassonomia, infatti se prima era stata individuata la specie *P. recondita* f. sp. *tritici*, più recentemente, (Anikster *et al.*, 1997), scoprirono che *Puccina recondita* avente come ospite secondario *Thalictrum speciosissimum* (famiglia delle Ranunculaceae) è

sessualmente incompatibile con la specie che ha come ospiti intermedi piante appartenenti al genere *Anchusa* spp. (famiglia delle Boraginaceae). Pertanto, basandosi sull'incompatibilità sessuale, l'agente causale della ruggine bruna del grano è stato classificato sotto un'altra specie, *Puccina triticina*, distinta rispetto la ruggine bruna che affligge la segale e altre specie del genere *Triticum*.

Il fungo è vitale a temperatura compresa tra i 2 e i 35°C (Chai *et al.*, 2016). L'agente patogeno si manifesta inizialmente con gli uredosori, pustole rotondeggianti di circa 1,5 mm di diametro, erompenti che producono e contengono al loro interno le uredospore, cellule dicariotiche, larghe 20 µm che possono infettare più volte l'ospite in presenza di bagnatura fogliare e temperature comprese tra i 10-35 °C (Chai *et al.*, 2016). In condizioni climatiche favorevoli possono essere prodotte nuove generazioni di uredospore ogni 10-14 giorni (alta U.R. % e 20° C). Con il progredire della stagione vegetativa e con l'aumento delle temperature, negli uredosori si differenziano le teleutospore, cellule separate da una spessa parete, dicariotiche, marrone. Le teleutospore, giunte a maturazione, vanno incontro a cariogamia e meiosi e originando cellule diploidi da cui ciascuna si sviluppa un premicelio (basidio) che a maturazione libera 4 basidiospore aploidi e sessualmente differenziate (+, -). Queste si ricombineranno sull'ospite secondario tramite i picnidiosori e gli ecidi. È in questa fase che si generano nuove razze fisiologiche o biotipi del patogeno. Dagli ecidi verranno liberate nuovamente ecidiospore dicariotiche per ricominciare il ciclo sull'ospite primario. Le prime infezioni sul frumento possono derivare quindi sia dalle ecidiospore prodotte sugli ospiti intermedi, che da uredospore trasportate da lunghe distanze o da campi coltivati vicini. Il fungo può estivare sia in forma attiva (sui ricacci di frumento o sulle piante nate dopo le prime piogge estive successive alla raccolta) che in forma quiescente, in pustole presenti sulle paglie e stoppie di frumento infette o su piante marginali abbandonate.

La sporulazione del fungo dagli uredosori e dai teleutosori causa ingenti lacerazioni alle parti colpite, pertanto i tessuti si disidratano e si disseccano, la respirazione aumenta e l'attività fotosintetica si riduce. In caso di forti epidemie, viene pregiudicata addirittura

la raccolta. Normalmente gli attacchi più pericolosi sono quelli tardivi, dalla foglia "a bandiera" in poi. La ruggine bruna trova un ambiente climatico molto favorevole in Italia, per cui risulta costantemente presente su tutto il territorio anche se, nel corso dell'ultimo decennio, è stato osservato un decremento nella sua frequenza e intensità, probabilmente dovuto a cambiamenti nelle condizioni climatiche ma anche alla scarsità e /o all'arrivo tardivo dell'inoculo primario.

La difesa preventiva si attua tramite la coltivazione di varietà resistenti, la distruzione dei residui colturali e delle piante spontanee particolarmente infette. I trattamenti con fungicidi (IBS) si effettuano in fase di spigatura o alla comparsa dei primi sintomi se la malattia si manifesta precocemente.

2.3. Septoriosi

Gli agenti patogeni coinvolti nel complesso della septoriosi del frumento sono *Septoria tritici* (forma telomorfa *Mycosphaerella graminicola*) e *Stagonospora nodorum* (forma telemorfa *Phaespheria nodorum*). La malattia è anche nota con il nome di seccume fogliare; è molto frequente in Italia ma raramente causa gravi perdite di produzione.

S. tritici di solito attacca solo le foglie, producendo macchie longitudinali clorotiche-giallo chiare dal contorno poco definito che possono progressivamente coalescere e virare al grigio bruno, mentre *S. nodorum* causa maculature fogliari di colore arancio-bruno ben contornate, a forma ovato allungata, grigie al centro; *S. nodorum* può attaccare anche il culmo, le glume e le reste, causando maculature brunastre e l'annerimento dei nodi. Entrambi gli agenti patogeni sono diagnosticabili tramite picnidi neri che si ritrovano al centro delle zone colpite. *S. triticina* è più precoce, preferisce un clima fresco-umido e può attaccare già dall'accestimento fino a fine levata, al contrario *S. nodorum* è tardiva preferisce un clima è caldo-umido e può attaccare da fine levata alla spigatura.

I due patogeni sopravvivono sulle stoppie e sui residui colturali, inoltre *S. nodorum* si

trasmette anche attraverso il seme. Le infezioni prendono avvio dal micelio, dai conidi o dai picnidi presenti sui residui colturali e successivamente anche dagli pseudoteci differenziatisi sugli organi delle piante infette. I conidi e le ascospore che ne derivano si disperdono tramite il vento e la pioggia (Eyal, 1999). La malattia può insediarsi sulle piante fin dall'autunno per poi esplodere in maniera epidemica in primavera. Gli attacchi autunnali sono quindi pericolosi poiché compromettono la crescita delle giovani piante e rappresentano una fonte di inoculo potenziale per le infezioni primaverili.

Gli attacchi di septoriosi causano un disseccamento parziale delle foglie, diminuendone l'attività fotosintetica. In caso di attacchi gravi prima o durante la spigatura, può essere compromessa la corretta maturazione delle cariossidi. L'intensità dell'attacco è fortemente influenzata dall'andamento climatico e dalla suscettibilità varietale: periodi primaverili molto umidi e piovosi con temperature relativamente basse (15-20°C) favoriscono la malattia.

Piante a taglia bassa, con abbondante apparato fogliare e resistenti all'oidio e alle ruggini si sono mostrate altamente suscettibili alla septoriosi. Ad oggi non esistono varietà resistenti, pertanto la difesa preventiva si attua tramite rotazioni colturali, bruciatura o interramento profondo dei residui, basse intensità di semina, concimazioni equilibrate e concia del seme. In caso di gravi attacchi, i fungicidi consigliati per contenere lo sviluppo degli agenti patogeni sono imidazoli e triazoli.

2.4. Fusariosi della spiga

La fusariosi della spiga è una malattia riscontrabile in diverse specie da granella. È una malattia molto studiata in quanto, oltre a manifestarsi in tutto il mondo, la sua presenza determina ingenti perdite quantitative, spesso stimabili tra il 10% e il 40%, ma soprattutto qualitative in quanto le diverse specie di *Fusarium* sono in grado di produrre micotossine sia in campo che in post-raccolta.

La fusariosi della spiga è il risultato dello sviluppo di un complesso di due generi di funghi patogeni: *Microdochium* e *Fusarium*. Nel genere *Microdochium* vi è una singola specie patogena, *M*. *nivale*, suddivisa in due sottospecie *M. nivale* var. *nivale* e *M. nivale* var. *majus*. Il genere *Fusarium* è ben più partecipe al complesso eziologico in quanto conta diverse specie coinvolte. Quelle più diffuse nell'areale italiano sono: *F. graminearum, F. culmorum, F. avenaceum, F. cerealis (syn F. crookwellense), F. poae* e *F. sporotrichioides*. Molte altre specie possono essere sporadicamente ritrovate tra cui *F. langsethiae, F. acuminatum, F. subglutinans, F. solani, F. oxysporum, F. semitectum, F. verticillioides* (syn.: *F. moniliforme*), e *F. proliferatum*. (Bottalico e Perrone 2002).

I sintomi della fusariosi della spiga incominciano a manifestarsi dalla fine della spigatura e diventano sempre più evidenti alla maturazione latteo-cerosa. L'organo colpito è la spiga; generalmente compaiono prima macchie brune sul rachide e le glume. Qualora l'attacco sia precoce e intenso, il rachide può imbrunire e di conseguenza le spighette diventano sterili, se invece riescono a sopravvivere si avranno "cariossidi gessate" ossia striminzite, decolorate e rugose, cosparse esternamente da fruttificazioni rosa-arancione (sporodochi) e contenenti micotossine.

Un altro quadro sintomatico è dato dalla presenza di *F. poae*, le cariossidi sono sempre disidratate e striminzite e sulle glume si formano delle ocellature necrotiche delimitate da un definito contorno più scuro (Dott.re Marco Innocenti, commento personale).

La fusariosi della spiga, in quanto complesso patologico, ha un'eziologia molto diversificata a seconda dell'areale di infezione e delle condizioni climatiche che si verificano in particolare nel periodo dell'antesi (Bernhoft *et al.*, 2012; Covarelli *et al.*, 2015; Kelly *et al.*, 2015). *Fusarium* spp. associati alla fusariosi della spiga possono quindi variare di anno in anno ma *F. culmorum* e *F. graminearum* rimangono le specie più comunemente ritrovate (Gärtner *et al.*, 2008; Edwards, 2009).

La fonte primaria di inoculo può derivare dalla conservazione del micelio nel seme, dai periteci e dalle clamidospore presenti nel terreno, sui residui colturali e/o sulle parti

basali di piante affette precocemente dal complesso mal del piede.

Nella fase asessuate le strutture miceliari di *Fusarium* spp. producono 3 tipi di spore mitotiche; i microconidi prodotti dai conidiofori, i macroconidi prodotti dagli sporodochi e le clamidospore derivanti dalle ife o dai macroconidi (Dweba *et al.*, 2016). Vi è anche una forma telomorfa (*Gibberella zeae*) la quale forma periteci che rilasciano le ascospore.

Condizioni climatiche caldo-umide ed eventi piovosi alla spigatura/fioritura favoriscono lo sviluppo della malattia. Il periodo di massima sensibilità della pianta è all'antesi. Tuttavia, oltre all'andamento climatico, vi sono diversi fattori agronomici che concorrono ad aumentare la virulenza del patogeno e/o la presenza di micotossine: le monosuccessioni e le successioni con il mais o altri cereali autunno-vernini suscettibili al mal del piede e alla fusariosi della spiga, i ristagni idrici, l'uso irrazionale dei concimi azotati e l'eccessiva densità di semina. (Champeil *et al.*, 2004)

Pratiche agronomiche volte a prevenire lo sviluppo del patogeno sono: l'adeguata rotazione colturale, la corretta gestione dei residui colturali infetti per ridurre il potenziale di inoculo nel terreno, l'impiego di semente sana e conciata e di cultivar meno suscettibili.

L'applicazione di formulati fungicidi avviene nella fase di inizio della fioritura e i principi attivi maggiormente impiegati sono i triazoli e gli analoghi delle strobilurine.

Tab. 1 – Micotossine prodotte da *Fusarium* spp. associati alla spiga (Vercesi, 2012)

ANAMORFO	**MICOTOSSINA**	**OSPITE**
F. graminearum	Tricoteceni, B, Zearalenone	Grano, mais, orzo, segale, avena, riso
F. avenaceum	Enniatine ed altre minori	Avena, grano, mais, orzo, segale, riso

F. culmorum	Tricoteceni B, zearalenone	Grano, orzo, riso, mais
F. poae	Tricoteceni A e B	Grano, orzo, mais, riso
F. crookwellense	Tricoteceni B	Grano, orzo, avena, mais, riso
F. equiseti	Tricoteceni A e B	Grano, orzo, avena, mais, riso
F. sporotrichoides	Tricoteceni A	Grano, orzo, avena, mais, riso
F. acuminatum	Enniatine ed altre minori	Grano, orzo, avena, mais, riso
F. tricinctum	Enniatine ed altre minori	Grano, orzo, avena, mais, riso
F. semitectum	Tricoteceni B e zearalenone	Grano, orzo
F. subglutinans	Enniatine ed altre minori	Grano, orzo, avena, riso, mais
F. verticilloides	Fumonisine	Mais
F. fujikuroi	Fumonisine	Riso
F. langsethiae	Tricoteceni A	Grano, avena, orzo
F. proliferatum	Fumonisine	Grano, riso, mais

2.5. Mal del piede

Il nome del complesso deriva dalla caratteristica localizzazione della necrosi sulla parte basale della pianta e rappresenta il sintomo più caratteristico. Il mal del piede si manifesta sui cereali in forma grave ed epidemica solo in casi eccezionali. L'agente eziologico coinvolto maggiormente nel complesso del mal del piede è *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, tuttavia sono stati ritrovati altri agenti fitopatogeni coinvolti: *Bipolaris sorokiniana, Fusarium avenaceum, F. graminearum, F. culmorum, F. acuminatum, F. crookwellense, F. tricinctum, (Microdochium nivale* var. *majus e nivale), Oculimaculata yallundae*, *O. acuformis* e *Rhizoctonia cerealis* (Santori, 2009).

I sintomi caratteristici si ritrovano alla base del culmo, nella zona del colletto e talvolta sull'apparato radicale; le parti colpite tendono a disseccare, assumendo un colore bruno-nerastro e un aspetto lucente.

I sintomi determinati dai vari agenti fitopatogeni sono simili per cui, per ottenere un corretto profilo eziologico, occorre un'identificazione con metodi tradizionali o molecolari. Tuttavia, è possibile distinguere, senza alcuna certezza diagnostica, i diversi quadri sintomatologici. Nel caso di *Gaeumannomyces graminis* sintomi tipici sono annerimenti dei tessuti accompagnati da lucentezza sulle radici e sui culmi, l'apparato radicale è fortemente compromesso e i sintomi possono arrivare fino all'inserimento delle foglie. Il patogeno differenzia ammassi miceliari scuri tra il culmo e le guaine e aggregati di ife nerastre sulle radici. In condizioni di elevata umidità si differenziano sulle parti attaccate anche abbondanti periteci nerastri.

I sintomi sviluppati da *Bipolaris sorokiniana* sono invece macchie necrotiche di color bruno localizzate alla base delle giovani piante che tendono ad estendersi al colletto e ai primi internodi. Le piante infette necrotizzano o crescono stentatamente per poi morire prima o dopo la spigatura.

I sintomi da *Fusarium* spp. sono localizzati essenzialmente sulla parte epigea della pianta, raramente a livello radicale. Le infezioni precoci provocano necrosi nella fase di

emergenza con conseguenti fallanze, le piante che sopravvivono presentano estesi imbrunimenti sulle guaine fogliari e sul culmo. Le piante infette hanno uno sviluppo ridotto, associato alla necrosi dei culmi in accestimento e minor resistenza all'allettamento.

La sintomatologia derivata da *Oculimacula yallundae* e *O. acuformis* consiste nella comparsa alla base della lamina fogliare e del culmo, di "ocellature" necrotiche longitudinali di color bruno più intenso ai margini, caratterizzate da una "pupilla" centrale costituita da stroma miceliare.

La rizottoniosi (*Rhizoctonia cerealis)* si manifesta con lesioni lenticolari sul culmo, più chiare al centro, delimitate da un margine più netto e prive di micelio nella zona interna del culmo. Le radici restano solitamente sane.

In caso di monocoltura ripetuta, l'incidenza del mal del piede da *Gaeumannomyces graminis* incrementa per alcuni anni a partire dal momento della sua comparsa per poi diminuire assumendo un valore stabile. Tale fenomeno è conosciuto come "Take-all decline" (TAD) e sembra dovuto all'instaurarsi nel terreno di una componente batterica e fungina antagonistica del patogeno (Vercesi, 2012).

La patogenicità e il decorso della malattia pertanto risultano fortemente influenzati da fattori agronomici e ambientali, come il ristoppio, la suscettibilità varietale, il tipo di terreno e, soprattutto, l'andamento stagionale. Le condizioni ottimali per l'infezione si verificano in concomitanza di un inverno mite e successiva primavera e inizio estate fresca e piovosa. L'*optimum* di temperatura è compreso tra i 14 e i 20°C.

I danni da mal del piede, oltre alle iniziali fallanze sono rappresentati da piante indebolite, facilmente allettabili e con cariossidi striminzite; in caso di gravi attacchi le piante si presentano totalmente disseccate, con le spighe bianche e vuote.

La difesa dal mal del piede può essere solo preventiva e si effettua tramite rotazioni colturali e bruciatura dei residui infetti.

3. MICOTOSSINE DEL FRUMENTO

I composti chimici noti con il nome di micotossine sono sostanze ad azione tossica prodotte, in particolare condizioni ambientali, da numerose specie di funghi filamentosi microscopici (Krogh, 1987; Smith, 1998; CAST, 2003).

Le micotossine prodotte dai funghi fitopatogeni sono quindi metaboliti secondari che:

- possono essere prodotti sia in campo che nel post-raccolta (CAST, 2003); prove sperimentali e attività di monitoraggio lungo tutta la filiera hanno messo in evidenza che la contaminazione da micotossine è elevate in campo e limitata durante lo stoccaggio;
- sono composti chimicamente eterogenei;
- sono bio-sintetizzati in poche reazioni;
- caratterizzano i generi fungini, le specie e/o i ceppi che le producono;
- sono classificati secondo gruppi specifici rispetto ai loro *pathway* biosintetici;
- hanno la funzione ecologica di inibire eventuali funghi competitori,
- hanno un importante impatto sia sulla salute umana che animale;
- sono molecole molto stabili, che persistono nei prodotti alimentari durante tutti i processi di trasformazione;
- le stesse micotossine posso essere prodotte dallo stesso genere o da generi di funghi differenti;
- tra queste sono presenti sostanze mutagene che possono sia migliorare l'adattamento alle condizioni avverse dei funghi produttori, sia mutare il genoma delle piante ospiti per facilitarne la colonizzazione;
- Sono stati caratterizzati più di 300 tipi di micotossine, sebbene la maggior parte delle ricerche siano concentrate su aflatossine, ocratossine, tricoteceni, zearalenone, fumonisine, patulina, ergoline.

Questi composti, se presenti nel cibo destinato all'alimentazione umana, nei mangimi e nei foraggi, hanno effetti acuti e cronici sulla salute umana e animale. L'intossicazione

da micotossine può derivare sia da un'assunzione elevata di quest'ultime in un breve periodo di tempo, che dall'assunzione protratta di piccole quantità tramite il consumo quotidiano di alimenti contaminati.

I sintomi clinici derivanti dalla micotossicosi generalmente decadono in seguito alla rimozione dalla dieta degli alimenti contaminati (Zain, 2011).

Aflatossine (AFT) sono state trovate nel mais e negli arachidi così come nelle noci e nella frutta secca. L'Ocratossina (OTA) è stata ritrovata principalmente nei cereali ma significativi livelli di contaminazione sono stati riscontrati anche nel vino, nel caffè, nelle spezie e nella frutta secca. Altri prodotti a rischio di contaminazione sono i legumi, il cacao, il malto e la birra, il pane e i prodotti da forno, la carne di pollo e di maiale (Milicevic *et al.*, 2008).

Le micotossine maggiormente rilevate nei frumenti sono prodotte dai funghi del genere *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pennicillium* (Zain, 2011) e *Alternaria* (Ostrye, 2008).

3.1. Aflatossine

Le aflatossine (AFT) maggiormente conosciute sono chiamate B_1, B_2, G_1, G_2 (dal colore della fluorescenza che emettono sotto raggi UV durante il rilevamento cromatografico, *blue o green*) e M_1 e M_2 (presenti nel latte e nei prodotti caseari) (D'Mello, MacDonald 1997). L'aflatossina B_1 è il composto naturale più cancerogeno conosciuto ed è la tossina maggiormente prodotta dai ceppi tossigenici (Squire, 1981). le principali specie produttrici di AFT sono *A. flavus* e *A. parasiticus*; *A*. *flavus* è l'agente contaminante più comune in agricoltura.

La contaminazione da AFT è stata associata in seguito a casi eclatanti, all'incremento della mortalità degli animali negli allevamenti e ciò ne ha abbassato enormemente il valore dei cerali sia come mangimi che come *commodities* da esportazione. Anche il latte e i prodotti caseari possono essere una fonte indiretta di aflatossine. Le malattie causate dal consumo di aflatossine sono chiamate aflatossicosi. Aflatossicosi acute portano alla morte; aflatossicosi croniche portano al cancro, alla soppressione del sistema

immunitario e ad altri disturbi patologici. Il fegato è il primo organo a essere colpito dalla contaminazione. L'entità della risposta alle aflatossicosi dipende dalla specie colpita, dall'età, dal sesso, dal peso, dalla dieta e dall'esposizione agli agenti contaminanti.

3.2. Ocratossine

L'ocratossina A (OTA) è la più frequente e la più studiata ocratossina prodotta dai funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium*.

Le maggiori specie implicate nella produzione di OTA includono *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. melleus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *P. verrucossum*.

L'OTA è un contaminante naturale frequente in molti alimenti come i cereali, il pesce, le arachidi, la frutta secca, il vino, le uova e il latte (Weidenborner, 2001).

È stato osservato che ogni volta che venivano rilevati alti livelli di OTA, AFB_1 era assente o presente a bassi livelli e viceversa. Questo suggerisce una sorta di competizione tra le due micotossine.

Sugli animali ha attività cancerogena, nefrotossica, citotossica, embriotossica, teratogena, immunosoppressiva. Per quanto riguarda la salute umana, l'assunzione di ocratossina con la dieta è implicata nella Nefropatia endemica dei Balcani (Plestina, 1992), è collegata all'insorgere di tumori del tratto urinario e di nefriti interstiziali croniche.

3.3. Fumonisine

Fumonisine (B_1 e B_2). La fumonisina B_1 (FB_1) è la più tossica ed è causa di tumore nei ratti, leucoencefalomalacia negli equini ed edemi polmonari nei suini. Il consumo di fumonosine è stato associato all'alta incidenza di tumori esofagei in diverse parti dell'Africa, dell'America centrale, dell'Asia e degli USA.

3.4. Tricoteceni

I tricoteceni (TCT) comprendono un vasto gruppo di più di 100 metaboliti fungini con la stessa struttura chimica di base. Diversi generi di funghi sono in grado di produrre TCT, tuttavia la maggior parte appartengono al genere *Fusarium*. Ogni TCT contiene un legame epossidico posizionato tra il C_{12}-C_{13}, il quale è responsabile della loro attività

tossicologica. A livello cellulare, il principale effetto tossico dei TCT è quello di inibire la sintesi proteica. L'azione tossica dei TCT si manifesta con estese necrosi delle mucose orali e della pelle che entrano in contatto con la tossina, effetti acuti si hanno sulla diminuzione del midollo osseo (Schwarzer, 2009). L'assunzione del deossinivalenolo (DON) e composti analoghi può provocare nell'uomo diversi sintomi: principalmente nausea (per questo è stata rinominata vomitossina), disturbi gastro-intestinali, vertigini e febbre. Negli animali i TCT provocano sindrome emetica, rifiuto del cibo, con conseguente riduzione del peso corporeo (Rotter *et al.*, 1996), inoltre, essendo immunotossico, porta uno stato progressivo di cattiva salute (Bottalico, 2002).

I tricoteceni sono presenti su scala globale nei cereali e in altre *commodities*. TCT sono stati rilevati nel mais, nel grano, nell'orzo, nell'avena, nel riso, nella segale, negli ortaggi e in altre colture. Esempi di TCT del tipo A includono le tossine T-2, HT-2 e il diacetossiscirpenolo (DAS). Fusarenone-X (FUX), deossinivalenolo (DON) e nivalenolo (NIV) appartengono ai TCT di tipo B. I due tipi differiscono per la presenza (tipo A) o assenza (tipo B) di un gruppo carbonile alla posizione C_8 (Schwarzer, 2009).

Il NIV è stato spesso associato con il DON e con i suoi derivati e con il FUX. Tutti questi composti sono prodotti da *F. graminearum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. poae*. La presenza di T-2, HT-2 e DAS è stata rilevata in concomitanza di epidemie sporadiche di *F. sporotrichioides e F. poae* (Bottalico e Perrone, 2002). I TCT hanno un'azione tossica anche nei confronti delle piante, sono infatti potenti fitotossine capaci di causare clorosi e necrosi nelle piante ospiti anche a basse concentrazioni (Desjardins e Hohn, 1997).

La fitotossicità acuta suggerisce che tali micotossine svolgano un ruolo nella patogenesi delle specie di *Fusarium* che le producono. È stato studiato il ruolo dei TCT in una serie di malattie delle piante creando mutanti di *F. graminearum* non produttori di tricoteceni. Rispetto alla capacità di determinare l'insorgenza di fusariosi della spiga, la virulenza dei due mutanti non produttori di TCT è risultata significativamente ridotta rispetto ai loro parentali produttori, confermandone un ruolo centrale nella patogenesi (Proctor *et al.*, 2003).

3.5. Zearalenone

Zearalenone (ZEA) è una micotossina prodotta da *F. graminearum* e da altre specie di *Fusarium* (*F*. *culmorum*, *F*. *graminearum*, e *F*. *sporotrichioides*) che colpiscono mais, grano, orzo, avena e sorgo.

È un composto non steroideo che ha dimostrato di avere un'attività estrogena su alcuni animali da allevamento come bovini, suini e ovini causandone iperestrismo, atrofia testicolare e ovarica, aborti. Nell'uomo gli effetti sono paragonabili all'assunzione di estradiolo (Kiang, 1978).

3.6. Moniliformine

Moniliformina è prodotta da diverse specie di *Fusarium* (principalmente *F*. *proliferatum*) ed è generalmente ritrovata nella granella di mais. Nonostante sia FB_1 che moniliformina siano prodotte dalle stesse specie di *Fusarium* (*F*. *proliferatum*) non sono state ritrovate somiglianze strutturali tra le due micotossine (Price *et al.*, 1993).

3.7. Quadro normativo europeo sulle micotossine maggiormente presenti nei frumenti

Per le *Fusarium*-tossine sono stati fissati sia i limiti negli alimenti (µg/Kg) (Reg. CE n. 1126/2007) che il limite massimo ammissibile giornalmente (TDI o PMTDI):

Tab. 2 – TDI (*Theoretical Daily Intake*) e PMTDI (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*) delle *Fusarium*-tossine (*Food and Nutrition Paper 74, WHO, Geneve* 2001) (Van Egmond, 2002).

*La tossicità del composto HT-2 è meno nota poiché *in vivo* la tossina T-2 è rapidamente metabolizzata in HT-2, quindi si tende a considerarle sommate piuttosto che separate.

***Fusarium*-tossine**	**TDI**	**PMTDI**
DON	1 µg/Kg	-
NIV	-.	0,7 µg/Kg
ZEA	0,25 µg/Kg	-

T-2 e HT-2*	-	0,06 µg/Kg

Tab. 3 – Limiti fissati nel regolamento CE n. 1126/2007 che definiscono i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine DON e ZEA (Gazzetta Ufficiale dell'UE, 2007)

Prodotti	**DON µg/Kg**	**ZEA µg/Kg**
Grano duro e avena non trasformati	1750	-
Granturco non trasformato	1750	350
Cereali diversi da grano duro, avena e granturco non trasformati	1250	-
Cereali destinati al consumo umano diretto: farina, semola, crusca e germe	750	75
Pasta secca	750	-
Pane, prodotti da forno e da pasticceria, cereali per la colazione	500	50
Alimenti a base di cereali per lattanti e bambini	200	20

4. SCOPO DELLA TESI

Questo studio ha lo scopo di approfondire le relazioni che intercorrono tra le modalità di coltivazione del frumento nell'areale toscano, la variabilità ambientale e genotipica delle specie coltivate e come questi fattori incidano sulle malattie.

Il frumento è una delle principali colture nazionali, una componente fondamentale della dieta mediterranea e un'importante materia prima prodotta, scambiata e utilizzata su scala globale. Il miglioramento genetico attuato in questo secolo ha portato alla creazione di varietà moderne di frumento, le quali, se coltivate secondo precisi input esterni, danno garanzia di una determinata resa sia in termini quantitativi che qualitativi. Tuttavia le lavorazioni profonde, l'utilizzo di fertilizzanti, pesticidi e diserbanti, per quanto possano ridurre e/o controllare l'effetto ambientale, non sono in grado di prevenire i danni e le perdite dati dalla variabilità climatica. Oltre a ciò, la selezione in ambienti standardizzati è stata causa dell'inevitabile processo di erosione genetica, ossia

della perdita di variabilità genetica all'interno delle specie appartenenti al genere *Triticum*. Le varietà moderne sono quindi molto poco resilienti ai cambiamenti poiché hanno perso la capacità di esprimere, nel corso delle generazioni, geni differenti rispetto a quelli selezionati dai genetisti, che ne consentano l'adattamento a condizioni climatiche e ambientali avverse. Infine è emersa di recente, su scala globale, la problematica della contaminazione delle derrate alimentari da parte di micotossine. Nel caso del frumento, gli organismi fungini maggiormente coinvolti nella produzione di micotossine appartengono al genere *Fusarium* e *Alternaria*.

La necessità di dare un quadro all'attuale situazione fitosanitaria del frumento in Toscana nasce dunque:

- ✓ dall'instabilità che gli agro-ecosistemi hanno manifestato negli ultimi anni in seguito ai cambiamenti climatici e al riscaldamento globale,
- ✓ dalla volontà emersa in molti agricoltori di recuperare varietà con proprietà organolettiche migliori rispetto alle varietà moderne e di coltivarle senza l'utilizzo di sostanze di sintesi che seppur possano prevenire e/o contenere gli attacchi fitopatogeni, inquinano i suoli, le falde ed entrano in forma residuale nella nostra dieta.
- ✓ dall'urgenza di comprendere quali siano i fattori che influiscono maggiormente sullo sviluppo dei funghi tossigeni, in modo da poter migliorare, tramite un monitoraggio della coltura più attento e tempestivo, le strategie di prevenzione.

Lo scopo della tesi pertanto tratta l'osservazione dell'incidenza e della gravità delle principali malattie del frumento coltivate nell'areale fiorentino-senese-aretino in 3 anni, analizzando come questi indici possano essere influenzati dalle variabili climatiche, agronomiche e genetiche. In aggiunta alle osservazioni di campo seguono le analisi di laboratorio dei campioni di cariossidi provenienti sia dalle varietà monitorate che da altre varietà di frumento coltivato nell'areale toscano.

5. MATERIALI E METODI

5.1. Impostazione dell'indagine campionaria

Tale studio è stato affrontato inizialmente tramite un'indagine campionaria, ossia un'indagine a posteriori. In primo luogo sono stati raccolti i dati, in seguito sono stati analizzati tramite riassunti di tipicità estrapolati dalle tabelle pivot e rappresentati con metodo grafico a istogrammi cumulati.

I criteri che hanno determinato la scelta delle aziende partecipanti all'indagine sono stati:

- disponibilità di serie storiche di dati riguardanti l'andamento epidemiologico
- possibilità di rintracciare informazioni riguardanti il regime termopluviometrico e le pratiche agronomiche utilizzate nelle rispettive aziende.

Poiché non vi erano serie consistentemente storiche di dati epidemiologici, le aziende che per esclusione soddisfacevano il secondo criterio erano quelle di CESA (AR) di cui si aveva a disposizione la serie storica più lunga, 3 anni, l'azienda di MONTEPALDI (FI) con una serie storica di 2 anni e infine le aziende situate rispettivamente a MONTICCHIELLO (SI), MONTESPERTOLI (FI) e MONDEGGI (FI), con i dati sull'andamento epidemiologico di un anno.

Tab. 4 – Varietà di frumento e località coinvolte nell'indagine campionaria

VARIETA'	2013	2014	2015
Bologna	CESA	CESA	CESA
pr22r58	CESA	CESA	CESA
Aubousson	CESA	CESA	
Core	CESA	CESA	CESA
Iride	CESA	CESA	CESA
Claudio	CESA	CESA	CESA
Sculptur	CESA	CESA	
Monastir	CESA	CESA	CESA
Miradoux	CESA	CESA	
Saragolla	CESA		

Pharaon		MONTEPALDI	
Abbondanza		MONTICCHIELLO	
Andriolo		MONTEPALDI, MONTESPERTOLI	MONTEPALDI
Farrolungo		MONTEPALDI	MONTEPALDI
Gentilrosso		MONTEPALDI	MONTEPALDI
Inallettabile		MONTEPALDI	MONTEPALDI
Jervicella		MONTEPALDI	MONTEPALDI
Maiorca		MONTEPALDI	MONTEPALDI
mix teneri		MONTEPALDI	MONTEPALDI, MONDEGGI
Senatore cappelli		MONTEPALDI, MONTICCHIELLO, MONTESPERTOLI	MONTEPALDI
Timilia		MONTEPALDI	MONTEPALDI
Verna		MONTEPALDI, MONTICCHIELLO, MONTESPERTOLI	MONTEPALDI

Come emerge dalla Tab. 4 le varietà osservate non sono state ripetute per ogni località e per tutti e tre gli anni, è per ciò impossibile trarre alcuna conclusione rispetto all'adattamento alle malattie di ciascuna varietà. L'indagine campionaria si limita solo all'osservazione dell'andamento dell'intensità e dell'incidenza patologica e di come esse cambino in funzione di diversi fattori. I fattori presi in esame sono:

- agronomici
- genetici
- climatici

5.1.1. Reperimento dei dati epidemiologici

I dati riguardanti l'andamento epidemiologico sono stati presi dal programma di monitoraggio del frumento eseguito dal servizio fitosanitario regionale. Questo inizia dalla fase fenologica corrispondente alla levata e termina alla maturazione delle cariossidi, generalmente da metà aprile alla seconda settimana di giugno, i rilievi sono settimanali e i risultati sono stati periodicamente inseriti sul sito http://agroambiente.info.arsia.toscana.it/arsia/arsia.

Il coordinatore regionale fornisce agli operatori schede da compilare che richiedono:

- luogo, data e varietà colturale
- fase fenologica
- localizzazione, intensità e frequenza di septoriosi
- localizzazione, intensità e frequenza di ruggine gialla
- localizzazione, intensità e frequenza di ruggine bruna
- localizzazione, intensità e frequenza di fusariosi della spiga
- Presenza di mal del piede, oidio, alternaria, carie

I sintomi vengono segnalati solo se presenti su terzultima foglia, penultima foglia, foglia a bandiera e spiga poiché sono gli organi maggiormente coinvolti nella completa maturazione delle cariossidi; le foglie basali non vengono rilevate perché spesso non riescono a compromettere la salute della pianta in accrescimento.

La fenologia va indicata scegliendo una delle seguenti fasi: secondo nodo, foglia a bandiera appena visibile, botticella precoce, foglia a bandiera, botticella rigonfia, spiga visibile, spigatura, inizio fioritura, piena fioritura, maturazione lattea, maturazione cerosa, piena maturazione.

L'intensità si esprime con una classe (Nessuna, Lieve, Media, Grave, Gravissima) associata a una percentuale (0%, 5%, 10%, 25%, 50%) che indica la superficie di foglia o di spiga colpita. La diffusione informa approssimativamente di quante piante sono state colpite, ossia la frequenza di malattia nella popolazione varietale campionata: da un minimo del 5% a oltre il 25%, le classi sono 3: bassa, media, alta.

5.1.2. Reperimento dei dati agronomici

A ciascuna azienda è stato chiesto di fornire informazioni riguardanti le modalità di coltivazione negli anni d'interesse. Ai fini di questo studio le informazioni sono state riassunte attraverso questi dati:

- Il tipo di regime agronomico (biologico, convenzionale)
- la coltura precedente (maggese, rinnovo, miglioratrice)
- le lavorazioni del terreno
- il tipo di lavorazione del terreno (superficiale, profonda)
- data di semina (precoce, media, tardiva)
- concimazioni (data e prodotti)
- l'epoca di concimazione (nessuna, presemina, presemina e copertura)
- dose di azoto, in base al titolo di azoto contenuto nei concimi utilizzati (nessuna, bassa, media, alta)
- diserbo (data e prodotti)
- trattamento (data e prodotti)

Tab. 5 – Termini di conversione delle informazioni agronomiche originali nei dati utilizzati per lo sviluppo grafico dell'indagine.

REGIME AGRONOMICO	**Convenzionale**		**Biologico**	
COLTURA PRECEDENTE	**Maggese** A = 1;5	**Rinnovo** B = 2	**Miglioratrice** C = 3;4;6	1=Maggese 2=Girasole 3=Erba medica 4=Cece 5=Maggese + Orzo 6=Trifoglio
TIPO LAVORAZIONE TERRENO	**Profonda** A = a; c; d; e	**Superficiale** B = b	a = 1;4;3 b = 5 c = 1 d = 1;4 e = 4;1;4;4;	1=Aratura 2=Erpicatura 3=Rotoerpicatura 4=Frangizollatura 5=Rippatura
SEMINA	**Precoce** 15ott-15nov	**Media** 15nov-15dic	**Tardiva** 15dic-15gen	

TIPO CONCIMAZIONE TERRENO	**Nessuna**	**Copertura**	**Presemina + copertura**	
DOSE DI AZOTO	**Nessuno** NESS = 0	**Basso** BASSO = 50 : 75	**Medio** MEDIO=75 :150	**Alto** ALTO > 150
DISERBO	**0** NESSUNO	**1** Clopiralid+Fluroxipyr+MCPA	**2** granstarultra + axial pronto	**3** gran star ultra
TRATTAMENTO	**0** Non effettuato	**1** Effettuato	**2** Ripetuto	

5.1.3. Reperimento dei dati varietali

I dati varietali sono stati ricavati dalle schede dei rilievi fitosanitari attuati per ciascuna varietà. Da questa informazione è stato possibile definire:

- la specie (frumento duro o frumento tenero)
- il tipo di varietà (antica o moderna)
- il tipo di ciclo (precoce, medio, tardivo)

5.1.4. Reperimento dei dati climatici

I dati termopluviometrici sono stati forniti in parte dalle aziende, Cesa e Montepaldi, in parte sono stati rielaborati dal sito del SIR (Settore Idrologico Regionale) http://www.sir.toscana.it/.

I dati sono stati rielaborati in decadi e per ciascuna decade abbiamo a disposizione:

- la temperatura massima espressa in °C
- la temperatura media espressa in °C
- la temperatura minima espressa in °C
- le precipitazioni espresse in mm

5.1.5. Conversione dei dati epidemiologici

Una volta acquisite e rielaborate tutte le informazioni necessarie riguardo la coltura e il clima, resta da individuare la funzione attraverso la quale è possibile definire un parametro che riassuma l'andamento epidemiologico delle principali malattie del frumento.

Gli indici utilizzati per quantificare le malattie nelle schede del rilievo fitosanitario sono:

- ✓ *intensità*: gravità, percentuale di tessuto o organo ospite colpito
- ✓ *diffusione*: frequenza o incidenza delle piante malate all'interno di una popolazione o campione a prescindere dalla loro individuale intensità di malattia

(Kranz, 1988)

Tali definizioni ci consentono di quantificare la malattia sempre in relazione all'ospite, ma una funzione più riassuntiva della malattia nel corso della stagione di crescita si può ottenere moltiplicando ad ogni rilievo l'intensità × la frequenza (*Index Disease ID*). Il parametro ottenuto ci dà un'indicazione più veritiera sull'andamento epidemiologico in quanto restituisce un valore mediato qualora la malattia sia grave con bassa frequenza o lieve con alta frequenza. Il prodotto derivante dalla frequenza e gravità della malattia all'ultimo rilievo è quindi più rappresentativo rispetto al danno effettivo che la malattia ha provocato alle piante ma non dà indicazioni riguardo l'andamento epidemiologico. Questo si può definire associando agli indici di malattia (intensità, frequenza, intensità x frequenza) registrati all'ultimo rilievo la velocità d'infezione data dalla sommatoria dei prodotti tra l'incremento marginale avvenuto al giorno monitorato e il numero del giorno monitorato sulla somma totale degli incrementi.

$$ID_k = F_k \cdot I_k$$

ID_k = *Index Disease kappesimo*

F_k = frequenza kappesima

I_k = intensità kappesima

k = 1…n osservazioni

$$IDm = \frac{ID_n}{n\,rilievi}$$

IDm = *Index Disease* medio

$$Vel\ ID_n = \frac{\sum_{k=1}^{n}[(ID_k - ID_{k-1}) \cdot gg_k]}{\sum_{k=1}^{n}(ID_k - ID_{k-1})}$$

Vel ID_n = velocità *Index Disease*, normalmente è l'*ID* dell'ultimo monitoraggio

$(ID_k - ID_{k-1})$= incremento marginale

gg_k = giorno kappesimo

La velocità d'infezione esprime se la malattia è stata più o meno precoce. Ciò nonostante, al fine di facilitare la comparazione agronomica e varietale, è stato deciso di rappresentare la malattia con un solo valore anziché con due. Un valore standardizzato è l'indice medio di malattia (*Index Disease* medio, IDm) dato dalla sommatoria di frequenza x intensità, sul totale dei giorni monitorati. Poiché i giorni del monitoraggio non sono gli stessi per tutti e tre gli anni, per esempio nel 2013 sono stati 8, nel 2015 sono stati 6; ciò significa che data la regolarità settimanale dei rilievi, gli indici di malattia del 2013 sono calcolati per 7×8 = 56 giorni mentre gli indici di malattia del 2015 sono calcolati per 7×6 = 42 giorni. A questo punto è stato preferito dividere l'ID per i valori minori (numero dei rilievi) così da evitare calcoli decimali e rendere l'indice facilmente interpretabile. Questo parametro esprime il valore medio dell'andamento epidemiologico, non il danno finale che il patogeno ha arrecato alla pianta, quest'ultimo è espresso dall'ultimo valore registrato di intensità x frequenza.

Quindi, attribuendo a ciascuna classe un valore da 0 a 4 per l'intensità e da 0 a 3 per la frequenza convertiamo i termini di classificazione utilizzati nelle schede dei rilievi fitosanitari.

Tab. 5 – Termini di conversione dei dati epidemiologici

Conversione parametro **intensità**	Conversione parametro **frequenza**
0 = 0 = Nessuna	0 = Nessuna
1 = 5 = Lieve	1 = Bassa < 5%
2 = 10 = Media	2 = Media 5-25%
3 = 25 = Grave	3 = Alta > 25%
4 = 50 = Gravissima	

Tale classificazione dà luogo a una matrice di prodotti che aumentano marcatamente all'aumentare della frequenza e dell'intensità. È stato appositamente scelto questo metodo per individuare più velocemente casi di gravi epidemie.

Tab. 6 – Matrice delle classi associate alla frequenza e all'intensità.

Intensità	*Frequenza* 0	1	2	3
1	1	2	3	
2	2	4	6	
3	3	6	9	
4	4	8	12	

Tab. 7 – Nella seguente tabella sono indicati i valori medi dell'indice di malattia per ciascuna varietà × anno × località. In arancione sono evidenziati i valori massimi.

ANNO	LOCALITA'	VARIETA'	OIDIO	SEPTORIA	FUSARIUM	RG	RB
2013	CESA	AUB	0,00	1,75	0,00	0,00	0,25
2013	CESA	BOL	0,00	2,50	0,13	0,00	0,13
2013	CESA	CLA	0,00	2,50	0,13	0,00	0,50
2013	CESA	COR	0,00	3,25	0,13	0,00	0,63

2013	CESA	IRI	0,00	3,25	0,13	0,00	0,25
2013	CESA	MIR	0,00	1,50	0,25	0,00	0,38
2013	CESA	MON	0,00	2,75	0,13	0,00	0,00
2013	CESA	PR22	0,00	1,88	0,00	0,00	0,25
2013	CESA	SCULP	0,00	2,63	0,25	0,00	0,75
2014	CESA	AUB	0,00	0,38	0,00	0,00	3,00
2014	CESA	BOL	0,00	1,88	0,00	0,25	2,75
2014	CESA	CLA	0,00	2,25	0,00	1,25	0,50
2014	CESA	COR	0,00	1,86	0,00	1,14	4,14
2014	CESA	IRI	0,00	2,63	0,00	2,38	0,38
2014	CESA	MIR	0,00	0,00	0,00	2,38	4,38
2014	CESA	MON	0,00	1,88	0,00	2,13	0,25
2014	CESA	PR22	0,00	0,38	0,00	0,50	1,63
2014	CESA	SAR	0,00	4,25	0,00	3,00	1,38
2014	CESA	SCULP	0,00	1,38	0,00	0,75	5,00
2014	MPAL	AND	0,00	1,13	0,00	0,00	0,50
2014	MPAL	FAR	0,00	2,13	0,00	0,00	0,75
2014	MPAL	GENT	0,00	0,50	0,00	0,50	0,50
2014	MPAL	INAL	0,00	0,38	0,00	0,00	0,00
2014	MPAL	JER	0,00	0,75	0,00	0,88	0,38
2014	MPAL	MAIO	0,00	1,88	0,00	1,00	1,25
2014	MPAL	PHA	0,00	1,25	0,00	0,63	2,25
2014	MPAL	SENCAP	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75
2014	MPAL	TIM	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00
2014	MPAL	VER	0,00	2,38	0,00	1,25	2,13
2014	MSPERT	AND	0,00	1,50	0,00	0,50	3,50
2014	MSPERT	SENCAP	0,00	3,25	0,00	0,00	3,63
2014	MSPERT	VER	0,00	1,75	0,00	0,00	0,50
2014	MONTIC	ABB	0,00	1,25	0,00	1,00	0,00
2014	MONTIC	SENCAP	0,00	2,50	0,00	0,88	3,75
2014	MONTIC	VER	0,00	2,75	0,00	2,00	1,25
2015	CESA	BOL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
2015	CESA	CLA	0,00	0,40	0,00	0,00	0,80
2015	CESA	COR	0,00	0,00	0,00	0,00	1,80

2015	CESA	IRI	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
2015	CESA	MON	0,00	0,80	0,00	0,00	0,80
2015	CESA	PR22	0,00	0,00	0,00	2,80	2,80
2015	MPAL	JER	0,00	0,33	0,00	0,00	0,67
2015	MPAL	AND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50
2015	MPAL	INAL	0,00	0,67	0,00	0,00	0,50
2015	MPAL	VER	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00
2015	MPAL	GENT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33
2015	MPAL	FAR	0,00	0,83	0,00	0,33	0,33
2015	MPAL	SENCAP	0,00	1,00	0,50	0,00	0,67
2015	MPAL	TIM	0,00	1,67	0,50	0,00	0,83
2015	MPAL	MAIO	0,00	0,50	0,00	0,33	1,50
2015	MPAL	MIXTEN	0,00	0,67	0,00	0,00	0,50
2015	MOND	MIXTEN	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00

5.2. Analisi delle cariossidi

In aggiunta alle osservazioni di campo seguono le analisi di laboratorio dei campioni di cariossidi appartenenti sia alle varietà monitorate che ad altre varietà di frumento coltivato nell'areale toscano. Questi dati ci consentono di valutare lo stato fitosanitario del frumento anche nel post-raccolta così da avere un quadro completo delle malattie maggiormente presenti nell'areale toscano e dei rischi che da esse ne conseguono sia in termini di sicurezza alimentare che di perdita economica.

Le analisi sono state effettuate presso l'ISPA (Istituto di Scienze delle Produzione Alimentari) del CNR di Bari.

I campioni analizzati contengono 100 g di semi ciascuno e sono in totale 100; 35 corrispondono ai campioni delle varietà monitorate dal 2013 al 2015 di cui disponiamo anche i dati epidemiologici, agronomici e climatici, gli altri sono tutti provenienti dalla zona di coltivazione fiorentina, senese, pisana e aretina. Per ogni campione è indicato

- il nome della varietà
- l'anno di coltivazione

- la località di coltivazione
- la specie
- il regime agronomico
- trattamento fitosanitario effettuato o non effettuato
- la percentuale totale di colonizzazione fungina (sia patogena che neutra) di 100 cariossidi,
- la percentuale rappresentata dal genere *Alternaria*,
- la percentuale rappresentata dal genere *Fusarium*,
- la percentuale delle specie di *Fusarium* coinvolte
- il profilo micotossicologico di DON, ZEA, NIV, T2 e HT2.

5.2.1. Determinazione della percentuale di colonizzazione fungina, di *Alternaria* spp. e di *Fusarium* spp. presente sulle cariossidi

Dai campioni di cariossidi destinati alle analisi di laboratorio sono stati prelevati 100 semi lavati in 50 ml di soluzione di ipoclorito di sodio al 2% per 2 minuti e sciacquati 3 volte con acqua distillata sterile. Su ogni piastra sono stati disposti 10 semi. Il substrato utilizzato è PCNB con antibiotici:

- Per 1 litro d'acqua sono stati utilizzati:

  Peptone Difco 15 g,

  KH_2PO_4 1g, $MgSO_4$ 0,5g,

  agar 20g, pentacloronitrobenzene (PCNB) 1g,

  solfato di streptomicina 100 mg,

  neomicina 50 mg.

Le piastre con le cariossidi sono state mantenute per una settimana all'interno di celle a temperatura e fotoperiodo controllati, 25°C e 12 ore di luce. Al termine della settimana, intorno alle cariossidi germinate è stato possibile osservare e quantificare le diverse colonie fungine che si sono sviluppate. Individuate le colonie di *Fusarium*, queste sono state trasferite su agar-acqua e messe in incubazione a 25 °C.

È stato possibile identificare le specie dai conidi prodotti dopo 4-5 giorni. L'identificazione avviene al microscopio servendosi di chiavi dicotomiche.

5.2.2. Determinazione delle micotossine

Il protocollo utilizzato, presso l'ISPA del CNR di Bari, per la determinazione delle quantità di deossinavalenolo si basa sull'estrazione di DON da campioni miscelati con acqua e PEG (*polyethylene glicol*); in seguito l'estratto acquoso è purificato tramite colonne ad immunoaffinità e la tossina è determinata mediante HPLC (*High-performance liquid chromatography*) con rivelatore UV. Pertanto, prima della determinazione quantitativa della micotossina occorre estrarla dai campioni di cariossidi, questo processo avviene secondo le seguenti fasi:

1. Preparazione del campione: le cariossidi devono essere accuratamente macinate in particelle ≤ 1mm. Il materiale ottenuto deve essere mescolato e reso omogeneo.
2. Preparazione della soluzione stock (500 µg/ml): vengono prelevati 5 mg di DON (*deoxynivalenol, vomitoxin, 98% pure, Sigma-Aldrich*), e disciolti in un matraccio da 10 ml contenente acetonitrile.
3. Preparazione dello standard per la lettura UV: dopo aver preparato la soluzione stock, 200 µl di quest'ultima vengono trasferiti in un matraccio da 2 ml e portati a volume con acetonitrile. In seguito viene misurata l'assorbanza UV di questo standard e dello stesso volume di acetonitrile ma senza DON (controllo negativo). La concentrazione di DON è calcolata tramite la seguente formula:

$$\text{concentrazione } \left(\mu\frac{\text{g}}{\text{ml}}\right) = \frac{A * MW * 1000}{\varepsilon * \text{b}} * \frac{2}{0{,}1}$$

A = assorbanza dello standard del DON,

MW = peso molecolare del DON (296,3)

ε = coefficiente molare di assorbività (6400 per DON in acetonitrile)

b = lunghezza della cuvetta (cm)

4. Preparazione della soluzione standard di riferimento (100µg/ml): 1000 µg di DON vengono trasferiti in un matraccio da 10 ml e portati a volume con acetonitrile.
5. Preparazione della soluzione standard (10µg/ml): 1 ml della soluzione standard di riferimento viene trasferita in un matraccio da 10 ml e portata a volume con acetonitrile.
6. Preparazione delle soluzioni standard di calibrazione: dalla soluzione standard sopra descritta (10µg/ml) sono preparate 5 soluzioni di calibrazione a concentrazioni diverse (0.05, 0.25, 0.5, 1, 1.5, µg/ml) poiché diversamente diluite con una soluzione contenente il 10% di acetonitrile e il 90% di acqua purificata. Le differenti aliquote vengono trasferite in matracci da 10 ml. Il solvente viene fatto evaporare sotto un leggero flusso di azoto, e il residuo viene disciolto nel diluente LC (metanolo e acqua purificata in proporzione di 9,5+09,5 v/v) e portato con questo a volume.

Infine dal campione precedentemente macinato vengono prelevati 20 g inserirti in un flacone da centrifuga da 250 ml. Su ogni campione viene distribuita regolarmente 100 µl di soluzione standard, mettendo un flacone in più per l'acetonitrile senza DON (senza cariossidi macinate). I flaconi rimangono aperti sotto cappa di aspirazione per 40 minuti affinché l'acetonitrile sia evaporato, in seguito vengono agitati per 30 secondi. Ad ogni contenitore vengono aggiunti 4g di PEG e 80 ml di acqua. Il tutto viene omogeneizzato per 3 minuti a 15000 rpm e centrifugato a 2700 rpm per 20 minuti. Terminata la centrifuga vengono filtrati almeno 3 ml di estratto acquoso con un filtro in fibra di vetro, con ritenzione di 1 µl, in provette di vetro. Il tutto viene collegato alla colonna a immunoaffinità (IAC), riempita con una fase stazionaria, al sistema del vuoto, e la soluzione viene fatta fluire fino a che non rimangono circa 5mm. 1 µl di estratto filtrato viene inserito nel serbatoio della colonna facendo passare circa 1 goccia al secondo e in seguito la colonna viene lavata con 5 ml di acqua alla stessa velocità. Il DON viene eluire dalla colonna usando 2 ml di acetonitrile, 1 goccia/s, e raccolto in una provetta di vetro. L'eluente viene fatto

evaporare con una leggera corrente di azoto a 40 °C, e in seguito ricostruito in 0,5 ml di diluente LC, mescolato con il vortex per 30 secondi, lasciato nel bagno a ultrasuoni per 2 minuti e mescolato ancora con il vortex. A questo punto si può procedere trasferendo i campioni nell'autocampionatore per la lettura cromatografica e la quantificazione.

7. Calcolo: Iniettando le apposite soluzioni standard viene costruita la curva di calibrazione. Graficamente le quantità corrispondono alle aree dei picchi che si formano, numericamente vengono ricavate dal software con l'analisi della regressione. Alla fine possiamo calcolare il DON effettivamente presente nei campioni con la formula:

$$DON, \mu\frac{g}{g} = \frac{Cf*Vf*Ve}{Wi*Vl}$$

Cf = concentrazione di DON data dall'analisi della regressione (µg/ml)

Vf = volume finale del campione e del diluente LC (ml)

Ve = volume del solvente di estrazione (ml)

Wi = peso del campione (g)

Vl = volume del solvente di estrazione caricato nella colonna (ml)

5.3. Analisi statistica dei dati

Per comprendere meglio le possibili relazioni tra i fattori climatici, il fattore "trattamento" e l'andamento epidemiologico è stata effettuata l'analisi statistica dei dati tramite il test del chi-quadro, l'analisi univariata della varianza (ANOVA) e la regressione lineare multipla con coefficienti standardizzati. Il *software* statistico utilizzato è IBM SPSS.

5.3.1. Regressione lineare multipla con coefficienti standardizzati

Per analizzare l'influenza delle variabili climatiche sull'indice medio di malattia di ruggine gialla, ruggine bruna e septoriosi per ogni azienda nei diversi anni è stata effettuata la

regressione lineare multipla con coefficienti standardizzati con metodo *stepwise*, ossia incrementando le variabili indipendenti una alla volta in modo da creare una *path analysis* che ci consenta di valutare l'effetto di ciascuna variabile quando le altre rimangono costanti.

5.3.2. Distribuzione chi-quadrato

La distribuzione del chi-quadrato è stata utilizzata per mettere in relazione tra di loro i dati estrapolati dalle analisi delle cariossidi (presenza-assenza di micotossine, tipologia di micotossine presenti, percentuale di *Alternaria* spp., percentuale di *Fusarium* spp., percentuale delle specie di *Fusarium* coinvolte) e i dati conosciuti a priori sull'origine dei campioni (trattamento e specie di frumento). Tale test ci consente di individuare se la distribuzione delle frequenze osservate è significativa a livello di probabilità 5 % ($P < 0,05$) o 1 % ($P < 0,01$).

5.3.3. Analisi univariata della varianza (ANOVA)

L'analisi univariata della varianza è stata effettuata per osservare la variabilità dei dati riguardanti le cariossidi. La media della percentuale di colonizzazione fungina totale, della percentuale di *Fusarium* spp. e di *Alternaria* spp. presente sui semi è stata calcolata in funzione delle coppie di fattori "tipo di varietà" e "trattamento".

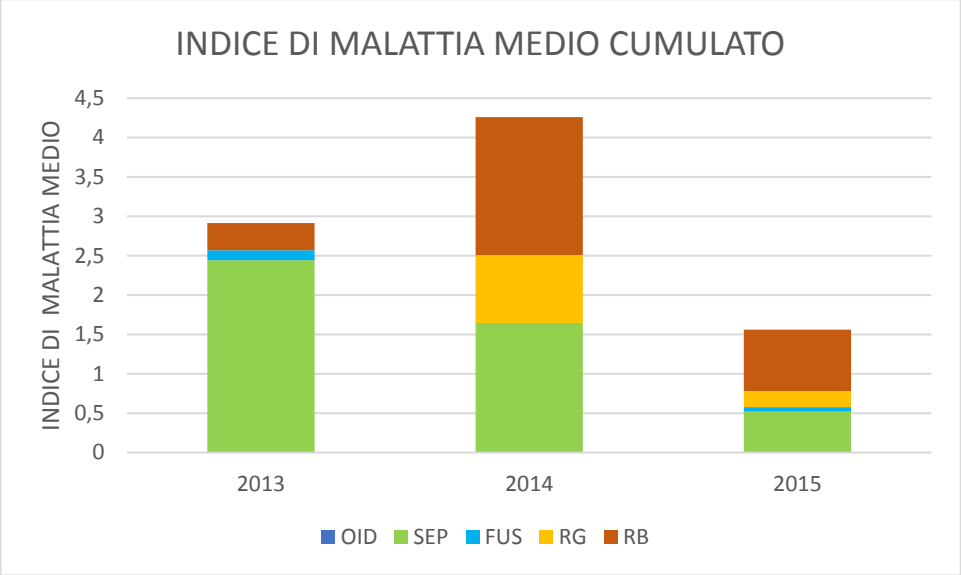
6. RISULTATI

6.1. Analisi grafica dei dati

Conclusa la raccolta delle informazioni necessarie all'indagine campionaria, i dati ottenuti sono stati utilizzati per elaborare dei riassunti di tipicità attraverso il metodo grafico a istogrammi cumulati.

Ciascun istogramma rappresenta la somma degli indici medi per ciascuna malattia, ossia l'indice di malattia medio cumulato (IDMC) nei diversi anni. La media cumulata delle malattie in funzione dei diversi fattori presi in esame (agronomici, climatici e genetici) è stata calcolata tramite le tabelle pivot.

Fig. 1 – Indici medi di malattia cumulati del 2013, 2014 e 2015; OID = oidio, SEP = septoriosi, FUS = fusariosi della spiga, RG = ruggine gialla, RB = ruggine bruna.

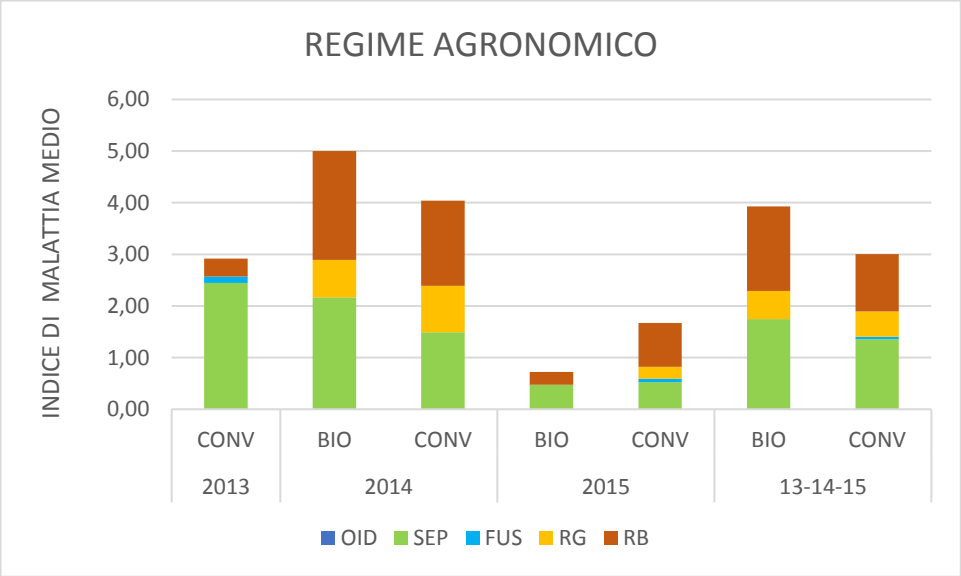


Dal grafico (Fig. 1) emerge l'assenza di oidio nelle varietà monitorate in tutti e tre gli anni considerati. Le malattie maggiormente presenti sono la septoriosi e la ruggine bruna, a seguire la ruggine gialla e infine la fusariosi. È inoltre evidente che il 2014 è stato l'anno con maggiore indice di malattia, a seguire viene il 2013 e infine il 2015.

6.1.2. Incidenza degli interventi agronomici

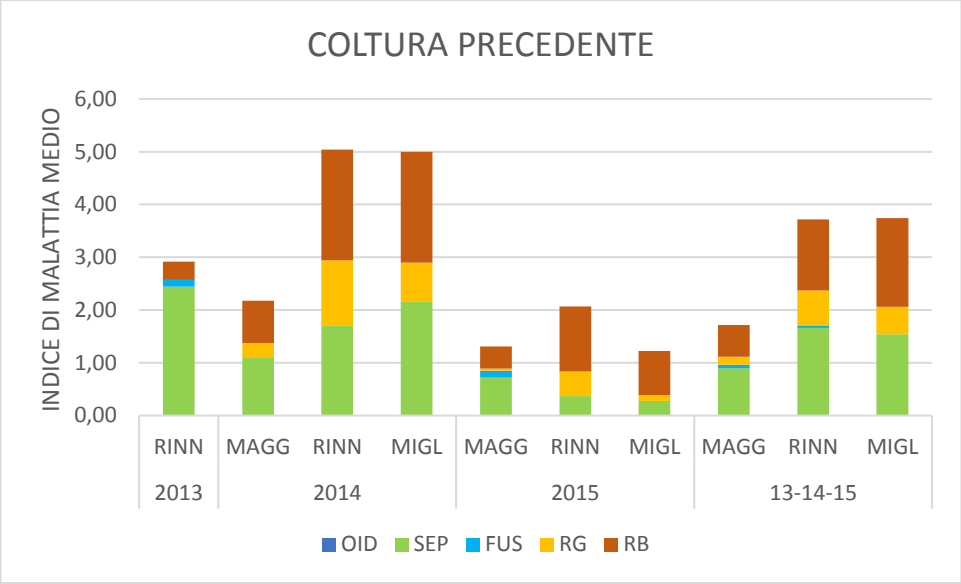
In primo luogo è stata effettuata l'analisi delle interazioni agronomiche, quindi l'IDMC è stato rappresentato per ogni anno in funzione dei diversi fattori agronomici e infine è stato riassunto per tutte e tre gli anni considerati.

Fig. 2 – Incidenza del fattore "regime agronomico" sull'IDMC del 2013, 2014 e 2015; CONV = regime convenzionale, BIO = regime biologico.



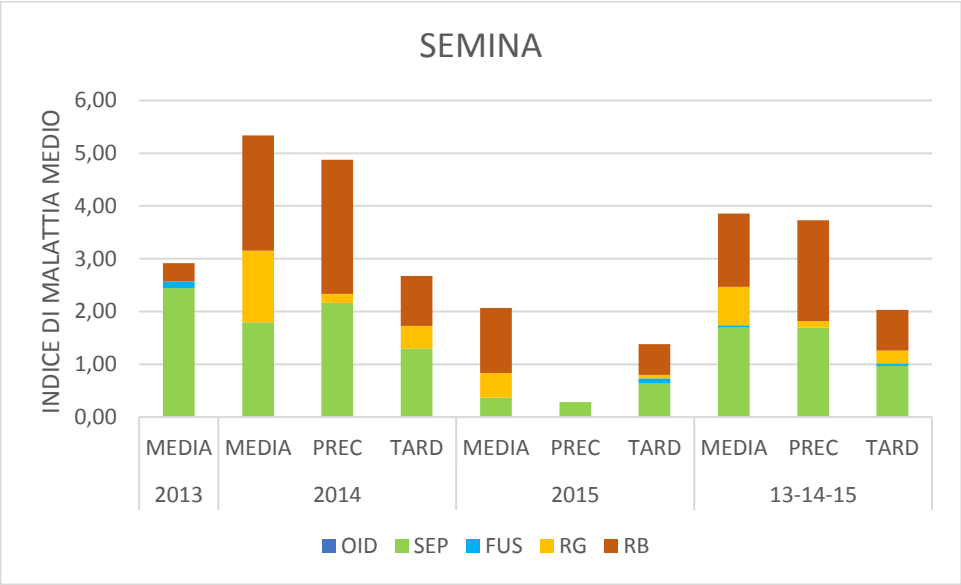
Dal grafico (Fig. 2) è possibile osservare che nel 2014 l'IDMC è maggiore nelle aziende a regime biologico, il 2015 invece segue l'andamento inverso.

Fig. 3 – Incidenza del fattore “coltura precedente” sull’IDMC del 2013, 2014 e 2015; RINN = rinnovo, MAGG = maggese, MIGL = miglioratrice.



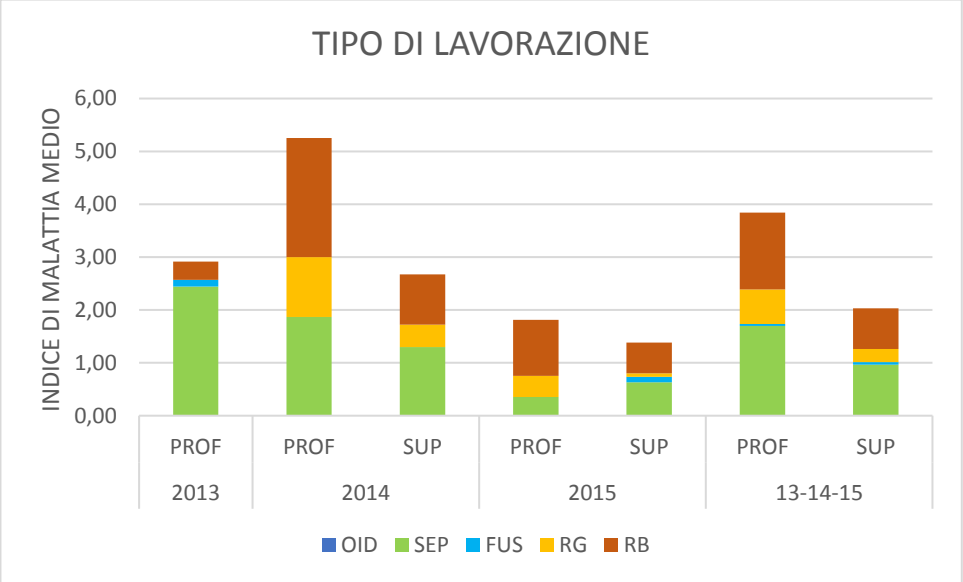
Il grafico (Fig. 3) conferma che le coltivazioni di frumento precedute dal maggese hanno un minore IDMC sia nel 2014 che nel 2015.

Fig. 4 – Incidenza del fattore “epoca di semina” sull’IDMC del 2013, 2014 e 2015; MEDIA = media, PREC = precoce, TARD = tardiva.



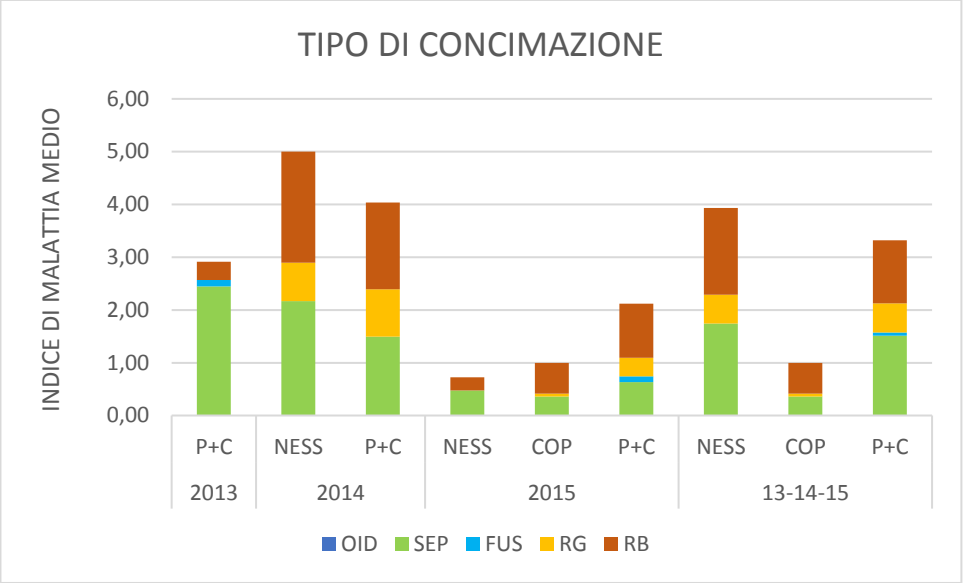
Il grafico (Fig. 4) conferma che le varietà seminate tra il 15 novembre e il 15 dicembre (semina media) sono state, sia nel 2014 che nel 2015, le più suscettibili.

Fig. 5 – Incidenza del fattore “tipo di lavorazione del terreno” sull’IDMC del 2013, 2014 e 2015; PROF = profonda, SUP = superficiale.



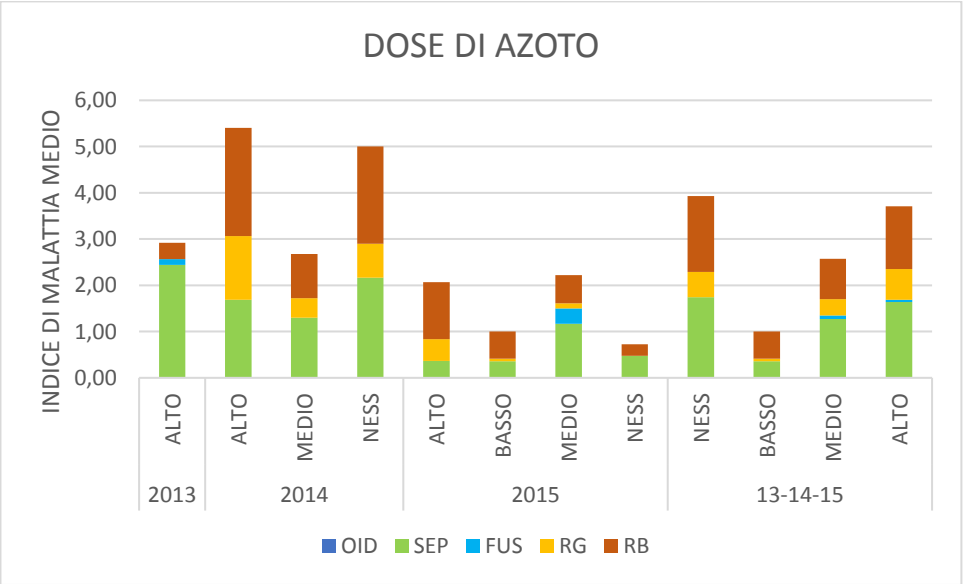
Dal grafico (Fig. 5) emerge che sia nel 2014 che nel 2015, le varietà coltivate con lavorazioni profonde hanno registrato un maggiore IDMC.

Fig. 6 – Incidenza del fattore “tipo di concimazione” sull’IDMC del 2013, 2014 e 2015; NES = nessuna, COP = copertura, P+C = presemina + copertura.



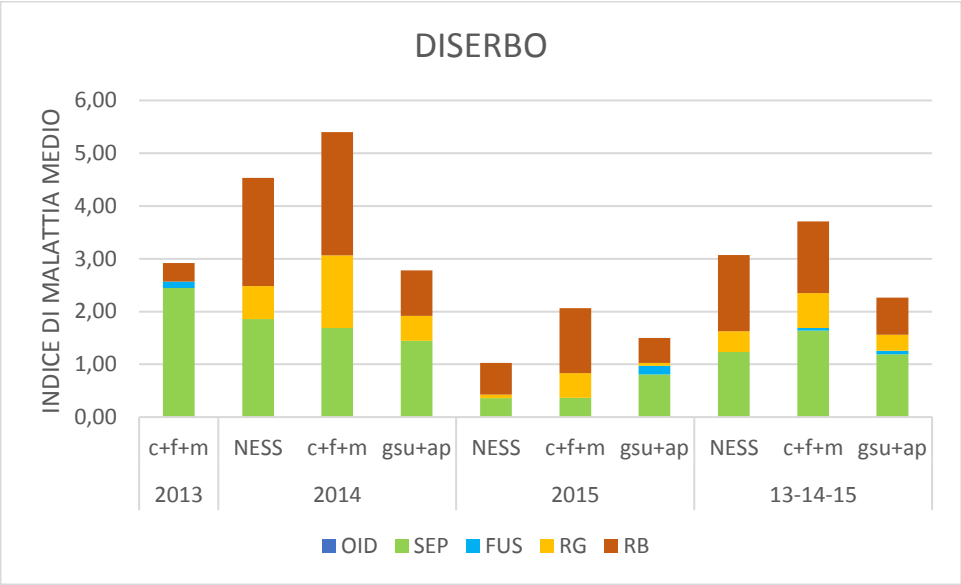
Nel grafico (Fig. 6) risulta discordante l’IDMC collegato a “nessuna concimazione” registrato nel 2014 rispetto allo stesso registrato nel 2015.

Fig. 7 – Incidenza del fattore “dose di azoto” sull’IDMC del 2013, 2014 e 2015; NESS = nessuna, ALTO = alta, MEDIO = medio, BASSO = basso.



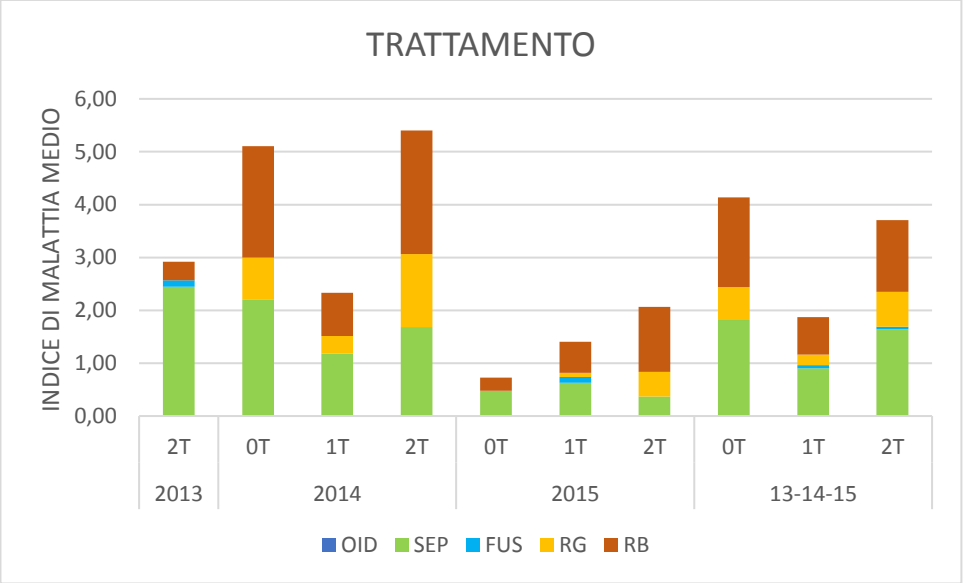
Nel grafico (Fig. 7) risulta discordante l'IDMC collegato a "nessuna dose di azoto" registrato nel 2014 rispetto allo stesso registrato nel 2015.

Fig. 8 – Incidenza del fattore "diserbo" sull'IDMC del 2013, 2014 e 2015; NESS = nessuno, c+f+m = , gsu+ap =



Nel grafico (Fig. 8) risulta discordante l'IDMC collegato a "nessun diserbo" registrato nel 2014 rispetto allo stesso registrato nel 2015.

Fig. 9 – Incidenza del fattore “diserbo” sull’IDMC del 2013, 2014 e 2015; 0T = nessun trattamento, 1T = 1 trattamento, 2T = 2 trattamenti.

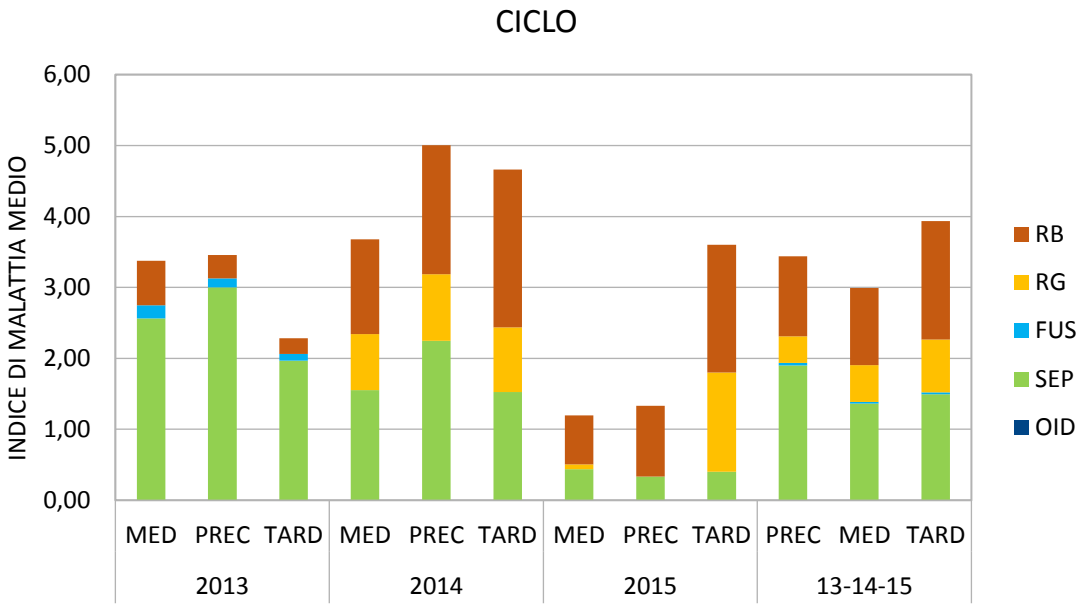


Dal grafico (Fig. 9) risulta discordante l’IDMC collegato a “nessun trattamento” registrato nel 2014 rispetto allo stesso registrato nel 2015.

6.1.3. Incidenza degli effetti genetici

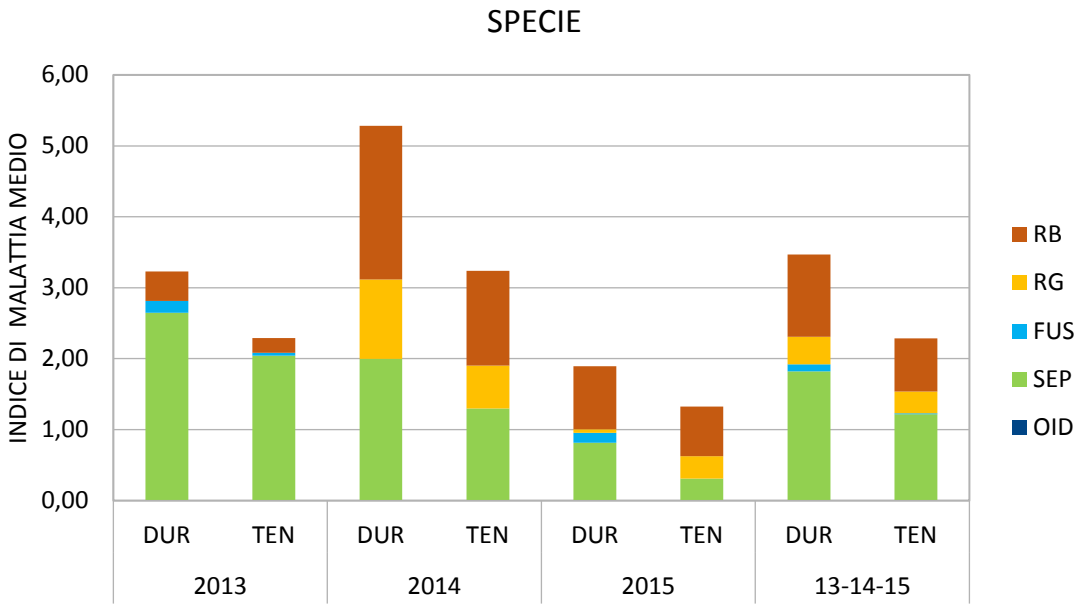
In seguito è stata effettuata l’analisi delle interazioni genetiche, quindi l’indice medio cumulato di malattia è stato rappresentato per ogni anno in funzione dei diversi fattori genetici noti e infine è stato riassunto per tutte e tre gli anni considerati.

Fig. 10 – Incidenza del fattore “ciclo” sull’IDMC del 2013, 2014 e 2015; MED = medio, PREC = precoce, TARD = tardivo.



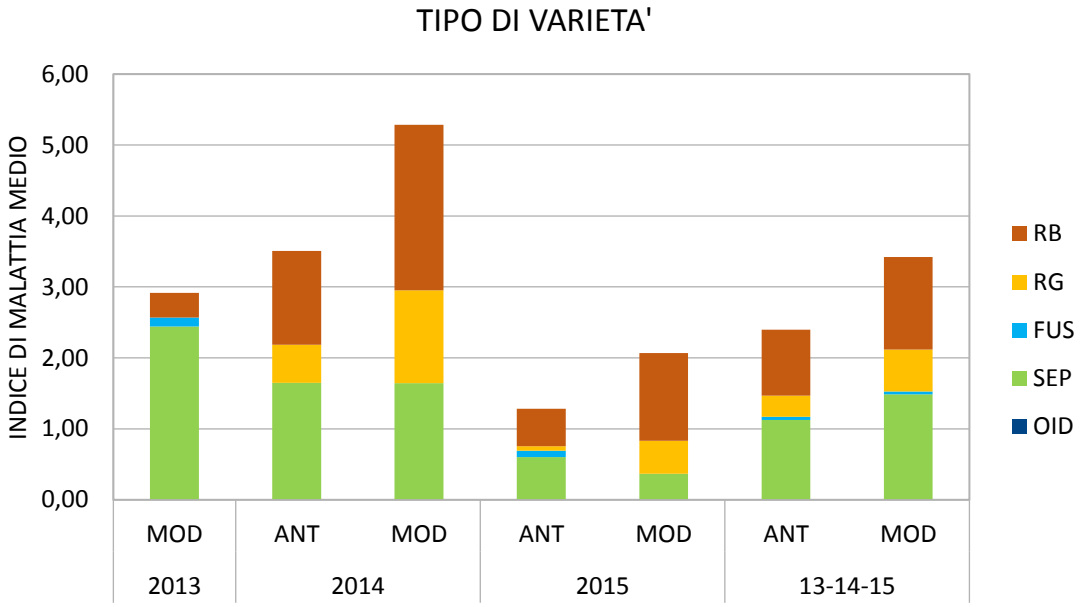
Dal grafico (Fig. 10) risulta che le varietà a ciclo medio hanno avuto minor IDMC sia nel 2014 che nel 2015. Diversamente è stato nel 2013 anno in cui ad ammalarsi meno sono state le varietà a ciclo tardivo. Un’osservazione interessante è l’alto indice di ruggine gialla registrato solo sulle varietà tardive nel 2015.

Fig. 11 – Incidenza del fattore “ciclo” sull’IDMC del 2013, 2014 e 2015; DUR = frumento duro, TEN = frumento tenero.



Dal grafico (Fig. 11) emerge che in tutti e tre gli anni il grano duro è stato sempre più suscettibile alla septoriosi e alla fusariosi della spiga rispetto al grano tenero.

Fig. 12 – Incidenza del fattore “tipo di varietà” sull’IDMC del 2013, 2014 e 2015; MOD = moderna, ANT = antica.



Dal grafico (Fig. 12) è evidente che sia nel 2014 che nel 2015 le varietà moderne sono state più suscettibili alla ruggine gialla e alla ruggine bruna, non alla septoriosi.

6.2. Effetti dei fattori climatici

Gli effetti che i fattori climatici hanno avuto sull'andamento epidemiologico degli agenti fitopatogeni considerati sono stati analizzati tramite l'analisi di regressione multipla.

Le variabili indipendenti x_1, x_2, x_3 considerate nel modello sono le variabili climatiche:

1. temperatura media,
2. temperatura massima,
3. temperatura minima,
4. mm di pioggia,

queste variabili sono riassunte in decadi per ogni località per tutti e tre gli anni. Poiché in molte osservazioni la temperatura media non corrisponde alla temperatura media ponderata ma alla media tra la temperatura massima e la minima e, per evitare che il modello restituisse coefficienti nulli data la diretta correlazione tra le tre misurazioni, sono state introdotte nell'elaborazione solo due delle tre variabili termiche, preferendo

quelle che hanno restituito valori più alti di significatività e correlazione lineare rispetto alla variabile y.

La variabile dipendente y è rappresentata dal valore medio dell'indice di malattia di:

1. ruggine gialla
2. ruggine bruna
3. septoriosi

registrato per ogni località ad ogni decade per tutti e tre gli anni. Tra le malattie considerate nella regressione sono state escluse l'oidio e la fusariosi poiché l'andamento epidemiologico è zero o prossimo allo zero, è pertanto impossibile fare associazioni statistiche con le variabili climatiche

Tab. 8 – I dati espressi nella tabella sono stati utilizzati per effettuare la regressione lineare multipla

Località	Anno	Decade	mm	Tmax	Tmin	Tmed	Sept	Fus	Rg	Rb
Ces	2013	30apr	12,0	22,4	8,5	15,4	0,9	0,0	0,0	0,0
Ces	2013	10mag	50,2	23,2	11,3	16,8	1,1	0,0	0,0	0,0
Ces	2013	20mag	30,0	21,5	9,8	15,4	2,1	0,0	0,0	0,0
Ces	2013	31mag	51,4	18,0	8,0	12,7	2,3	0,0	0,0	0,0
Ces	2013	10giu	3,8	23,3	11,2	17,0	7,7	1,0	0,0	1,7
Ces	2014	30apr	22,8	19,3	7,7	13,2	0,5	0	0	0
Ces	2014	10mag	19	20,1	6,8	13,8	1,2	0	0	0,6
Ces	2014	20mag	5	21,4	7,7	14,6	1,6	0	0,9	0,9
Ces	2014	31mag	6,8	23,1	9,7	16,7	2,2	0	1,2	4,3
Ces	2014	10giu	0	28	10	20	3,2	0	5,3	6,6
Ces	2015	20mag	0,0	25,6	9,7	18,3	0,2	0,0	0,3	0,7
Ces	2015	31mag	54,2	20,8	8,7	14,9	0,5	0,0	1,0	2,7
Ces	2015	10giu	19,0	29,8	12,3	21,2	1,0	0,0	1,0	2,8
MonPal	2014	30apr	21	23,7	9	15,0	0,5	0,0	0,0	0,0
MonPal	2014	10mag	30,2	24,7	7,4	15,3	0,9	0,0	0,0	0,2
MonPal	2014	20mag	0	24,5	7,7	16,2	1,1	0,0	0,6	0,1
MonPal	2014	31mag	23,4	29,3	9,2	17,7	1,6	0,0	0,8	1,7
MonPal	2014	10giu	0	34,9	9,1	21,8	2,5	0,0	1,0	2,7
MonPal	2015	30apr	1,2	23,9	6,1	15,4	0,3	0	0	0
MonPal	2015	10mag	12,4	29,8	8,2	17,6	0,4	0	0	0
MonPal	2015	20mag	0	29,5	9,6	19,2	0,4	0	0	0
MonPal	2015	31mag	10,4	26,2	8,5	16,1	0,5	0,1	0	0,4

MonPal	2015	10giu	24,0	34,1	10,6	23,2	1,2	0,4	0,2	1,4
MonTic	2014	30apr	16	18,3	10,0	14,1	2,0	0,0	0,0	0,3
MonTic	2014	10mag	45,8	19,2	9,5	14,3	2,0	0,0	0,0	2,0
MonTic	2014	20mag	23,8	20,1	9,6	14,8	2,3	0,0	2,7	2,0
MonTic	2014	31mag	3	22,9	12,5	17,7	2,3	0,0	2,7	2,0
MonTic	2014	10giu	0,2	26,4	14,0	20,2	2,3	0,0	2,7	4,3
MonSper	2014	30apr	17,2	19,9	8,8	14,4	0,7	0,0	0,0	0,0
MonSper	2014	10mag	15,4	21,7	6,7	14,2	2,0	0,0	0,0	0,7
MonSper	2014	20mag	0,0	22,5	7,7	15,1	2,0	0,0	0,3	1,0
MonSper	2014	31mag	12,0	24,2	9,8	17,0	3,3	0,0	0,3	4,0
MonSper	2014	10giu	1,6	29,9	10,6	20,3	3,3	0,0	0,3	6,7

6.2.1. Risultati della regressione multipla

Tab. 9 – Matrice di correlazione lineare di Pearson. I valori evidenziati rappresentano le correlazioni tra le variabili determinanti individuate dai modello

	Correlazioni di Pearson						
	mm	**T. massima**	**T. minima**	**T.media**	**Septoriosi**	**Ruggine gialla**	**Ruggine bruna**
mm	1	-0,403*	-0,080	-0,403*	-0,187	-0,267	-0,258
T. massima	-0,403*	1	0,297	0,912**	-0,014	0,164	0,346*
T. minima	-0,080	0,297	1	0,602**	0,370*	0,421*	0,491**
T.media	-0,403*	0,912**	0,602**	1	0,144	0,356*	0,532**
Septoriosi	-0,187	-0,014	0,370*	0,144	1	0,240	0,470**
Ruggine gialla	-0,267	0,164	0,421*	0,356*	0,240	1	0,654**
Ruggine bruna	-0,258	0,346*	0,491**	0,532**	0,470**	0,654**	1
	*. La correlazione è significativa a livello 0,05 (a due code).						
	**. La correlazione è significativa a livello 0,01 (a due code).						

6.2.1.1. Variabile dipendente “ruggine gialla”

I fattori climatici che sono meglio correlati con l’andamento della ruggine gialla secondo i modelli adottati sono:

1. temperatura minima;
2. temperatura minima e mm di pioggia;
3. temperatura minima, mm di pioggia e temperatura massima

Tab. 10 – Coefficiente di determinazione e significatività relativi ai modelli adottati della regressione lineare multipla

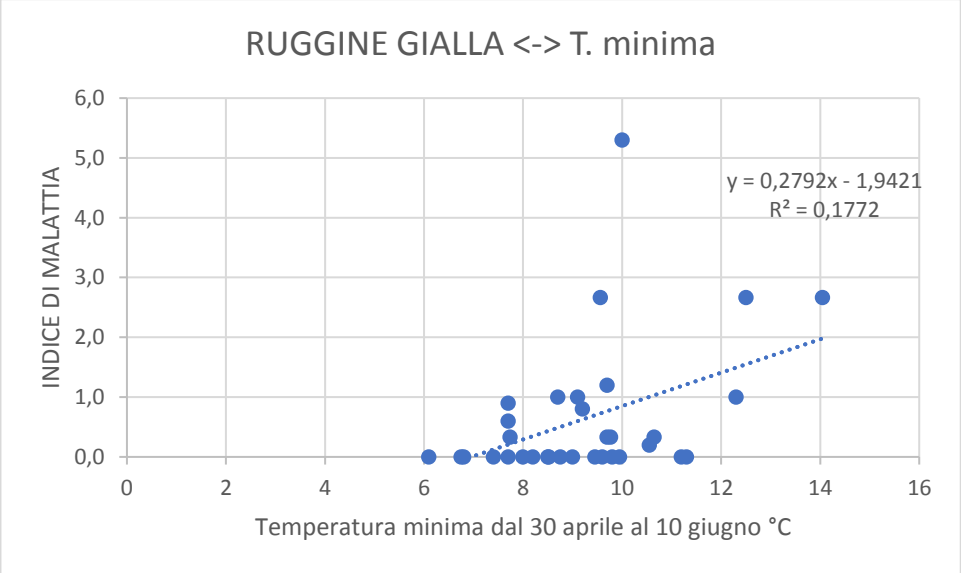
Riepilogo del modello		
Modello	R-quadrato	Sign.
1	0,177	0,015*
2	0,232	0,019*
3	0,235	0,048*
1. Predittori: (costante), T. minima		
2. Predittori: (costante), T. minima, mm		
3. Predittori: (costante), T. minima, mm, T. massima		

Tab. 11 – Coefficienti di correlazione standardizzati

Coefficienti[a]				
Modello		Coefficienti non standardizzati		Coefficienti standardizzati
		β	Errore std.	β
3	(Costante)	-1,215	1,429	

	T. minima	0,278	0,113	0,419
	Mm	-0,019	0,013	-0,260
	T. massima	-0,017	0,049	-0,065
Variabile dipendente: Ruggine gialla				

Fig. 13 – Grafico a dispersione in cui è rappresentata la retta e la funzione di regressione lineare tra l'andamento epidemiologico della ruggine gialla e la temperatura minima



6.2.1.2. Variabile dipendente "ruggine bruna"

I fattori climatici che sono meglio correlati con l'andamento della ruggine bruna secondo i modelli creati sono:

1. temperatura media;
2. temperatura media e temperatura massima;
3. temperatura media, temperatura massima e mm di pioggia

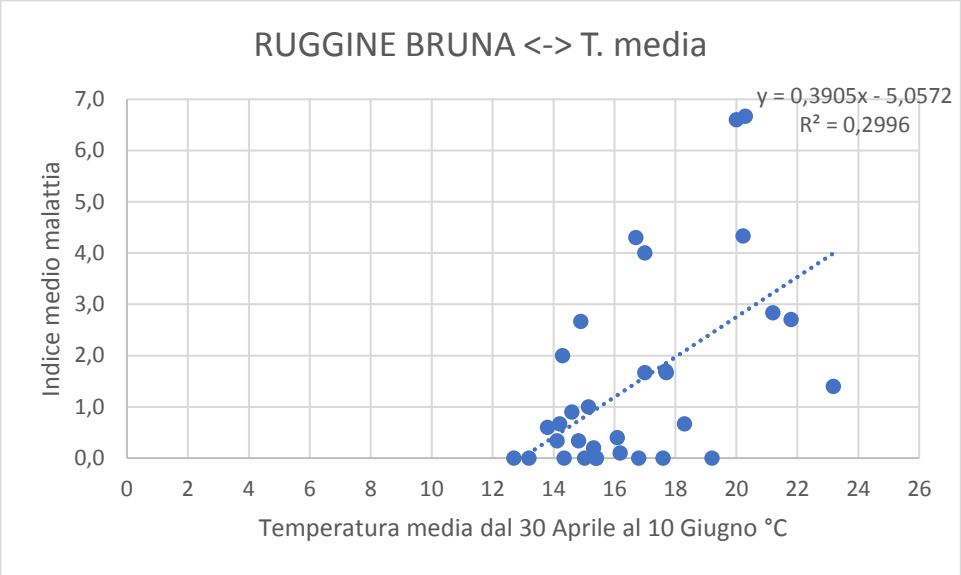
Tab. 12 – Coefficiente di determinazione e significatività relativi ai modelli adottati della regressione lineare multipla

Riepilogo del modello		
Modello	R-quadrato	Sign.
1	0,300	0,001**
2	0,333	0,002**
3	0,341	0,006**
1. Predittori: (costante), T. media		
2. Predittori: (costante), T. media, T. minima		
3. Predittori: (costante), T. media, T. minima, mm		

Tab. 13 – Coefficiente di determinazione e significatività relativi ai modelli adottati della regressione lineare multipla

Coefficienti[a]				
Modello		Coefficienti non standardizzati		Coefficienti standardizzati
		B	Errore std.	β
3	(Costante)	-5,096	2,142	
	T. media	0,252	0,151	0,353
	T. minima	0,275	0,209	0,254
	mm	-0,012	0,020	-0,103
Variabile dipendente: ruggine bruna				

Fig. 14 – Grafico a dispersione in cui è rappresentata la retta e la funzione di regressione lineare tra l'andamento epidemiologico della ruggine bruna e la temperatura media



6.2.1.3. Variabile dipendente "septoriosi"

Nel tentativo di migliorare i valori di correlazione dei modelli multivariati, gli indici di ciascuna malattia sono stati associati ai fattori climatici della decade precedente. In sostanza, la correlazione tra la media dell'andamento epidemiologico di ciascuna malattia è stata trasposta di una decade rispetto alle temperature e i mm di pioggia in modo da poter allargare le interpretazioni del modello, introducendo l'eventualità di periodi di incubazione lunghi e necessari affinché si manifestino i primi sintomi.

Questa trasposizione ha migliorato solo i risultati adottati dal modello con variabile dipendente "septoriosi" determinandone le seguenti variabili:

1. mm di pioggia;
2. mm di pioggia e temperatura minima;
3. mm di pioggia, temperatura minima e temperatura media;

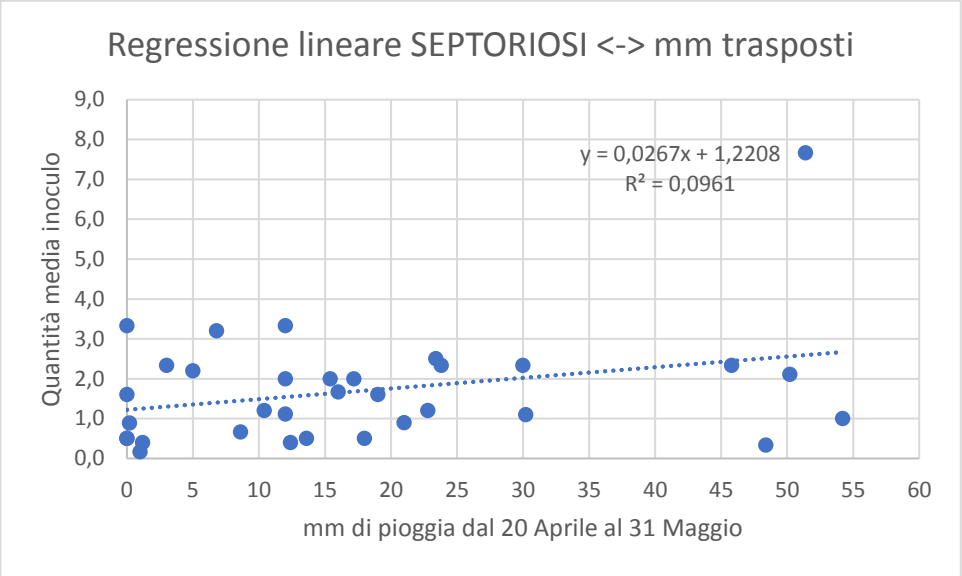
Tab. 14 – Coefficiente di determinazione e significatività relativi ai modelli adottati della regressione lineare multipla

Riepilogo del modello		
Modello	R-quadrato	Sign.
1	0,096	0,079
2	0,160	0,073
3	0,275	0,024*
1. Predittori: (costante), mm (trasposti)		
2. Predittori: (costante), mm, T. minima (trasposti)		
3. Predittori: (costante), mm, T. minima, T. media (trasposti)		

Tab. 15 – Coefficienti di correlazione standardizzati

Coefficienti[a]				
Modello		Coefficienti non standardizzati		Coefficienti standardizzati
		B	Errore std.	β
3	(Costante)	3,510	2,003	
	mm	0,010	0,015	0,114
	T. minima	0,458	0,172	0,636
	T. media	-0,378	0,177	-0,528
Variabile dipendente: septoriosi				

Fig. 15 – Grafico a dispersione in cui è rappresentata la retta e la funzione di regressione lineare tra l'andamento epidemiologico della septoriosi e i mm di pioggia



6.3. Analisi statistica dei risultati di laboratorio delle cariossidi

L'analisi statistica delle cariossidi campionate è stata effettuata separatamente prima per i 100 campioni e in seguito si è focalizzata sui 35 campioni di cui avevamo a disposizione anche i dati agronomici-varietali, climatici ed epidemiologici.

6.3.1. Risultati della distribuzione chi-quadrato

Il test del chi-quadrato è stato utilizzato per individuare le proporzioni tra le seguenti coppie di variabili estrapolate dalle analisi dei 100 campioni di cariossidi dando i relativi risultati di significatività:

- trattamento – micotossine; n.s
- trattamento – presenza di *Fusarium* spp.; $\chi^2 = 0{,}016$*
- trattamento – presenza di *Alternaria* spp.; n.s.
- trattamento – % di specie di *Fusarium* coinvolte; $\chi^2 = 0{,}000884$**
- trattamento – DON; n.s.

- trattamento – ZEA; n.s.
- presenza di *Fusarium* spp. – micotossine; χ^2 = 0,041*

specie frumento – % di specie di *Fusarium* coinvolte; χ^2 = 5,66844E-09**

- specie frumento – presenza di *Fusarium* spp.; n.s.
- specie frumento – presenza di *Alternaria* spp.; n.s.
- presenza di DON – % di specie di *Fusarium* coinvolte; χ^2 = 5,18408E-11**

Su 11 test del chi-quadro effettuati 2 sono risultati significativi (*) e 3 sono risultati altamente significativi (**):

Tab. 16 – Test del chi-quadro "trattamento – % di specie di *Fusarium* coinvolte" (**)

distribuzione delle specie di *Fusarium*		TRATTAMENTO		**
		0	1	TOT
1	%F.spp	17	21	38
2	%F.graminearum	4	3	7
3	%F.culmorum	2	1	3
4	%F.poae	12	54	66
5	%F.equiseti	3	9	12
6	%F.proliferatum	2	13	15
7	%F.scirpi	0	7	7
8	%F.acuminatum	5	6	11
9	%F.avenaceum	11	12	23
10	%F.subglutinans	1	0	1
11	%F.crookwellense	1	0	1
12	%F.semitectum	0	2	2
13	%F.tricinctum	2	0	2
14	%F.chlamydosporum	3	1	4
15	%F.oxyxporum	0	4	4
	TOT	63	133	196

Tab. 17 – Test del chi-quadro "presenza di DON – % di specie di *Fusarium* coinvolte" (**)

distribuzione delle specie di *Fusarium*		DON		**
		0	1	TOT
1	%F.spp	9	29	38
2	%F.graminearum	5	2	7

3	**%F.culmorum**	0	3	3
4	**%F.poae**	60	6	66
5	**%F.equiseti**	7	5	12
6	**%F.proliferatum**	9	6	15
7	**%F.scirpi**	4	3	7
8	**%F.acuminatum**	0	11	11
9	**%F.avenaceum**	12	11	23
10	**%F.subglutinans**	0	1	1
11	**%F.crookwellense**	0	1	1
12	**%F.semitectum**	0	2	2
13	**%F.tricinctum**	2	0	2
14	**%F.chlamydosporum**	3	1	4
15	**%F.oxyxporum**	4	0	4
	TOT	115	81	196

Tab 18. – Test del chi-quadro “specie frumento – % di specie di *Fusarium* coinvolte” (**)

distribuzione delle specie di *Fusarium*		**SPECIE**		**
		DURO	**TENERO**	**TOT**
1	**%F.spp**	36	1	37
2	**%F.graminearum**	**3**	**3**	**6**
3	**%F.culmorum**	3	0	3
4	**%F.poae**	19	44	63
5	**%F.equiseti**	10	2	12
6	**%F.proliferatum**	10	5	15
7	**%F.scirpi**	6	0	6
8	**%F.acuminatum**	8	3	11
9	**%F.avenaceum**	16	7	23
10	**%F.subglutinans**	1	0	1
11	**%F.crookwellense**	1	0	1
12	**%F.semitectum**	2	0	2
13	**%F.tricinctum**	2	0	2
14	**%F.chlamydosporum**	0	3	3
15	**%F.oxyxporum**	4	0	4
	TOT	121	68	189

Tab. 19 – Test del chi-quadro “trattamento – presenza di *Fusarium* spp.” (*)

TRATT	Presenza Fusarium		*
	0	1	TOT
0	28	22	50
1	13	29	42
TOT	41	51	92

Tab. 20 – Test del chi-quadro "presenza di *Fusarium* spp. – micotossine" (*)

PRESENZA FUSARIUM	PRESENZA MICOTOX		*
	0	1	TOT
0	34	8	42
1	36	22	58
TOT	70	30	100

6.3.2. Risultati dell'analisi univariata di varianza

L'analisi univariata della varianza è stata effettuata sui dati derivati dall'analisi dei campioni di cariossidi provenienti dalle varietà monitorate ("percentuale di colonizzazione fungina", "percentuale di *Alternaria* spp.", "percentuale di *Fusarium* spp.") e le variabili aleatorie "tipo di varietà" e "trattamento". Di seguito sono elencate le coppie di fattori analizzati con i relativi risultati di significatività e coefficiente di determinazione:

Tab. 21 – Risultati ANOVA

Tipo di varietà	Tratt	% totale colonie fungine	R^2	sign.	% *Alternaria* spp.	R^2	sign.	% *Fusarium* spp.	R^2	sign.	N
ANTICHE	0	67,1	-	-	4,4	-	-	0,2	-	-	9
	1	91,3	0,35	0,004**	13,7	0,27	0,014*	2,7	0,26	0,016*	12
media		80,9	-	-	9,7	-	-	1,6	-	-	21
MODERNE	1	75,5	-	-	13,5			1,2	-	-	14
	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

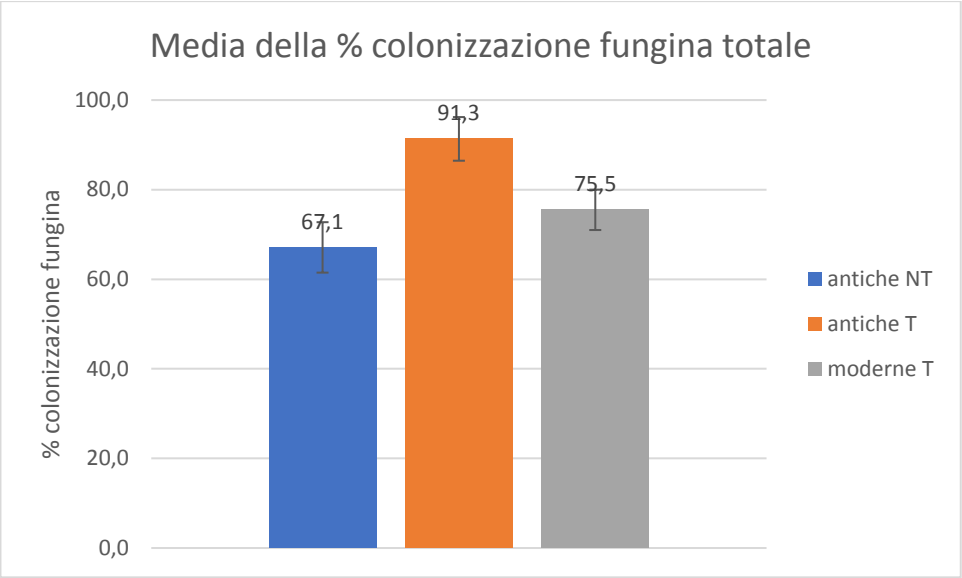


Fig. 16 – Media della percentuale di colonizzazione fungina totale sulle cariossidi provenienti dai campioni di varietà antiche trattate (T) e non trattate (NT) e varietà moderne trattate (T)

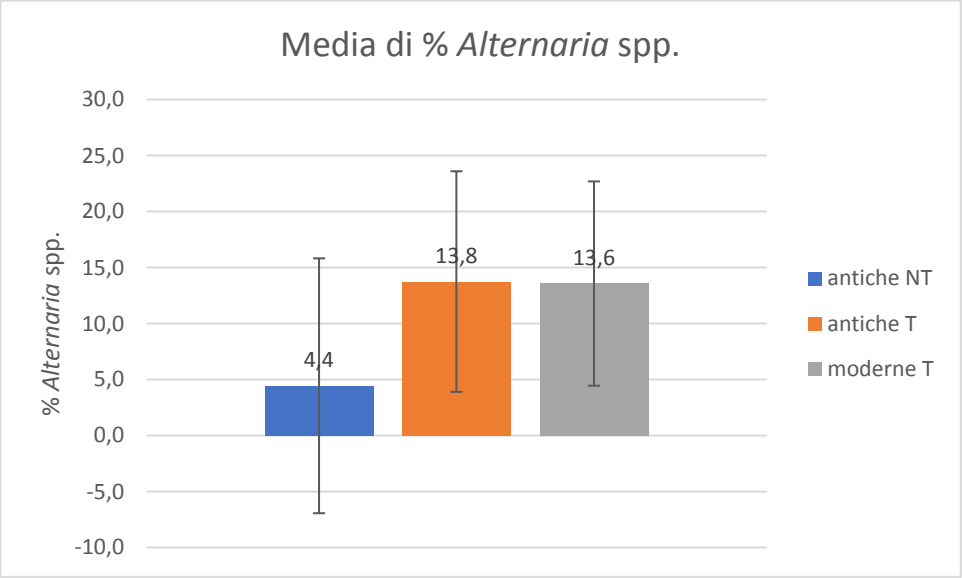


Fig. 17 – Media della percentuale di *Alternaria* spp. presente sulle cariossidi provenienti dai campioni di varietà antiche trattate (T) e non trattate (NT) e varietà moderne trattate (T)

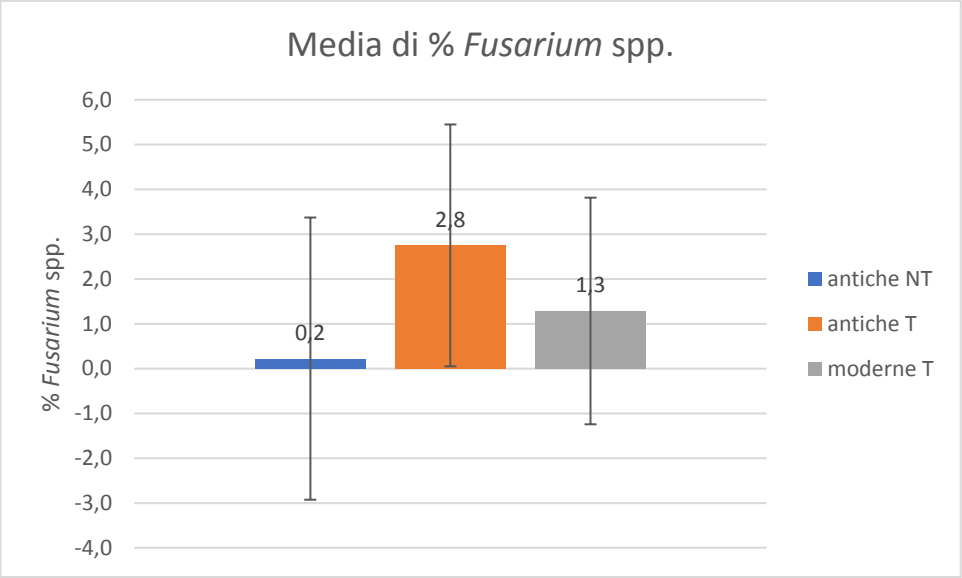


Fig. 18 – Media della percentuale di *Fusarium* spp. presente sulle cariossidi provenienti dai campioni di varietà antiche trattate (T) e non trattate (NT) e varietà moderne trattate (T)

7. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

7.1. Incidenza degli interventi agronomici osservati

Le osservazioni rilevanti derivate dall'analisi grafica delle interazioni agronomiche riguardano:

- Le malattie maggiormente riscontrate dal 2013 al 2015 nelle aziende campionate sono state septoriosi, ruggine bruna e ruggine gialla. L'oidio non è mai stato rilevato e i sintomi della fusariosi della spiga sono stati registrati solo nel 2013 e 2015 sia con bassa frequenza che con bassa intensità.
- le coltivazioni di frumento precedute dal maggese hanno riscontrato minore malattia
- le varietà seminate tra il 15 novembre e il 15 dicembre (semina media) sono state le più suscettibili.

- le varietà coltivate con lavorazioni profonde sono state le più suscettibili nel 2014 sia alle ruggini che alla septoriosi, nel 2015 solo alle ruggini.

7.2. Effetti genetici osservati

Le osservazioni rilevanti derivate dall'analisi grafica delle interazioni genetiche riguardano

- la maggiore suscettibilità del grano duro rispetto al grano tenero alla fusariosi e alla septoriosi
- la maggiore suscettibilità delle varietà moderne rispetto alle varietà antiche alla ruggine gialle e alla ruggine bruna.
- la maggiore suscettibilità delle varietà antiche alla septoriosi.

7.3. Comparazione dei risultati della regressione lineare multipla con l'andamento termopluviometrico

Ai fini di migliorare la comparazione tra le variabili e i relativi coefficienti individuati dalla regressione multipla e l'andamento epidemiologico, per ciascuna malattia sono state indicate graficamente le temperature cardinali di sviluppo estrapolate dalla letteratura scientifica.

Andando a ricercare nei grafici termopluviometrici le relazioni tra le soglie termiche e le variabili determinanti è possibile giustificare l'indice medio di malattia delle stesse varietà ripetute nei diversi anni sia a Cesa che a Montepaldi. Comparare varietà ripetute nelle stesse località per più anni ci consente di standardizzare l'effetto varietale e l'effetto agronomico e di evidenziare i rapporti tra le variabili scelte dal modello, le soglie termiche estrapolate dalla letteratura scientifica e l'indice medio di malattia calcolato tramite l'elaborazione dei dati dei rilievi fitosanitari.

7.3.1. Effetti dei fattori climatici sullo sviluppo di ruggine gialla

L'effetto dei fattori climatici che influenzano l'andamento di ruggine gialla è rappresentato secondo i seguenti parametri

- T. minima β = 0,419
- mm β = -0,26
- T. massima β = -065

Questi valori indicano che lo sviluppo della ruggine gialla è direttamente correlato alle temperature minime, al contrario, è inversamente correlato alle precipitazioni e alle temperature massime le quali lo "ostacolano leggermente".

Nel caso della ruggine gialla le soglie termiche prescelte per la comparazione sono la temperatura massima di sviluppo e minima di sporulazione, rispettivamente 20 °C e 5 °C. (Chai *et al.*, 2014). Queste soglie sono rappresentate dagli assi orizzontali tratteggiati e intersecano rispettivamente la temperatura minima e la temperatura massima. Gli istogrammi indicano la quantità di mm di pioggia caduti ad ogni decade.

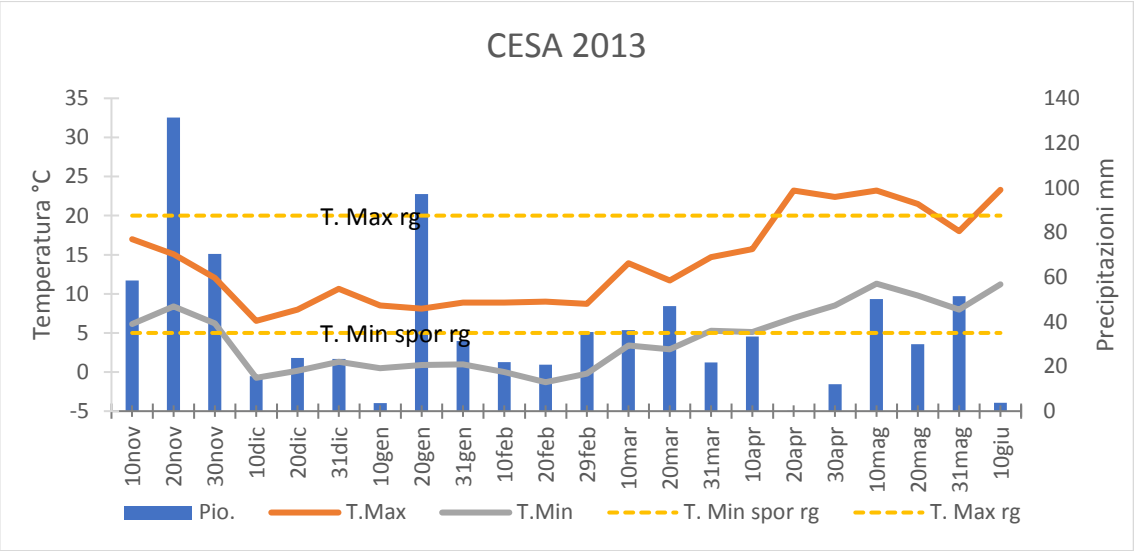


Fig. 19 – Grafico termopluviometrico di Cesa 2013

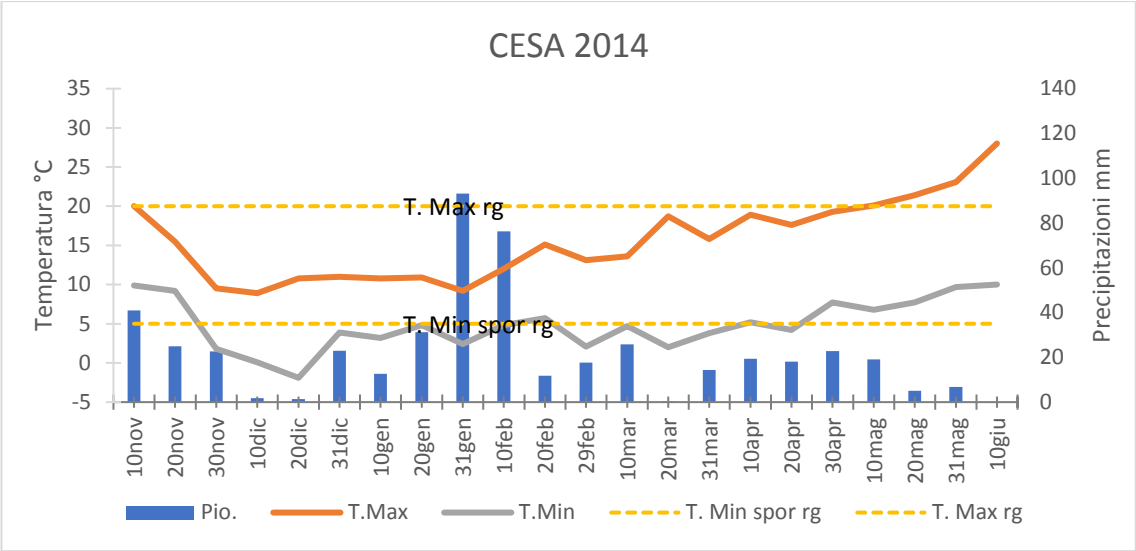


Fig. 20 – Grafico termopluviometrico di Cesa 2014

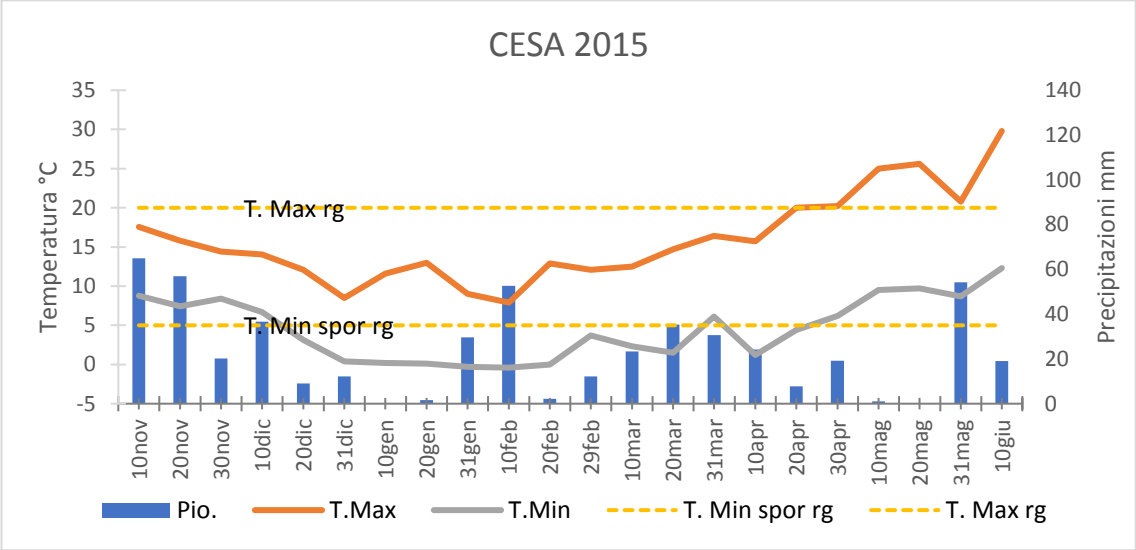


Fig. 21 – Grafico termopluviometrico di Cesa 2015

Nella Tab. 22 sono riassunte le osservazioni interessanti emerse dalla comparazione grafica associate all'indice medio di ruggine gialla. Nel 2013 non c'è stata malattia nonostante la temperatura minima di sporulazione sia stata superata precocemente (nella decade del "10apr"), tuttavia sia le precipitazioni che la temperatura massima

sono state sfavorevoli allo sviluppo epidemiologico. Il 2014 invece è stato l'anno con maggiore indice di malattia, in cui la ruggine gialla ha potenzialmente beneficiato più a lungo di temperature ottimali per lo sviluppo e in cui è piovuto meno. Il 2015 presenta una situazione intermedia rispetto alle altre due annate estreme.

CESA	Indice RG	T. min>5°C	T. max>20°C	giorni sviluppo	media mm (dal 20apr al 10giu)	effetto mm
2013	0	10apr	20apr	10	24,6	--
2014	5,5	20apr	10mag	20	11,9	+
2015	1	20apr	30apr	10	16,9	-

Tab. 22 – Tabella riassuntiva delle comparazioni osservate a Cesa rispetto all'andamento climatico, epidemiologico e le temperature cardinali di *Puccinia striiformis* (RG)

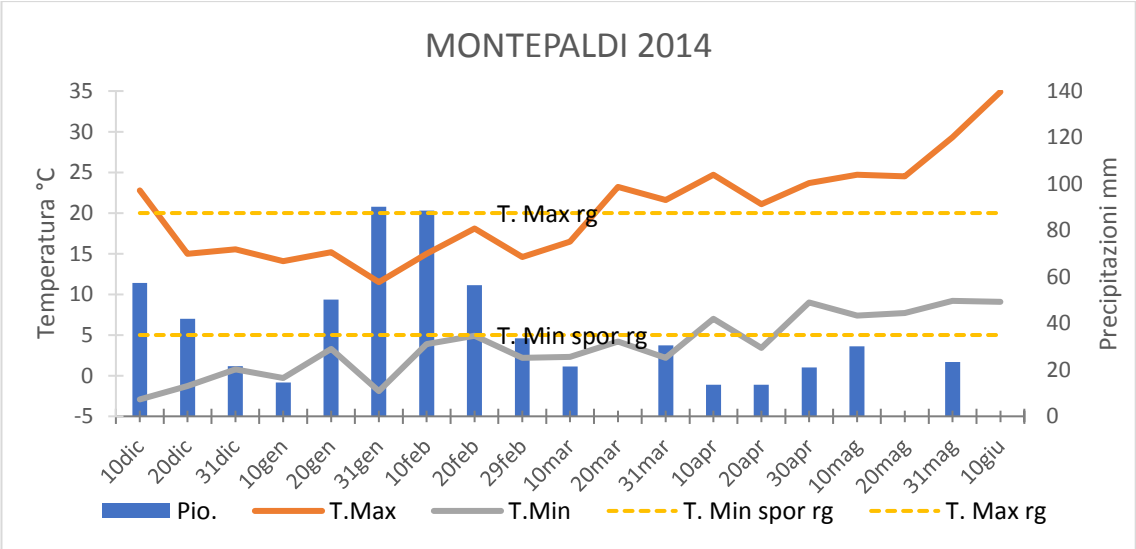


Fig. 22 – Grafico termopluviometrico di Montepaldi 2014

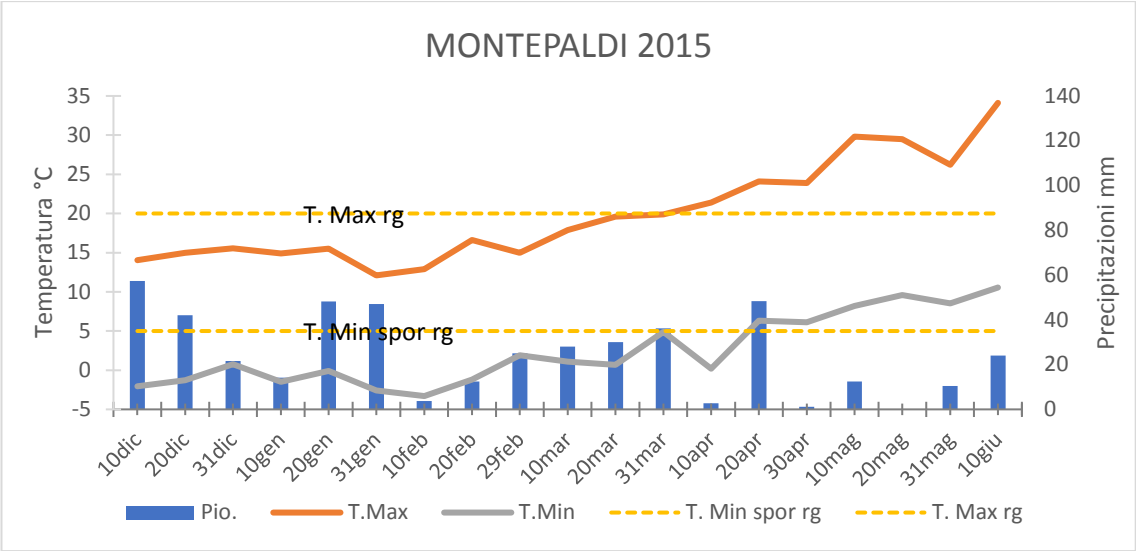


Fig. 23 – Grafico termopluviometrico di Montepaldi 2015

MPAL	Indice RG	T. min>5°C	T. max>20°C	giorni sviluppo	media mm (dal 20apr al 10giu)	effetto mm
2014	0,8	10apr	20mar	-21	14,7	+
2015	0,2	20apr	31mar	-20	16	-

Tab. 23 – Tabella riassuntiva delle comparazioni osservate a Montepaldi rispetto all'andamento climatico, epidemiologico e le temperature cardinali di *Puccinia striiformis* (RG)

A Montepaldi l'indice di ruggine gialla è molto inferiore rispetto a Cesa, sia il 2014 che il 2015. La marcata differenza può essere spiegata da un possibile effetto varietale (le varietà coltivate a Montepaldi sono tutte varietà antiche, quelle coltivate a Cesa sono tutte varietà moderne), da un possibile effetto agronomico anche se entrambi i regimi sono convenzionali, ma anche da un diverso andamento climatico derivante da una differente situazione topografica. Da quanto emerge nelle Fig. 22-23 a Montepaldi vi è in entrambi gli anni una marcata escursione termica tra il giorno e la notte, tale che, cumulandone l'effetto nelle decadi, la temperatura massima di sviluppo di *Puccinia striiformis* è superata prima ancora che la temperatura minima superi la soglia termica

inferiore (Tab. 23). Queste condizione “estreme” potrebbero ridurre la possibilità che l’inoculo riesca a proliferare.

7.3.2. Effetti dei fattori climatici sullo sviluppo di ruggine bruna

Dall’analisi multipla effettuata tra l’andamento epidemiologico della ruggine bruna e le variabili climatiche è risultato, con alta significatività (*P* = 0,00*1*), che la variabile indipendente determinante è la temperatura media, a seguire la temperatura minima e infine i mm di pioggia. Il modello è altamente significativo con *P* = 0,006, rappresentativo per R^2 = 0,34 e i coefficienti standardizzati sono β_{Tmed} = 0,353; β_{Tmin} = 0,254; β_{mm} = -0,103.

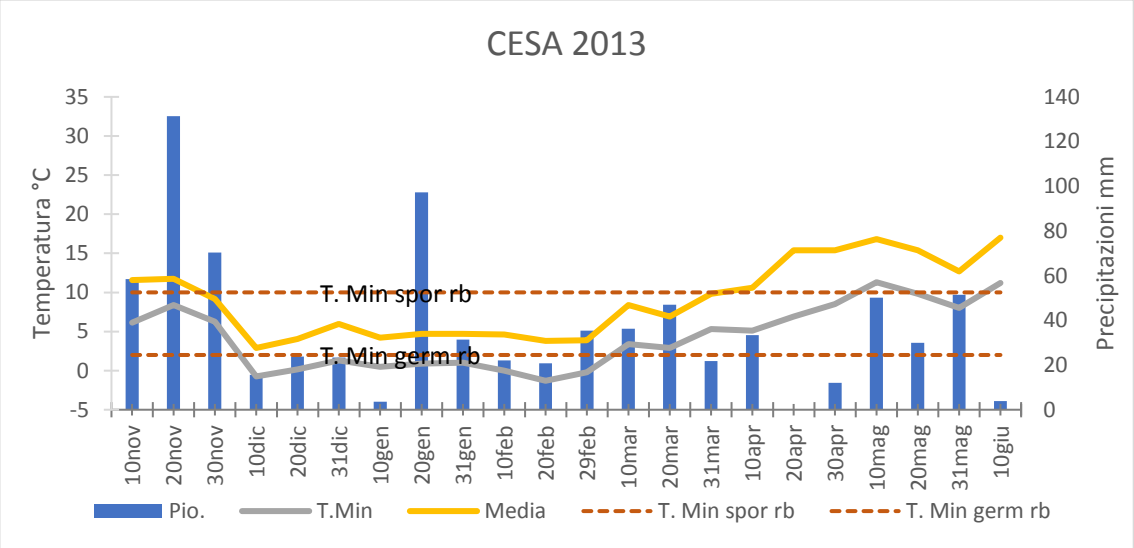


Fig. 24 – Grafico termopluviometrico di Cesa 2013

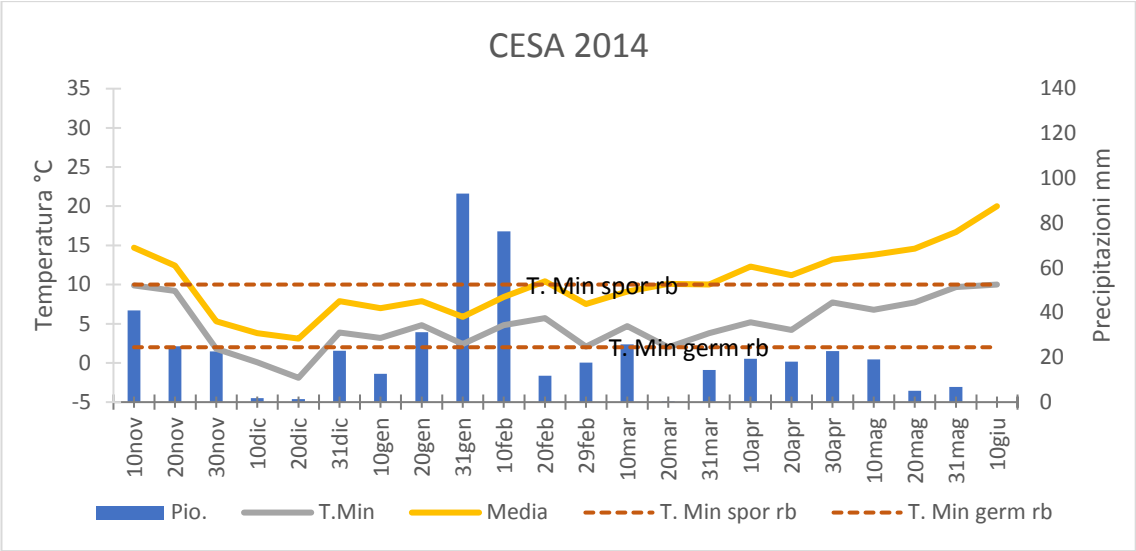


Fig. 25 – Grafico termopluviometrico di Cesa 2014

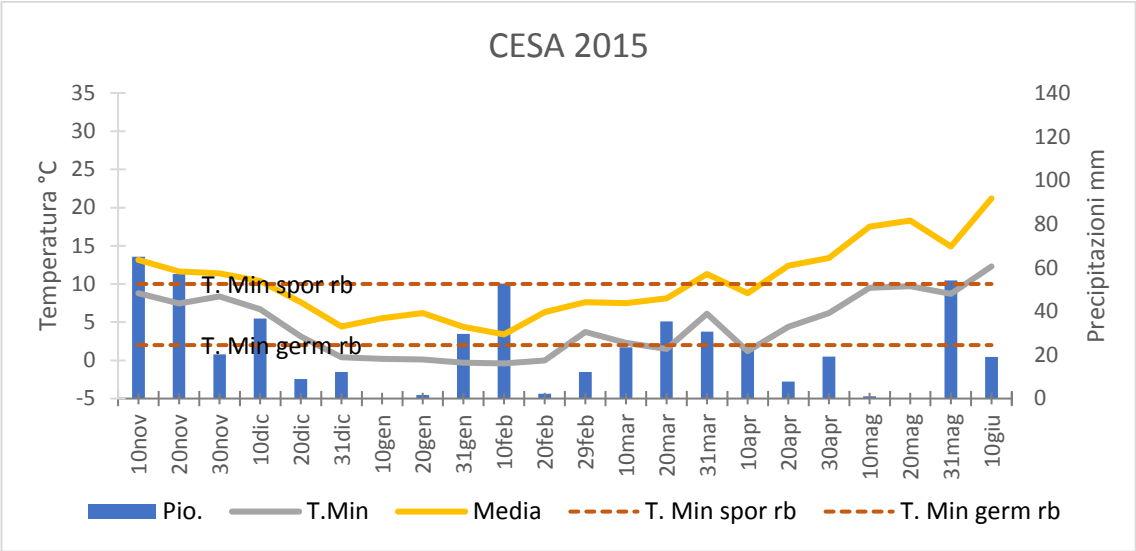


Fig. 26 – Grafico termopluviometrico di Cesa 2015

Nelle Fig. 24-25-26 sono state messe a confronto le variabili determinanti prescelte dal modello con le relative soglie termiche di *Puccinia triticina* (Chai *et al.*, 2016).

Dai grafici è difficile comprendere il ruolo della temperatura minima, nonostante il modello gli abbia attribuito un coefficiente di 0,254. Considerando che per la regressione

multipla sono state prese in considerazione le misurazioni a partire dalla decade in cui si presentano i primi sintomi ("20apr"), osservando i grafici risulta contraddittoria l'annata 2014, anno in cui c'è più malattia ma le temperature minime dal 20 aprile sono mediamente più basse rispetto agli altri due anni. A questo punto della comparazione grafica, la variabile indipendente "temperatura minima" è stata considerata non più con gli stessi limiti temporali del modello, ma anche rispetto alle misurazioni precedenti alla manifestazione dei primi sintomi, allargando le interpretazioni dei risultati della regressione lineare. Confrontando quindi la temperatura media determinante per 0,353 con alta significatività, con la temperatura minima di sporulazione (10 °C) e la temperatura minima con la temperatura minima di germinazione del patogeno (2 °C) emergono le seguenti osservazione riassunte in Tab. 24:

CESA	Indice RB	T. min>2°C	T. med>10°C	media mm	effetto mm
2013	1,5	10mar	10apr	24,6	--
2014	4,8	31dic	31mar	11,9	+
2015	2,8	28feb	10apr	16,8	-

Tab. 24 – Tabella riassuntiva delle comparazioni osservate a Cesa rispetto all'andamento climatico, epidemiologico e le temperature cardinali di *Puccinia triticina*

I mesi di gennaio, febbraio e marzo 2014 sono stati più caldi dei rispettivi mesi del 2013 e del 2015. Le temperature minime invernali sono sempre state maggiore di 2 °C e le temperature medie hanno raggiunto precocemente i 10 °C, già dalla decade del "31mar". Ciò potrebbe significare che nel 2014 il patogeno non è mai propriamente entrato in quiescenza ma è rimasto attivo probabilmente sugli ospiti secondari e una volta raggiunto il termoperiodo e fotoperiodo ottimale (Chai *et al.*, 2016), ha iniziato a sporulare e infettare il grano. Inoltre, confermando l'interpretazione della regressione, l'effetto pioggia è positivo alla malattia poiché è l'anno in cui è piovuto meno.

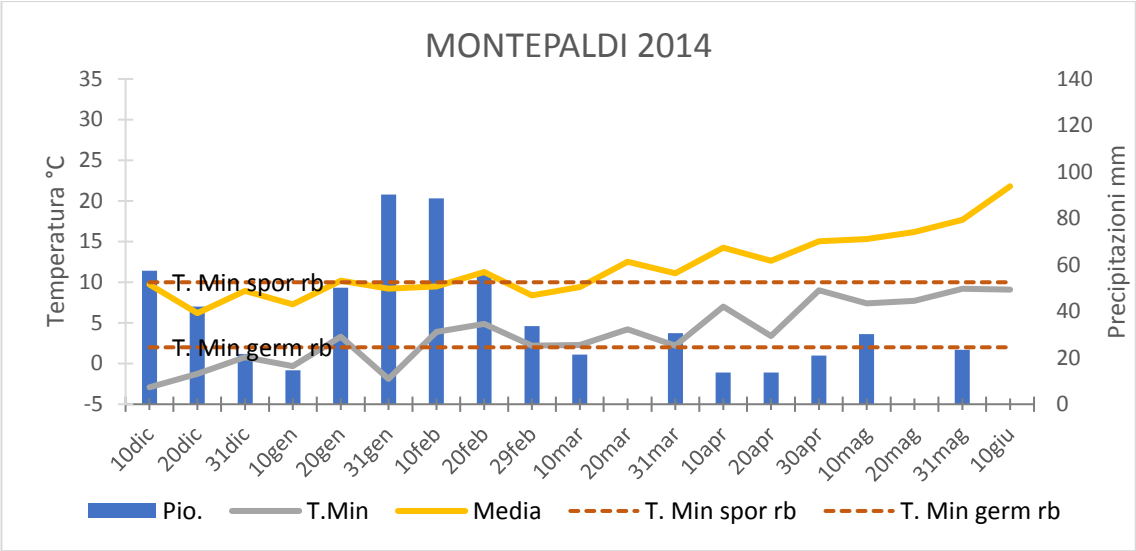


Fig. 27 – Grafico termopluviometrico di Montepaldi 2014

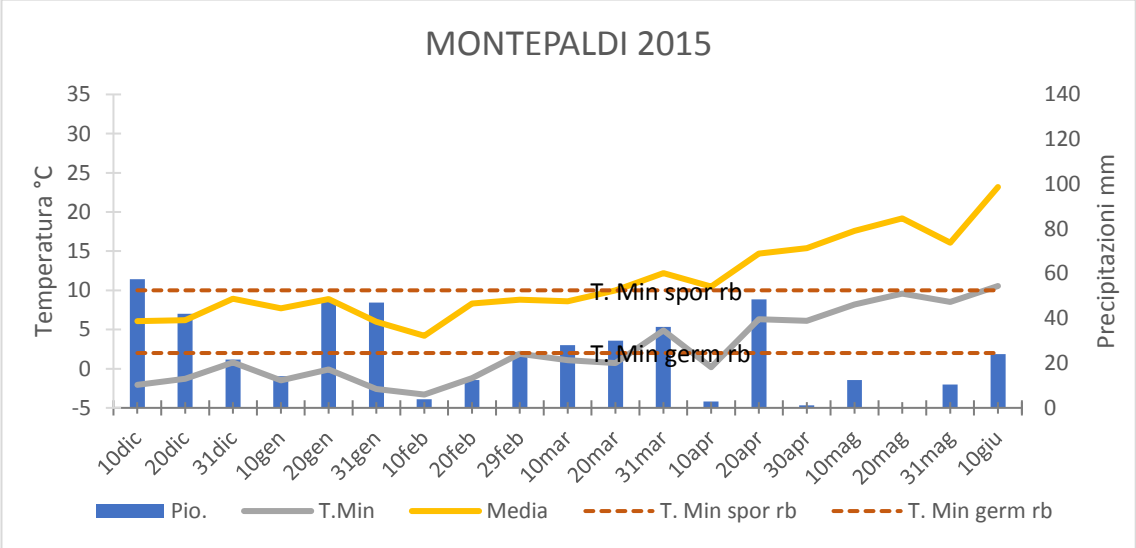


Fig. 28 – Grafico termopluviometrico di Montepaldi 2015

MPAL	Indice RB	T. min>2°C	T. med>10°C	media mm	effetto mm
2014	2,3	10feb	10mar	14,7	+
2015	1,7	20mar	20mar	16	-

Tab. 25 – Tabella riassuntiva delle comparazioni osservate a Montepaldi rispetto all'andamento climatico, epidemiologico e le temperature cardinali di *Puccinia triticina* (RG)

Confrontando l'indice di ruggine bruna indicata nella seconda colonna della tabella (Tab. 25) con la quantità di ruggine gialla registrata il 2014 e il 2015, è possibile notare che entrambe le annate a Montepaldi sono state maggiormente favorevoli alla ruggine bruna.

Poiché *Puccinia triticina* è maggiormente termofila rispetto a *Puccinia striiformis*, è possibile che il microclima presente a Montepaldi sia più favorevole al suo sviluppo.

Come è possibile notare dalla Tab. 25 il 2014 è l'anno con maggiore presenza di ruggine bruna ed è anche l'anno in cui la temperatura minima e la temperatura media hanno superato prima le rispettive soglie termiche e "l'effetto precipitazione" ne ha favorito lo sviluppo.

7.3.3. Effetti dei fattori climatici sullo sviluppo di septoriosi

Il modello che ha spiegato meglio le associazioni tra la septoriosi e i fattori climatici è stato quello in cui l'andamento epidemiologico è stato comparato alle misurazioni termopluviometriche della decade precedente. Le variabili maggiormente correlate sono i mm di pioggia trasposti, la temperatura minima trasposta e la temperatura media trasposta, con $P = 0,41$, $R^2 = 0,27$ e $\beta_{mm} = 0,114$; $\beta_{Tmin} = 0,636$; $\beta_{Tmed} = -0,528$.

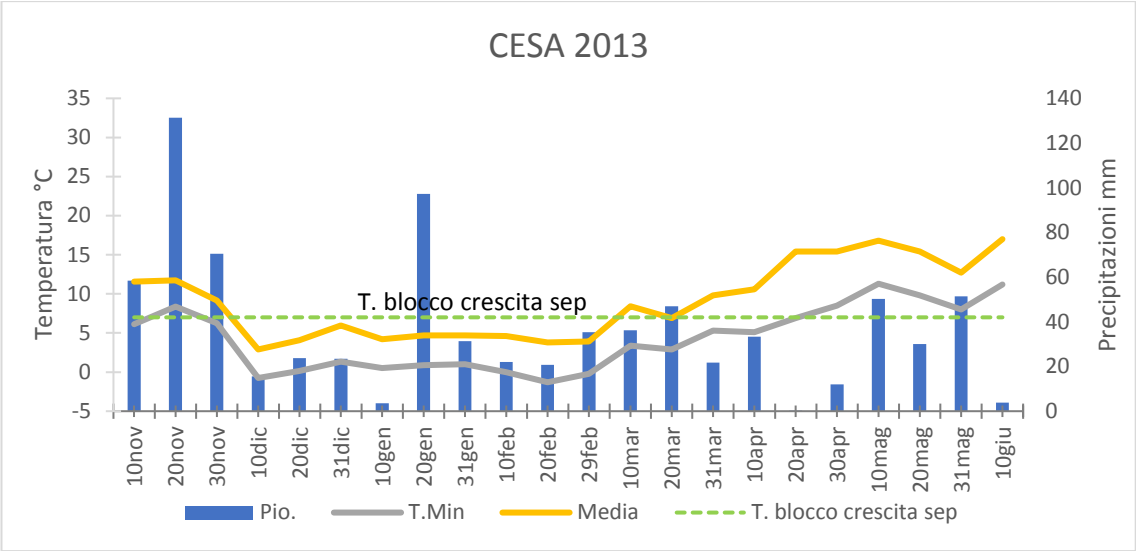


Fig. 29 – Grafico termopluviometrico di Cesa 2013

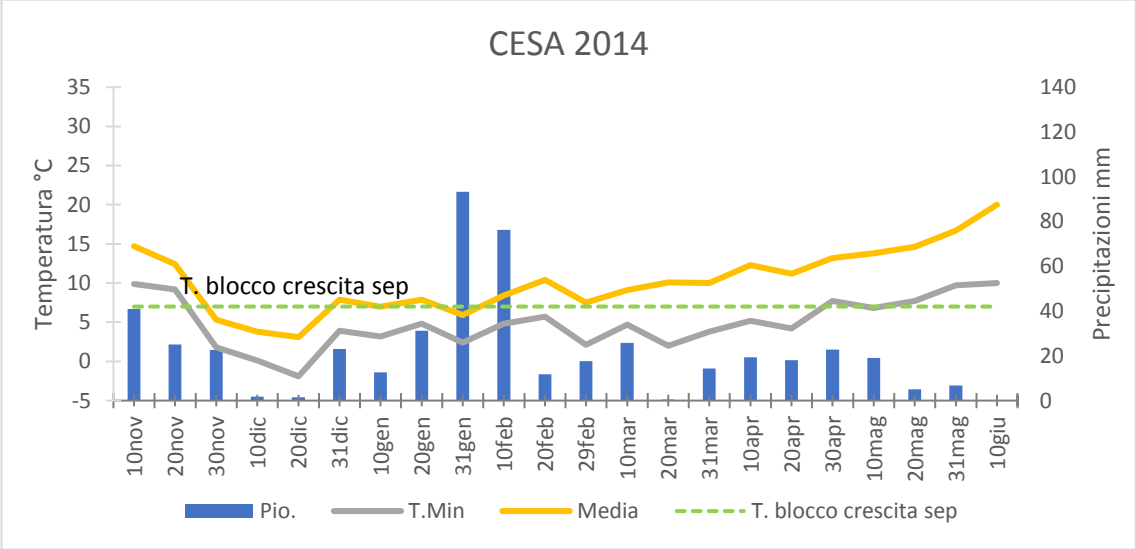


Fig. 30 – Grafico termopluviometrico di Cesa 2014

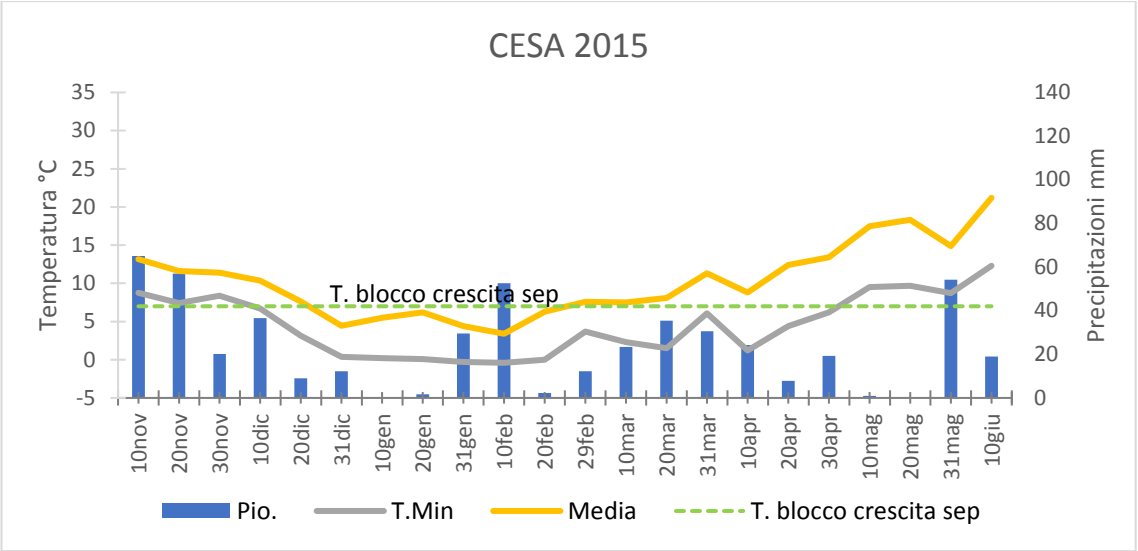


Fig. 31 – Grafico termopluviometrico di Cesa 2015

CESA	Indice SEP	T.min>7°C	media Tmed	effetto media	media mm	effetto mm
2013	7,8	20apr	15,4	-	24,6	++
2014	3	30apr	14,9	+	12	-
2015	1	30apr	16,2	--	16,8	+

Tab. 26 – Tabella riassuntiva delle comparazioni osservate a Cesa rispetto all'andamento climatico, epidemiologico e le temperature cardinali della septoriosi (SEP)

Dalla Tab. 26 emerge che a Cesa, il 2013 è stato l'anno con maggiore presenza di septoriosi. Considerando la soglia termica minima di 7 °C e "l'effetto precipitazioni", è possibile giustificare tale andamento poiché il 2013 è stato l'anno in cui la temperatura minima ha superato precocemente i 7 °C ed è stato l'anno più piovoso.

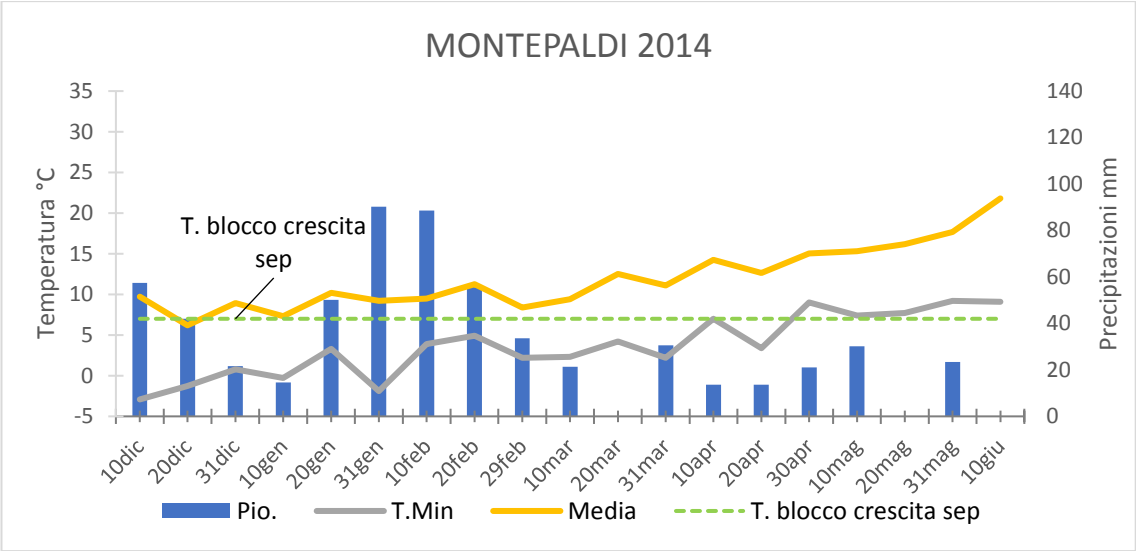


Fig. 32 – Grafico termopluviometrico di Montepaldi 2014

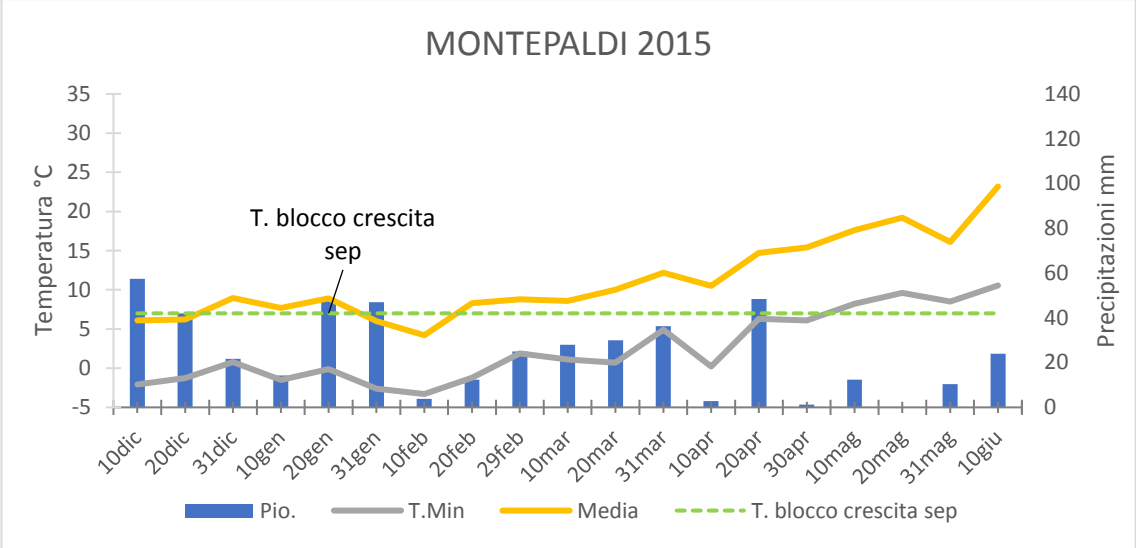


Fig. 33 – Grafico termopluviometrico di Montepaldi 2015

MPAL	Indice SEP	T.min>7°C	T.med	effetto media	media mm	effetto mm
2014	2,5	30apr	16,4	+	14,7	-
2015	1	10mag	17,7	-	16	+

Tab. 27 – Tabella riassuntiva delle comparazioni osservate a Montepaldi rispetto all'andamento climatico, epidemiologico e le temperature cardinali della septoriosi

Anche a Montepaldi è possibile associare l'andamento epidemiologico della septoriosi in entrambi gli anni.

7.4. Effetti climatici comparati

Parametri	β ruggine gialla	β ruggine bruna	β septoriosi
T. minima	0,419	0,254	0,636
mm	-0,26	-0,103	0,114
T. massima	-0,065	-	-
T. media	-	0,353	-0,528
R^2	0,235	0,341	0,275
Sign.	0,048*	0,006**	0,024*

Tab. 28 – Riassunto dei risultati della regressione lineare multipla

La Tab. 28 riassume i coefficienti standardizzati calcolati dalla regressione lineare multipla effettuata tra l'andamento climatico del 2013, 2014, 2015 e i relativi andamenti epidemiologici della septoriosi, ruggine gialla e ruggine bruna.

La **temperatura minima** è una variabile positivamente correlata a tutte le malattie considerate. Normalmente col proseguire della stagione vegetativa, le temperature minime aumentano e conseguentemente aumentano gli attacchi fitopatogeni. Data la maggiore precocità sia del complesso della septoriosi che della ruggine gialla, i relativi coefficienti standardizzati sono maggiormente determinanti rispetto al coefficiente standardizzato della ruggine bruna.

Anche i **mm di precipitazioni** sono una variabile determinante per tutte le malattie considerate, tuttavia è necessario definire l'effetto che le precipitazioni hanno sull'epidemiologia degli agenti fitopatogeni considerati nella regressione. Dai modelli emerge che le ruggini sono negativamente correlate ad eccessivi eventi piovosi, al

contrario la septoriosi è positivamente correlata. Questo è spiegabile poiché la dispersione delle uredospore delle ruggini è anemofila pertanto è favorita dalle stagioni secche e ventose. La septoriosi invece infetta l'ospite tramite gli schizzi di pioggia che spargono sulle superfici fogliari del frumento le ascospore e i conidi rilasciati rispettivamente dagli pseudoteci e dai picnidi; in questo caso dunque la pioggia è il veicolo dell'infezione. La variabile "precipitazioni" non è da confondere dunque con la bagnatura fogliare e umidità relativa, queste ultime infatti sono necessarie sia alle ruggini che alla septoriosi affinché possano germinare e infettare l'ospite.

La **temperatura media** è positivamente correlata alla ruggine bruna e negativamente correlata alla septoriosi. Ciò significa che all'aumentare della temperatura media, l'indice di ruggine bruna aumenta, al contrario, l'indice di septoriosi diminuisce. Questo risultato è giustificabile dal fatto che la ruggine bruna attacca tardivamente l'ospite, ha pertanto bisogno di temperature medie più elevate, la septoriosi invece, essendo più precoce, potrebbe essere inibita dal rapido innalzamento delle temperature medie.

La **temperatura massima** ha un ruolo leggermente determinante solo nel modello con la variabile dipendente "ruggine gialla". Il coefficiente standardizzato relativo alla temperatura massima ha un valoro molto basso (0,065) e ha segno negativo. Ciò potrebbe indicare che l'influenza che la temperatura massima ha sullo sviluppo della ruggine gialla è esigua e all'innalzamento delle temperature massime lo sviluppo della ruggine gialla diminuisce leggermente.

Dalle interazioni climatiche estrapolate dalla regressione e comparate con i grafici termopluviometrici è stato possibile giustificare solo alcuni dei parametri indicati dai coefficienti di correlazione standard. È nata da ciò l'esigenza di allargare le interpretazioni dei modelli proposti dalla regressione attraverso la comparazione dell'andamento termopluviometrico con le temperature cardinali degli agenti fitopatogeni considerati estrapolate dalla letteratura scientifica. Questo ha concesso, tramite un metodo induttivo, di ampliare i margini di correlazione introducendo nella comparazione tra le variabili climatiche, epidemiologiche e le soglie termiche, i valori

termopluviometrici del periodo antecedente ai rilievi fitosanitari. Per giustificare il potenziale d'inoculo in un dato periodo, occorre indagare sulle condizioni climatiche dei periodi precedenti. La trasposizione di una decade degli indici di malattia con le variabili climatiche ha migliorato solo i risultati riguardanti l'andamento della septoriosi, tuttavia 10 giorni sono comunque pochi per giustificare il potenziale d'inoculo. Oltre a ciò alcuni modelli di monitoraggio delle ruggini (Chai *et al.*, 2016) suggeriscono un comportamento di accumulo gradi-giorno da parte delle stesse. Un meccanismo di stress da freddo è stato adattato per *Puccinia triticina* negli USA (Roelfs, 1989). La soglia è stata fissata a 10° C, e il tasso di accumulazione di stress pari a -0.0005/settimana. Pertanto secondo questi autori, le ruggini hanno bisogno di accumulare nel periodo di sviluppo una somma di gradi-giorno che consente loro di avviare la sporulazione. Secondo questo modello, se la temperatura media ha superato stabilmente i 10 °C, *Puccinia triticina* inizia ad accumulare i gradi-giorni e ciò dà avvio allo sviluppo del patogeno, ma ogni qualvolta che la temperatura scende al di sotto dei 10° C lo sviluppo rallenta e sia i sori che le spore tardano nella maturazione. Questo meccanismo giustifica sia l'importanza della temperatura minima che della temperatura media individuata con alta significatività nel modello di regressione lineare multipla con variabile dipendente "ruggine bruna". Quindi le condizioni climatiche che si verificano prima della manifestazione dei sintomi sono anch'esse determinanti verso lo sviluppo degli agenti fitopatogeni però i soli modelli di correlazione espressi dalla regressione multipla risultano limitati nello spiegare l'andamento epidemiologico. Inoltre l'aggiunta delle soglie termiche nella comparazione permette di concretizzare tramite un approccio empirico le relazioni espresse dai coefficienti di correlazione. Tali soglie hanno anche il compito di fornire agli agricoltori delle indicazioni più immediate e pratiche che migliorino il monitoraggio del frumento e consentano di prevedere e prevenire rischi di gravi epidemie.

Riassumendo dunque le osservazioni empiriche emerse dalla comparazione:

Per quanto riguarda la **ruggine gialla**, è emerso che nell'anno in cui a Cesa la temperatura minima ha superato stabilmente e precocemente (inizio aprile) la soglia minima di sporulazione pari a 5° C, l'indice di malattia è stato più alto. A Montepaldi, sia

nel 2014 che nel 2015, è stato invece registrato un basso indice di malattia e questo potrebbe essere spiegato o da una possibile risposta varietale o dall'andamento climatico, che in entrambi gli anni potrebbe avere ostacolato lo sviluppo del patogeno, data la forte escursione termica giornaliera e il raggiungimento della soglia massima di sviluppo (20 °C) prima ancora che la temperatura minima abbia superato la soglia fissata a 5 °C.

Sebbene la **ruggine bruna** sia più termofila della ruggine gialla, la temperatura minima raramente, sia a Cesa che a Montepaldi, ha superato la soglia minima di sporulazione pari a 10 ° C, ciò nonostante, tranne nel 2014 a Cesa, *P.triticina* è stata più virulenta di *P.striiformis*. Pertanto la soglia minima di sporulazione è stata confrontata con la temperatura media che dal modello della regressione è risultata significativamente e positivamente correlata allo sviluppo della ruggine bruna. Tuttavia, questo confronto non è stato sufficiente a giustificare l'andamento epidemiologico. Per questo motivo è stato deciso di comparare la temperatura minima (positivamente correlata allo sviluppo del patogeno) con la soglia minima di germinazione pari a 2°C. Tramite questo confronto è stato possibile giustificare la maggiore virulenza della ruggine bruna poiché il superamento precoce di tale soglia è associabile a un alto indice di malattia.

Per la **septoriosi**, il modello migliore calcolato dalla regressione lineare multipla, è stato quello con parametri climatici trasposti di una decade. Ciò potrebbe compatibile con il fatto che affinché la septoriosi manifesti i primi sintomi sono necessari lunghi periodi di incubazione, per *S. tritici* 15-21 giorni a 20 ° - 24 °C; per *S. nodorum* 7-14 giorni a 22 ° - 24 °C (Eyal, 1987). Mediamente per periodi con temperature al di sotto di 20 °C il periodo d'incubazione può variare dai 14 ai 28 giorni (Fones e Gurr, 2016). La septoriosi è un complesso patologico causato da due agenti fitopatogeni, *S.tritici* e *S.nodorum*. Il primo è un fungo mesotermo, il secondo è maggiormente termofilo. Generalmente, in caso di condizioni ottimali, la manifestazione sintomatica della septoriosi se precoce è causata da *S.tritici*. La soglia termica che è stata scelta per la comparazione è la temperatura minima di germinazione di *S. tritici*, così da poter giustificare eventuali attacchi precoci, di fatto registrati nel 2013 già nella decade "20apr". La temperatura minima di

germinazione dei conidi è a 2-3 °C, ma se per 2 notti consecutive la temperatura minima non supera i 7 °C il patogeno ritarda la crescita, a 4 °C la blocca e riduce anche la germinazione conidica (Z. Eyal, 1987). Se consideriamo l'andamento della temperatura minima media delle decadi è stato osservato che raramente, tra una decade e l'altra c'è stato uno scarto rispetto alla soglia di 3 °C che abbia superato i 7 °C, pertanto è stato supposto che finché la temperatura minima non abbia superato stabilmente i 7 °C, *S. tritici* può aver cominciato a infettare ma non è al massimo della sua virulenza. La precocità degli attacchi di septoriosi a Cesa nel 2013 (sintomi già al "20apr") e la localizzazione dei sintomi registrata sempre sulle foglie, mai sulle glume può far supporre che l'andamento climatico dell'areale esaminato sia più favorevole a *S. tritici* piuttosto che a *S. nodorum* inoltre, il periodo in cui si verificano le condizioni termiche ottimali per lo sviluppo della seconda corrisponde generalmente al più siccitoso, fine maggio inizio giugno.

Secondo l'analisi del modello, anche la temperatura media gioca un ruolo fondamentale ostacolando lo sviluppo del patogeno. Negli anni in cui la temperatura media, rispettivamente di Cesa e Montepaldi, è stata mediamente più elevata l'indice di malattia è stato inferiore.

7.5. Discussione dei risultati del test del chi-quadro effettuato sui risultati delle analisi di laboratorio dei 100 campioni di cariossidi

A dare un esito significativo o altamente significativo al test del chi-quadro sono state le seguenti coppie di variabili:

1. trattamento – presenza di *Fusarium* (*)
2. trattamento – % di specie di *Fusarium* coinvolte (**)
3. presenza di *Fusarium* – micotossine (*)
4. presenza di DON – % di specie di *Fusarium* coinvolte (**)
5. specie frumento – % di specie di *Fusarium* coinvolte (**)

1. Nel primo test (Tab. 19) è stato conteggiato in quanti campioni, sia trattati che non trattati, è presente o assente *Fusarium* spp.

   Fusarium spp. è stato rilevato su 51 campioni rispetto ai 92 campioni totali esaminati; di questi, 50 non erano stati trattati mentre 42 erano stati trattati generalmente con principi attivi appartenenti alla classe dei triazoli (ciproconazolo, protioconazolo, tebuconazolo, tetraconazolo) e degli analoghi delle strobilurine (amistar e azoxystrobin). Dei 51 campioni contaminati da *Fusarium* spp. 29 hanno subito almeno un trattamento, 22 non erano stati trattati.

   La probabilità che l'effetto del trattamento abbia influenzato la proporzione delle osservazioni finali rispetto alla presenza o all'assenza di *Fusarium* spp. è significativa al 5%.

2. Per approfondire le relazioni che intercorrono tra il trattamento e la presenza di *Fusarium* spp. il test del chi-quadro è stato ripetuto associando i campioni trattati e non trattati alla la percentuale delle specie di *Fusarium* rilevate. Se per ogni campione sono stati analizzati 100 semi, la percentuale di specie di *Fusarium* rilevate indica, su 100, quanti semi e da quali patogeni sono stati colonizzati. Quindi se il numero di colonie totali osservate sono 196, significa che su 9200 cariossidi analizzate (100 semi × 92 campioni), su 196 si è riscontrata la presenza di *Fusarium* spp. Di queste 196 osservazioni, 63 appartengono ai campioni non trattati mentre 133 (più del doppio) provengono dai campioni trattati. Stando a questa proporzione (1:2) dal test del chi-quadro risulta altamente significativo (**) il ruolo positivo che la variabile "trattamento" ha sulla distribuzione di *Fusarium* spp.

   Dalla Tab. 16 è possibile osservare quali siano stati i *Fusarium* spp. maggiormente rilevati nelle cariossidi: al primo posto c'è *F. poae* (66) a seguire *F. avenaceum* (23), *F. proliferatum* (15), *F. equiseti* (12) e *F. acuminatum* (11). Inoltre, data la distribuzione di *F. poae*, *F. proliferatum, F. oxysporum* e *F. scirpi,* è altamente improbabile che l'ipotesi zero (ossia che la distribuzione sia casuale) sia vera.

3. A risultare significativo è stato anche test del chi-quadro riferito alla presenza o assenza di *Fusarium* spp. associato alla presenza o assenza di micotossine (siano esse DON, NIV, ZEA, T2 e HT2). Su 100 campioni totali, in 58 è stato rilevato *Fusarium* spp., di questi 58, ben 22 erano anche contaminati da micotossine. Pertanto è risultato significativo che dei 30 campioni contaminati da micotossine, 22 sono positivi alla presenza di *Fusarium* spp. Tuttavia, un dato poco spiegabile è che vi sono 8 campioni contaminati da micotossine in cui però non è stato rilevato nessun *Fusarium* spp.
4. L'associazione "presenza di *Fusarium* – micotossine" è stata ulteriormente approfondita, confrontando tramite il test del chi-quadro la distribuzione della percentuale di *Fusarium* spp. rilevati con la presenza o l'assenza di DON. Il deossinivalenolo è stata la micotossina maggiormente rilevata all'interno dei campioni (su 100 campioni, 24 hanno presentato DON), pertanto, è stata l'unica micotossina associabile statisticamente alle altre variabili.
   Considerando i campioni analizzati per la presenza di *Fusarium* spp., su 196 semi colonizzati da *Fusarium* spp., 81 appartengono ai campioni in cui è stato rilevato anche il DON. La distribuzione non casuale è altamente significativa (**) ciò significa che secondo il test del chi-quadro, la distribuzione delle specie di *Fusarium* è altamente associabile alla presenza di DON. Tuttavia dei 24 campioni che hanno presentato DON, 20 hanno presentato anche *Fusarium* spp. mentre 4 non sono associabili a *Fusarium* spp. Un'osservazione interessante è che tutti i semi colonizzati da *F. acuminatum* (11), provengono da campioni contaminati da DON.

5. L'ultimo test del chi-quadro effettuato ha messo in relazione la specie del frumento (dura o tenera) con la distribuzione di *Fusarium* spp. Su 189 semi colonizzati da *Fusarium* spp., 121 provengono dai campioni grano duro. Come già è emerso dall'analisi dell'incidenza degli interventi agronomichi, il grano duro è più suscettibile alla fusariosi del grano tenero e questa ipotesi è stata accettata con alta significatività (**) anche dl test del chi-quadro.
   L'unico *Fusarium* che ha dimostrato avere la tendenza opposta è stato il *F. poae.*

Dai risultati del chi-quadro è pertanto emerso che il trattamento influenza positivamente la presenza di *Fusarium* spp. e la presenza di *Fusarium* spp. è altamente associabile alla presenza di micotossine. Tuttavia su 24 campioni contaminati da DON, 4 non sono associabili, con il tipo di campionamento effettuato, alla presenza di *Fusarium* spp. Inoltre è anche emerso che il grano duro è risultato più suscettibile del grano tenero alla fusariosi della spiga. Infine, analizzando il comportamento di ogni singola specie di *Fusarium* è stato possibile osservare che:

- Tutti gli 11 semi contaminati da *F. acuminatum,* sono contaminati da DON (Tab. 17)
- *F. poae* è stato il *Fusarium* maggiormente ritrovato (66 semi contaminati su 10000 analizzati); la sua distribuzione, rispetto ai *Fusaria* isolati, ha altamente contribuito all'ipotesi della positività dell'effetto del trattamento (Tab. 16 -19), ma a differenza dell'andamento rilevato analizzando tutte le specie di *Fusaria* isolate, è stato l'unico ad aver colonizzato maggiormente le cariossidi di grano tenero (Tab. 18) e ad essere stato poco associabile alla presenza di DON (Tab. 17).

7.6. Discussione dei risultati dell'analisi univariata effettuata sui risultati delle analisi di laboratorio dei 35 campioni di cariossidi provenienti dalla varietà monitorate.

Su 35 campioni considerati, 14 sono varietà moderne e 21 sono varietà antiche. Le varietà moderne sono tutte state trattate, le varietà antiche si distinguono in 9 campioni non trattati e 12 campioni trattati. Poiché tra i campioni manca la combinazione "varietà moderne-non trattate" l'effetto del trattamento è stato dunque verificato all'interno delle varietà antiche e le varietà moderne sono state confrontate rispetto a quest'ultime.

Dai risultati dell'ANOVA (Tab. 21) emerge che il fattore "trattamento" nelle varietà antiche sembra non solo avere un effetto positivo sulla distribuzione di *Fusarium* spp.

(*), come precedentemente dimostrato anche dal test del chi-quadro, ma anche sulla distribuzione di *Alternaria* spp. (*) e sulla colonizzazione fungina totale delle cariossidi (**). Nonostante non sia stato possibile estendere l'analisi della varianza anche alle varietà moderne è stato comunque osservato che le medie delle tre variabili dipendenti considerate, relative alle sole varietà moderne trattate, sono risultate sempre maggiori rispetto alle medie calcolate per le varietà antiche non trattate (Fig. 16- 17 -18).
Per giustificare tale risultato, sono state elaborate una serie di ipotesi che aprono la strada a una nuova interpretazione della variabile "trattamento".

Normalmente i trattamenti antifungini sul frumento vengono effettuati per contrastare le ruggini, la septoriosi e la fusariosi della spiga. Il periodo più critico per la coltura di contrarre sia le ruggini che la septoriosi è alla fine della levata, fase fenologica in cui si è sviluppato l'intero apparato fogliare, in particolar modo la foglia a bandiera la cui fotosintesi è determinante per una corretta maturazione della spiga. Per la fusariosi invece il periodo di massima suscettibilità si ha all'antesi, ossia alla fioritura del frumento. Qualora si verifichino eventi piovosi in concomitanza di questa fase fenologica aumenta il rischio da parte delle giovani spighette di contrarre la fusariosi. Quindi, per quanto riguarda la fusariosi della spiga, al momento del trattamento (periodo critico) i sintomi non sono ancora visibili. L'obiettivo e la capacità del trattamento stesso (solitamente sistemico) è infatti quello di prevenire o al massimo contenere il patogeno nella fase iniziale di patogenesi. Un'ipotesi che giustifica tale risultato potrebbe essere dunque che sebbene i sintomi non siano visibili al momento del trattamento, se è stato comunque effettuato è perché si sono verificate le condizioni di rischio pertanto, la possibilità di ritrovare il patogeno a fine ciclo sono comunque elevate ammettendo che il trattamento sia stato inefficace nel contenere la malattia. Tuttavia, questa ipotesi è smentita dai dati epidemiologici.
Secondo i rilievi fitosanitari i sintomi da fusariosi della spiga compaiono solo in 8 delle 35 varietà monitorate. Secondo i risultati delle analisi di laboratorio, *Fusarium* spp è stato ritrovato in 20 dei 35 campioni di cariossidi provenienti dalle varietà monitorate.

Inoltre, di questi 20 campioni positivi al *Fusarium* spp. solo 6 coincidono con le varietà che hanno presentato i sintomi in campo. Ciò può far suppore che, escluso il margine di errore intrinseco nel campionamento sia della popolazione monitorata che delle cariossidi analizzate, la maggior parte di *Fusarium* spp. rilevato potrebbe essersi sviluppato successivamente alla raccolta. Ciò nonostante, questa ipotesi non spiega come il trattamento possa comunque aver favorito la colonizzazione delle cariossidi da parte di *Fusarium* spp. nel post-raccolta.

Per contenere lo sviluppo della fusariosi della spiga sono impiegati numerosi fungicidi appartenenti alle classi degli analoghi delle strobilurine e dei triazoli. Le strobilurine sono maggiormente efficaci nei confronti di *Microdochium* spp al contrario solo i triazoli riescono a limitare alcune specie virulente di *Fusarium* (Maumenè *et al.*, 2000). Tuttavia, da recenti report è stato dimostrato che anche i triazoli non hanno una completa efficacia sulla fusariosi della spiga e che vi sono ceppi di *F. graminearum* che si sono dimostrati resistenti al tebuconazolo negli USA (Spolti *et al.*, 2014) (e ai benzimidazoli in Cina (Chen e Zhou, 2009)). Riassumendo, qualora vengano impiegati trattamenti fungicidi solo con le strobilurine è possibile che queste agiscano maggiormente su *Microdochium* spp. favorendo quindi sia la colonizzazione da parte di *Fusarium* spp. che la contaminazione da micotossine (Champeil *et al.*, 2004). Ciò nonostante i triazoli non si sono comunque dimostrati l'alternativa adeguata al contenimento della fusariosi. Un'altra ipotesi che si aggiunge alle precedenti riguarda gli effetti collaterali dei trattamenti sulla micoflora spontanea. I principi attivi antifungini, sebbene abbiano un meccanismo di azione appositamente studiato per contenere gli agenti fitopatogeni, sono molecole che generalmente hanno un ampio spettro di azione nei confronti di molti altri microrganismi. Questo effetto collaterale, può portare a un "vuoto biologico" che viene successivamente colmato dai microrganismi resistenti o divenuti resistenti a tali principi attivi. Nel caso delle cariossidi del frumento, è noto che sulla loro epicuticola s'insediano una moltitudine variegata di microrganismi normalmente saprofiti che occupano la nicchia. Qualora questi organismi fossero inibiti dall'effetto del trattamento, è possibile che a occupare la nicchia siano anche organismi fitopatogeni

maggiormente virulenti poiché nel corso del tempo hanno sviluppato, come è stato dimostrato, resistenza ai principi attivi.

8. CONCLUSIONI

L'indagine campionaria realizzata in alcune province della Toscana su varietà antiche e moderne gestite con diversi regimi agronomici ha permesso di rilevare che le malattie maggiormente riscontrate dal 2013 al 2015 nelle aziende campionate sono state septoriosi, ruggine bruna e ruggine gialla. L'oidio non è mai stato rilevato e i sintomi della fusariosi della spiga sono stati registrati solo nel 2013 e 2015, sia con bassa frequenza che con bassa intensità.

L'indagine riguardante l'incidenza degli interventi agronomici e dei fattori genetici non ha permesso di trarre conclusioni sostenute dall'analisi statistica data l'estrema eterogeneità del campionamento.

Sono comunque emerse delle tendenze evidenti dall'osservazione complessiva dei dati e le successive elaborazioni grafiche:

- nelle coltivazioni di frumento precedute dal maggese si è riscontrata minore incidenza e frequenza di attacchi di patogeni nel loro complesso,
- le varietà seminate tra il 15 novembre e il 15 dicembre (semina media) sono state le più soggette a infezioni,
- le varietà coltivate con lavorazioni profonde sono state le più suscettibili nel 2014 sia alle ruggini che alla septoriosi, nel 2015 solo alle ruggini.

Le osservazioni rilevanti derivate dall'analisi grafica delle interazioni genetiche sembrano suggerire:

- la maggiore suscettibilità del grano duro rispetto al grano tenero alla fusariosi e alla septoriosi
- la maggiore suscettibilità delle varietà moderne rispetto alle varietà antiche sia alla ruggine gialla che alla ruggine bruna

- la maggiore suscettibilità delle varietà antiche alla septoriosi.

I fattori climatici individuati dall'analisi statistica dei dati e risultati maggiormente coinvolti con lo sviluppo epidemiologico sono:

- la temperatura minima
- la temperatura media
- i mm di pioggia

La temperatura minima è negativamente correlata a tutti gli agenti fitopatogeni considerati.

Temperature medie elevate favoriscono invece la ruggine bruna, poiché termofila, al contrario inibiscono *S. tritici*.

La pioggia è negativamente correlata alle ruggini, poiché ne impedisce la dispersione delle uredospore, al contrario è positivamente correlata alla septoriosi, in quanto gli schizzi di pioggia rappresentano il veicolo dell'infezione.

Sebbene dal monitoraggio fitosanitario effettuato dal 2013 al 2015 risulti che i sintomi della fusariosi della spiga si sono verificati solo nel 2013 e nel 2015 con basso indice di malattia su 8 varietà di frumento, dalle analisi delle cariossidi effettuate presso l'ISPA del CNR di Bari, è emerso che *Fusarium* spp. è ben più presente di quanto registrato dai rilievi sintomatologici (presenza di infezioni latenti in tutti e tre gli anni di rilievi effettuati sulla granella). Ciò significa che, aldilà dell'errore intrinseco al momento del campionamento, l'assenza dei sintomi da fusariosi della spiga non implica l'assenza di *Fusarium* spp. sulle cariossidi.

Una significativa associazione è invece stata rilevata tra la presenza di *Fusarium* spp. e la contaminazione da micotossine delle cariossidi. È dunque possibile confermare che i rilievi fitosanitari non sono uno strumento adeguato per supporre la pericolosità della contaminazione da micotossine. Emerge chiaramente inoltre l'indicazione che il fattore "trattamento" non è uno strumento adeguato per contenere la pericolosità di tale contaminazione. Dai risultati delle analisi statistiche il trattamento sembra addirittura

favorire la presenza sia di *Fusarium* spp. che di *Alternaria* spp. (altro genere tossinogenico) e in generale la colonizzazione fungina totale presente sulle cariossidi.

Altro elemento di interesse sono le prime valutazioni sulla presenza di micotossine in varietà antiche, che anche in assenza totale di trattamenti non hanno mai mostrato livelli di infezione di rilevo.

Questi dati ci consentono di valutare lo stato fitosanitario del frumento sia in campo che nel post-raccolta così da avere un quadro completo delle malattie maggiormente presenti nell'areale toscano e dei rischi che da esse ne conseguono sia in termini di sicurezza alimentare che di perdita economica. Tali osservazioni, poiché riferite a brevi serie storiche, hanno una funzione descrittiva e puntuale più che predittiva. Tuttavia, la descrizione dello stato fitosanitario del frumento coltivato negli ultimi anni in Toscana può essere uno strumento utile agli agricoltori affinché siano informati riguardo le tempistiche dei cicli biologici dei principali agenti fitopatogeni, aggiornati rispetto alle pratiche agronomiche e alle soglie termopluviometriche che influenzano l'andamento epidemiologico, consapevoli dei possibili momenti critici per la coltura e del rischio di contaminazioni da micotossine in campo e nel post-raccolta.

BIBLIOGRAFIA

Associazione grani antichi di Montespertoli, (2014). *Disciplinare di produzione del pane e della pasta dei grani antichi di Montespertoli*

Benedettelli, S., Ghiselli, L., & Martinelli, T. (2013). Pane Nuovo da Grani Antichi. *Evoluzione delle varietà di grano, della tecnica molitoria e panificatoria, a cura di Castioni, F*.

Rossi, 2007. *Il grano*

Pasquini, M., & Delogu, G. (2003). Malattie dei Cereali a paglia. Manuale per la diagnosi delle principali patologie e per il riconoscimento dei relativi agenti patogeni.

Chen, W., Wellings, C., Chen, X., Kang, Z., & Liu, T. (2014). Wheat stripe (yellow) rust caused by Puccinia striiformis f. sp. tritici. *Molecular plant pathology*, *15*(5), 433-446.

Jin, Y., Szabo, L. J., & Carson, M. (2010). Century-old mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of *Berberis* as an alternate host. *Phytopathology*, *100*(5), 432-435.

Chai, Y., Kriticos, D. J., Beddow, J. M., Duveiller, E., Cuddy, W. S., Yonow, T., & Sutherst, R. W. (2015). *Puccinia striiformis (Wheat Stripe Rust)* (No. 249753). HarvestChoice.

Bolton, M. D., Kolmer, J. A., & Garvin, D. F. (2008). Wheat leaf rust caused by Puccinia triticina. *Molecular plant pathology*, *9*(5), 563-575.

Anikster, Y., Bushnell, W. R., Roelfs, A. P., Eilam, T., & Manisterski, J. (1997). Puccinia recondita causing leaf rust on cultivated wheats, wild wheats, and rye. *Canadian journal of botany*, *75*(12), 2082-2096.

Chai, Y., Kriticos, D. J., Beddow, J. M., Ota, N., Yonow, T., & Cuddy, W. S. (2016). *Puccinia triticina (Wheat Leaf Rust)* (No. 249754). HarvestChoice.2016.

Eyal, Z. (1999). The Septoria tritici and Stagonospora nodorum blotch diseases of wheat. *European Journal of Plant Pathology*, *105*(7), 629-641.

Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, *108*(7), 611-624.

Bernhoft, A., Torp, M., Clasen, P. E., Løes, A. K., & Kristoffersen, A. B. (2012). Influence of agronomic and climatic factors on Fusarium infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *29*(7), 1129-1140.

Covarelli, L., Beccari, G., Prodi, A., Generotti, S., Etruschi, F., Juan, C., ... & Mañes, J. (2015). Fusarium species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(3), 540-551.

Kelly, A. C., Clear, R. M., O'Donnell, K., McCormick, S., Turkington, T. K., Tekauz, A., ... & Ward, T. J. (2015). Diversity of Fusarium head blight populations and trichothecene toxin types reveals regional differences in pathogen composition and temporal dynamics. *Fungal Genetics and Biology*, *82*, 22-31.

Gärtner, B. H., Munich, M., Kleijer, G., & Mascher, F. (2008). Characterisation of kernel resistance against Fusarium infection in spring wheat by baking quality and mycotoxin assessments. *European Journal of Plant Pathology*, *120*(1), 61-68.

Edwards, S. G. (2009). Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants*, *26*(4), 496-506.

Champeil, A., Doré, T., & Fourbet, J. F. (2004). Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. *Plant science*, *166*(6), 1389-1415.

Champeil, A., Fourbet, J. F., Doré, T., & Rossignol, L. (2004). Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop protection*, *23*(6), 531-537.

Dweba, C. C., Figlan, S., Shimelis, H. A., Motaung, T. E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., & Tsilo, T. J. (2017). Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, *91*, 114-122.

Santori, A., & Infantino, A. (2009). Le problematiche del "mal del piede" del frumento. *TERRA E VITA*, *10*(51), 32-33.

Krogh, P. (1989). The role of mycotoxins in disease of animals and man. *Journal of applied bacteriology*, *67*(s18).

Smith, T. K., & Seddon, I. R. (1998). Synergism demonstrated between Fusarium mycotoxins. *Feedstuffs (USA)*.

Cast, I. (2003). Mycotoxins—Risks in Plant, Animal and Human Systems. *CAST Report*, *139*, 4-29.

Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, *15*(2), 129-144.

Milićević, D., Jurić, V., Stefanović, S., Jovanović, M., & Janković, S. (2008). Survey of slaughtered pigs for occurrence of ochratoxin A and porcine nephropathy in Serbia. *International journal of molecular sciences*, *9*(11), 2169-2183.

D'Mello, J. P., Macdonald, A. M., Postel, D., & Hunter, E. A. (1997). 3-Acetyl deoxynivalenol production in a strain ofFusarium culmorum insensitive to the fungicide difenoconazole. *Mycotoxin research*, *13*(2), 73-80.

Weidenbörner, M. (2001). *Encyclopedia of food mycotoxins*. Springer Science & Business Media.

Pleština, R. (1992). Some features of Balkan endemic nephropathy. *Food and chemical toxicology*, *30*(3), 177-181.

Schwarzer, K. (2009). Harmful effects of mycotoxins on animal physiology. In *17th Annual ASAIM SEA Feed Technology and Nutrition Workshop, Hue, Vietnam* (pp. 301-308).

Rotter, B. A. (1996). Invited review: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, *48*(1), 1-34.

Desjardins, A. E., & Hohn, T. M. (1997). Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *10*(2), 147-152.

Proctor, R. H., Brown, D. W., Plattner, R. D., & Desjardins, A. E. (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in Gibberella moniliformis. *Fungal Genetics and Biology*, *38*(2), 237-249.

Kiang, D. T., Kennedy, B. J., Pathre, S. V., & Mirocha, C. J. (1978). Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer research*, *38*(11 Part 1), 3611-3615.

Price, W. D., Lovell, R. A., & McChesney, D. G. (1993). Naturally occurring toxins in feedstuffs: Center for Veterinary Medicine Perspective. *Journal of animal science*, *71*(9), 2556-2562.

Van Egmond, H. P. (2002). Worldwide regulations for mycotoxins. In *Mycotoxins and food safety* (pp. 257-269). Springer US.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, & International Program on Chemical Safety, 2001. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food* (No. 74). World Health Organization (Ed.). Food & Agriculture Org..*Food and Nutrition Paper 74, WHO, Geneve* 2001

Regolamento CE n. 1126/2007, Gazzetta Ufficiale dell'UE, 2007

Kranz, J. (1988). Measuring plant disease. In *Experimental techniques in plant disease epidemiology* (pp. 35-50). Springer Berlin Heidelberg.

Roelfs, A. P. (1989). Epidemiology of the cereal rusts in North America. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *11*(1), 86-90.

Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: an EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, *79*, 3-7.

Maumené, C., Leuillet, M., Caron, D., & Henriot, F. (2000). Incidence des fongicides et de la variété sur le risque de contamination du blé tendre par le déoxynivalénol (DON) en france: premiers résultats. In *6ème conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, France.(Association Française de Protection des Plantes, ed.)* (Vol. 1, pp. 459-466).

Spolti, P., Del Ponte, E. M., Dong, Y., Cummings, J. A., & Bergstrom, G. C. (2014). Triazole sensitivity in a contemporary population of Fusarium graminearum from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Disease*, *98*(5), 607-613.