



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
Dottorato in Biologia Evoluzionistica ed Ecologia
CICLO XXXVII

Study of the metabolic and physiological variations of plants in
response to mycotoxins treatment

Settore Scientifico Disciplinare
BIOS-01/D già SSD BIO/15 (Biologia Farmaceutica)

Dottoranda

Dott.ssa

Maria Cavallero

Supervisore

Prof.

Enrico Rolli

Coordinatore

Prof.

Duccio Cavalieri

Salvo eventuali più ampie autorizzazioni dell'autore, la tesi può essere liberamente consultata e può essere effettuato il salvataggio e la stampa di una copia per fini strettamente personali di studio, di ricerca e di insegnamento, con espresso divieto di qualunque utilizzo direttamente o indirettamente commerciale.

Ogni altro diritto sul materiale è riservato.

“*Nevermore*”

SOMMARIO

1.	INTRODUZIONE	1
1.1	<i>L'uomo e le micotossine: una vecchia storia</i>	2
1.2	<i>I funghi fitopatogeni.....</i>	4
1.2.1	<i>Caratteri generali</i>	4
1.2.2	<i>Le micotossine</i>	7
1.2.3	<i>Effetti delle principali micotossine sulle piante</i>	12
1.2.4	<i>Meccanismi di infezione fungina nelle piante</i>	14
1.3	<i>Colture agronomiche.....</i>	15
1.3.1	<i>Alternative varietali dei grani commerciali</i>	18
1.4	<i>Meccanismi di difesa delle piante in risposta all'infezione del patogeno e alle tossine.....</i>	19
1.4.1	<i>Riconoscimento</i>	22
1.4.2	<i>Meccanismi di detossificazione</i>	23
1.4.3	<i>Resistenza Sistemica Acquisita (SAR)</i>	27
1.4.4	<i>Aspetti molecolari della risposta all'infezione fungina.....</i>	28
1.5	<i>Strategie di studio in vitro della risposta delle piante all'infezione</i>	31
1.5.1	<i>Tecniche di coltura in vitro</i>	33
2.	SCOPO DEL LAVORO	35
3.	MATERIALI E METODI	38
3.1	<i>Materiale vegetale utilizzate nello studio</i>	39
3.2	<i>Terreni di crescita e condizioni di allevamento delle piante.....</i>	40
3.3	<i>Preparazione delle soluzioni di tossine.....</i>	42
3.4	<i>Sterilizzazione delle cariossidi</i>	42
3.5	<i>Esperimenti con grani di varietà pigmentate</i>	43
3.5.1	<i>Trattamento con DON su piante in vitro</i>	44
3.5.2	<i>Trattamento con DON su cellule indifferenziate (sospensioni cellulari).....</i>	44
3.6	<i>Esperimento con grani di varietà perennanti.....</i>	45
3.7	<i>Studio sulla mobilità di micotossine nei sistemi vegetali</i>	46
3.7.1	<i>Esperimento di somministrazione fogliare</i>	47
3.7.2	<i>Esperimento di somministrazione radicale, "split-root"</i>	48
3.8	<i>Esperimento per la valutazione degli essudati radicali</i>	49
3.9	<i>Valutazione della risposta metabolica di piante di mais trattate con AFB1.....</i>	50
3.9.1	<i>Analisi bidimensionale del profilo elettroforetico (2D-E).....</i>	50
3.9.2	<i>Determinazione dell'attività antiossidante di scavenging (DPPH)</i>	53
3.9.3	<i>Determinazione del contenuto di polifenoli</i>	54
3.9.4	<i>Determinazione del contenuto di flavonoidi</i>	54
3.10	<i>Valutazione della risposta in Vitis vinifera alla presenza di A. carbonarius e OTA.....</i>	55

3.10.1	<i>Esperimento su foglie intere di Vitis cv. Loureiro</i>	55
3.10.2	<i>Esperimento su sospensioni cellulari di Vitis cv. Gamay Frechau</i>	55
3.10.3	<i>Estrazione dell'RNA totale</i>	56
3.10.4	<i>Analisi dell'espressione genica mediante Real-Time PCR</i>	57
3.11	<i>Analisi</i>	58
3.12	<i>Analisi statistica</i>	58
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	60
4.1	<i>Esperimento con grani pigmentati</i>	61
4.2	<i>Esperimento con grani perennanti</i>	65
4.3	<i>Esperimento di somministrazione fogliare di micotossine</i>	67
4.4	<i>Somministrazione radicale, "split-root"</i>	69
4.5	<i>Analisi degli essudati radicali</i>	72
4.6	<i>Valutazione della risposta metabolica di piante di mais trattate con AFB₁</i>	76
4.6.1	<i>Analisi proteomica tramite 2-DE</i>	77
4.6.2	<i>Determinazione del profilo antiossidante e fenolico di foglie e radici</i>	79
4.7	<i>Analisi molecolari della risposta all'infezione fungina</i>	81
4	CONCLUSIONI	85
5	BIBLIOGRAFIA	88

1. INTRODUZIONE

1.1 L'uomo e le micotossine: una vecchia storia

La connessione tra esseri umani e piante risale a circa 23.000 anni fa, nel momento in cui si passò dalla strategia passiva di raccolta ad una strategia attiva di coltivazione. È ipotizzabile che lo stoccaggio di cereali abbia dato inizio alla transizione dell'umanità da "cacciatore-raccoglitore" a "coltivatore", ma allo stesso tempo abbia fornito una nuova e più vasta nicchia ecologica per i funghi eterotrofi e saprofiti che, come oggi è noto, sono in grado di produrre tossine estremamente pericolose: le micotossine (Pitt et al., 2017).

Si pensa che patologie legate all'assunzione di micotossine siano state descritte fin dall'Antico Testamento, essendo stato addirittura ipotizzato che questo fenomeno fosse alla base di una delle Piaghe d'Egitto. Sembra infatti che l'assunzione da parte dei primogeniti di maggiori quantità di pane, proprio in quanto figli maggiori, li abbia esposti maggiormente a *Stachybotrys chartarum*, un fungo fitopatogeno altamente tossico tuttora assai diffuso come contaminante naturale negli agroecosistemi (Schoental, 1984). Durante la storia, coltivazioni di grani come farro, grano, orzo e avena si sono spostati dalle regioni comprese tra il Tigri e L'Eufrate e dal delta del Nilo via via sempre più verso l'Europa dove hanno trovato un clima più mite, con estati più corte, fresche e piovose (Fuller et.al., 2012).

Nell'antica Roma, autori come Pollio, Varrone (I secolo a.C.) e Columella (I secolo d.C.) scrissero dell'importanza di come dovevano essere edificati e ubicati i granai: questi erano costruiti ben rialzati dal suolo e con aperture che permettessero la circolazione dei venti che venivano da est e da nord; un'altra possibilità era che dovessero essere costruiti ben calati nel terreno, come fossero a tenuta stagna. Queste pratiche permettevano uno stoccaggio più sicuro dei grani, al riparo dal deterioramento e dal marciume causato dall'eccessiva umidità (Levinson, et al., 1998). Durante il Basso Medioevo la coltura dominante nel centro e nord Europa è stata la segale per la sua ricchezza di fibre e la sua facilità di coltivazione nelle zone con climi severi. Inoltre, questo cereale era impiegato anche come materiale per la costruzione di tetti per la sua resistenza e capacità di isolante termico (Filatova et al., 2021).

La coltivazione della segale, tuttavia, non ha portato solo sviluppo e benessere; infatti, la sua coltivazione è da tempo legata all'infezione delle colture da parte di *Claviceps purpurea*, un ascomicete parassita delle graminacee. Durante la macinazione, gli sclerozi, strutture in grado di sopravvivere per lunghi periodi come entità autonome separate dall'organismo che li ha originati, sono ancorati sulla segale e non vengono facilmente separati dalle granelle, finendo così macinati

anch'essi all'interno della farina, ormai infetta. Una volta consumato il prodotto da forno, a causa di particolari alcaloidi, provoca vasocostrizione delle zone periferiche del corpo fino ad arrivare alla gangrena; può inoltre provocare quello definito come "ergotismo neurologico" caratterizzato da convulsioni, spasmi ed allucinazioni: la sintomatologia legata all'assunzione di questo fungo è nota soprattutto per i casi avvenuti nel Medioevo in Francia, Germania, Gran Bretagna e Russia a cui seguirono famose storie e racconti di streghe per provare a spiegare questi sintomi.

Fu nel 1853 che Luis Tulasne, biologo francese, riesce a descrivere il ciclo riproduttivo del fungo, ma solo nel 1943 Albert Hofmann, un chimico svizzero, descrive gli effetti psicoattivi degli alcaloidi presenti nel fungo.

Tra il 1700 ed il 1800 la coltivazione di grano ha preso sempre più importanza rispetto alla segale in tutta Europa portando ad un decremento dei decessi. Mattosian (1981) dimostrò proprio un calo della mortalità in Inghilterra coincidente con il passaggio dall'assunzione di segale a quella di grano.

Tuttavia, anche il grano è uno degli ospiti preferiti di questi funghi patogeni. Esso, infatti, è attaccato facilmente dal genere *Fusarium* (Alisaac e Mahlein, 2023). Questi funghi patogeni dopo avere infettato la spiga liberano una serie di micotossine altamente dannose che portano a sintomi come nausea, vomito, dolori addominali e febbre.

Anche diverse zone del Giappone sono state colpite nel XIX secolo dalla Beriberi cardiaca, causata dal *Penicillium* del riso che causa "paralisi da infarto".

Un esempio più recente ci arriva dall'Africa centrale: fino alla prima metà del 1900 la popolazione si nutriva maggiormente di manioca, miglio e sorgo, ospiti non preferiti del genere *Aspergillus* e quindi meno intaccata della relativa tossina l'aflatossina: una micotossina altamente cancerogena e tossica che rappresenta un grave rischio per la salute umana e animale; con l'aumento della coltivazione del mais, uno dei cereali maggiormente interessati dall'infezione, aumenta anche l'esposizione a questa pericolosa tossina ed al conseguente aumento della mortalità (Wild et al., 2015).

1.2 I funghi fitopatogeni

1.2.1 Caratteri generali

Il regno dei funghi è costituito da organismi cosmopoliti ed ubiquitari (Naranjo-Ortiz e Gabaldón, 2019); ad esso appartengono oltre 5000 generi, nei quali riconosciamo sia specie comunemente utilizzate per l'alimentazione (Basidiomiceti) sia specie microscopiche (ad esempio alcuni Ascomiceti) che infettano derrate agricole ed alimenti sia in campo, che in stoccaggio. Questi organismi eucarioti sono organizzati in strutture complesse (micelio) formati da cellule allungate (ife) e, a seconda del loro rapporto trofico con l'ambiente, vengono definiti saprofiti (se si nutrono di necromassa), endofiti o parassiti. È noto che i funghi sono fondamentali per mantenere l'equilibrio ecologico naturale; essi, infatti, degradano la materia organica morta ridistribuendo le sostanze nel terreno, i funghi micorrizici oltre ad aiutare la pianta ad assorbire sali minerali e acqua, mettono in collegamento gli apparati radicali di diverse piante, facilitando le comunicazioni tra esse. Anche gli esseri umani hanno imparato a sfruttare questi organismi: se da un lato sono un alimento, dall'altro possono fornire un'importante risorsa per il loro contenuto di particolari principi attivi, dai quali siamo ancora dipendenti. Uno su tutti, ad esempio, la penicillina, estratta da funghi del genere *Penicillium*, è uno degli antibiotici più importanti e diffusi, utilizzato per contrastare infezioni batteriche. Un altro esempio è rappresentato dalla psilocibina, un composto psicoattivo presente in funghi del genere *Psilocybe*, studiato oggi per il trattamento della depressione e dei disturbi post-traumatici. Sono altrettanto noti i loro effetti dannosi: è stato stimato che la contaminazione delle colture o dei prodotti agricoli da parte funghi fitopatogeni determini ogni anno una perdita compresa tra il 10% ed il 23% dei raccolti per coltivatore (Stukenbrock et al., 2023). Questa perdita è determinata non solo dalla riduzione delle rese a causa di fitopatie, ma anche dalla presenza di metaboliti fungini tossici, noti come micotossine, rilasciati da alcune specie nella matrice contaminata. Un numero consistente di questi metaboliti ha effetti particolarmente tossici sugli animali, uomo compreso, e per questa ragione la concentrazione tollerata nelle derrate e negli alimenti è stata oggetto negli anni di una regolamentazione costantemente aggiornata dagli enti legislatori di diversi Paesi. Si stima che, nei soli Stati Uniti, l'industria del mais perda ogni anno tra i 52,1 milioni a 1,68 miliardi di dollari a causa della contaminazione da aflatossine (Mitchell et al., 2016). Oltre a questo aspetto è doveroso ricordare anche la pericolosità legata all'assunzione di alcune specie. Le azioni tossiche delle micotossine sono diverse e sono responsabili di un grande ventaglio di

malattie e intossicazioni alimentari. A causa delle problematiche che seguono l'esposizione a micotossine il Regolamento (CE) n. 1831/2003 stabilisce i limiti massimi di contaminanti negli alimenti, incluse le micotossine, sono stati aggiornati più volte per includere nuove sostanze o modificare i limiti esistenti (Tabella 1 e 2):

Tabella 1 Limiti massimi di contaminanti negli alimenti secondo il Regolamento (CE) n. 1831/2003, COCERAL Mycotoxins Survey Synthesis Report 2023

Micotossina	Alimenti	Livello regolamentato
Aflatossina B₁	cereali	2.0 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
	Mais e riso	5.0 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
Aflatossina (Somma di B₁, B₂, G₁, and G₂)	cereali	4.0 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
	Mais e riso	10.0 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
Ocratossina A	Cereali non trasformati	5.0 (Massimo livello in µg/kg (ppb)) ³
	Prodotti derivati da cereali non trasformati immessi sul mercato per il consumatore finale.	3.0 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
	Semi di girasole, semi di canapa, soia	5.0 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
Deossinivalenolo	Cereali non trasformati (eccetto riso)	1000 (Massimo livello in µg/kg (ppb)) ⁵
	Grani di grano duro non trasformati	1500 (Massimo livello in µg/kg (ppb)) ⁸
	Chicchi d'avena non lavorati con buccia	1750 (Massimo livello in µg/kg (ppb)) ⁹
	Cereali immessi sul mercato per il consumatore finale (tranne il riso e i prodotti a base di riso)	750 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
	Grani di mais non trasformati	1500 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
Zearalenone	Cereali non trasformati	100 (Massimo livello in µg/kg (ppb)) ¹²
	Cereali immessi sul mercato per consumatore finale	75 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
	Grani di mais non trasformati	350 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
	Il mais immesso sul mercato per il consumatore finale	100 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
Fumonisine	Grani di mais non trasformati	4000 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
	Il mais immesso sul mercato per il consumatore finale	100 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
Ergotina	Cereali non trasformati	0.2 (Massimo livello in g/kg)
	Grani di segale non lavorati	0.5 (0.2 dal 1° luglio 2025)

T-2, HT-2	Grani d'orzo da malto non trasformati	200 (Massimo livello in µg/kg (ppb))
	Grani d'orzo non trasformati, diversi di orzo da malto	150 (Massimo livello in µg/kg (ppb))

Tabella 2 Valori massimo di micotossine in varie matrici vegetali ad uso zootecnico secondo il Regolamento (CE) n. 1881/2006

Micotossina	Mangimi	Livello regolamentato
Aflatossina B₁	Cereali	0.02 (Valore indicativo in mg/kg (ppm) rispetto ad a mangimi con contenuto di umidità del 12%)
Ocratossina A	Cereali e prodotti cerealicoli	0.25 (Valore indicativo in mg/kg (ppm) rispetto ad a mangimi con contenuto di umidità del 12%)
Deossinivalenolo	Cereali e prodotti cerealicoli	8 (Valore indicativo in mg/kg (ppm) rispetto ad a mangimi con contenuto di umidità del 12%)
	Sottoprodotti del mais	12 (Valore indicativo in mg/kg (ppm) rispetto ad a mangimi con contenuto di umidità del 12%)
Zearalenone	Cereali e prodotti cerealicoli	2 (Valore indicativo in mg/kg (ppm) rispetto ad a mangimi con contenuto di umidità del 12%)
	Sottoprodotti del mais	3 (Valore indicativo in mg/kg (ppm) rispetto ad a mangimi con contenuto di umidità del 12%)
Fumonisine	Mais e sottoprodotti del mais	60 (Valore indicativo in mg/kg (ppm) rispetto ad a mangimi con contenuto di umidità del 12%)
Ergotina	Foraggio e foraggio composto contenente cereali non macinati	1000 (Valore indicativo in mg/kg (ppm) rispetto ad a mangimi con contenuto di umidità del 12%)
T-2, HT-2	Prodotti cerealicoli	500 (Valore indicativo in mg/kg (ppm) rispetto ad a mangimi con contenuto di umidità del 12%)

1.2.2 Le micotossine

Esistono oltre 300 tipi di tossine fungine (Juraschek et al, 2021). In base ai loro effetti sulla salute umana e animale, alla loro produzione da parte di funghi patogeni di colture alimentari di base, aflatossina (AFB), deossinivelenolo (DON), ocratossina A (OTA) e zearelenone (ZON) sono considerate le cinque più importanti micotossine agricole (Shephard, 2008). I funghi maggiormente responsabili della produzione di queste tossine sono *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Secondo l'ultimo report (Figura 1) di DMS-firmenich (2023), possiamo osservare la percentuale di rischio di esposizione ad una contaminazione micotossine. Dal report si evince che il rischio nel sud Europa si aggira intorno al 66%. Si è trovata una prevalenza di fumonisine, zearalenone, deossinivalenolo e aflatossine nei campioni analizzati. Per quanto riguarda l'Europa centrale e nord Europa questo rischio è leggermente inferiore ma supera comunque il 43%, con la predominanza di deossinivalenolo e zearalenone. Da notare la quasi assenza di aflatossine, per le quali il rischio di esposizione è correlato a diversi fattori ambientali che caratterizzano la zona.

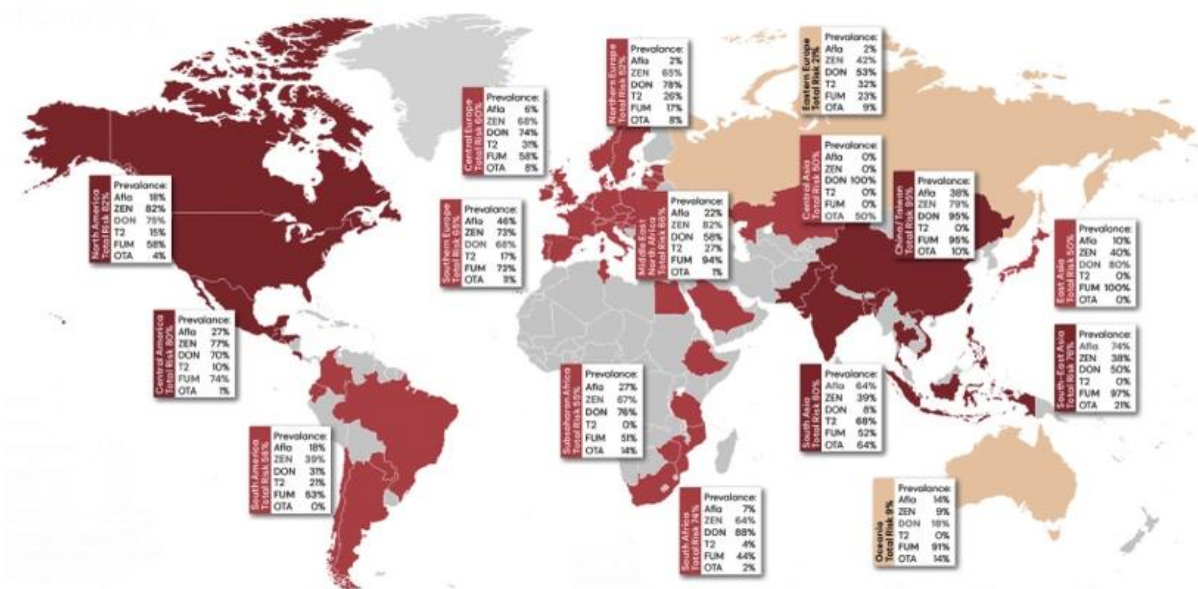


Figura 1 Percentuale di rischio di esposizione a contaminazioni di micotossine secondo il report di dsm-firmenich (2023)

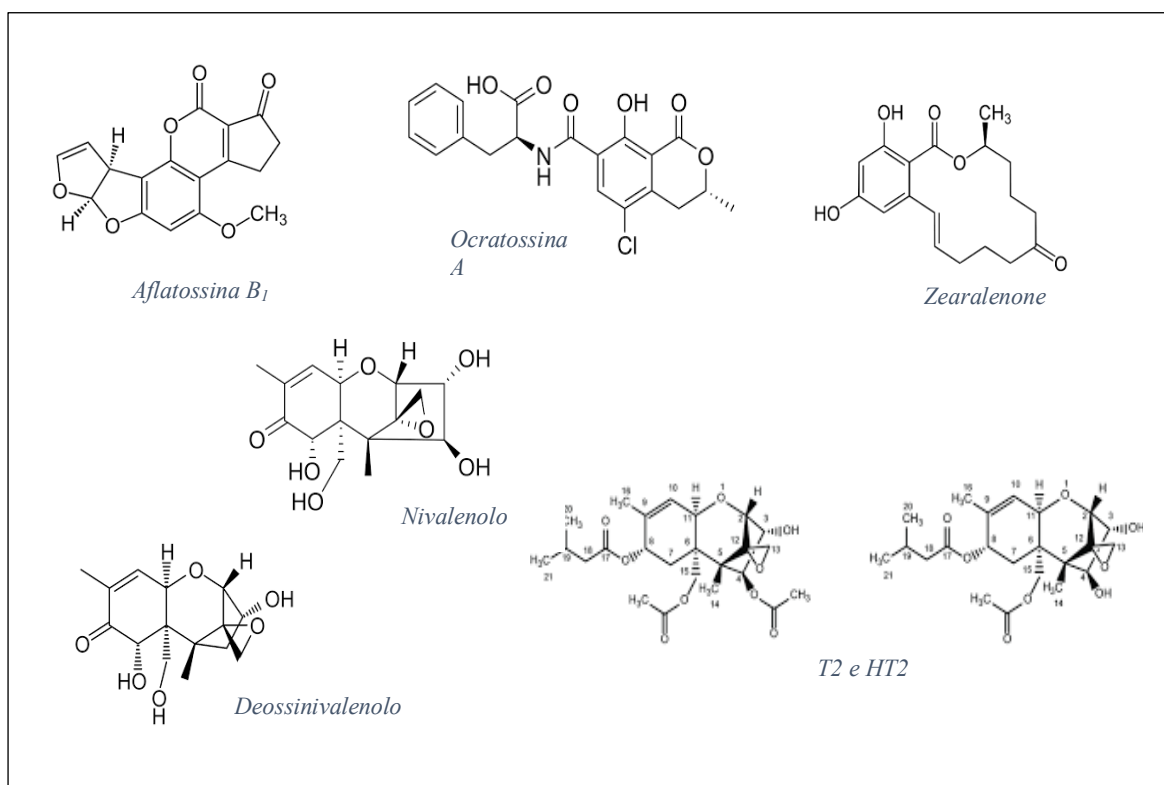


Figura 2 Micotossine più diffuse

La presenza di queste micotossine dipende dall'interazione di alcuni fattori (Tabella 3): il tipo di substrato, il livello di umidità, la nutrizione disponibile, la temperatura, l'umidità nell'ambiente circostante, la maturità della colonia fungina, la competizione con altri funghi, e la competizione di altri microrganismi (Coulombe, 1993; Viquez et al., 1994).

Tabella 3 Condizioni ambientali ottimali per la germinazione, la crescita e la produzione di Aflatossina

	Autori	T° optimal	aw
Fungal growth	O'Brian, 2007	37 °C	
	Abdel-Hadi, 2011	30-35°C	0,99
	Donato, 2022	25 - 30°C	0,99 - 0,96
	Natarajan, 2022	37°C	0,99 - 0,96
	Liu, 2017	37 °C	0,98
	Gallo, 2025	28 °C	0,96 - 0,99
	Al-Zaban, 2023	28 - 37 °C	0,92 - 0,96
Aflatoxin production	O'Brian, 2007	28 °C	
	Abdel-Hadi, 2011	25-30 °C	0,99
	Donato, 2022	25°C	0,99
	Natarajan, 2022	28 °C	0,96
	Liu, 2017	28°C	0,96
	Gallo, 2025	28 °C	0,96
	Al-Zaban, 2023	33 °C	0,96

Dal momento che la temperatura e l'umidità rappresentano fattori chiave per la crescita e la proliferazione fungina, diventa cruciale valutare come un cambiamento climatico, in particolare l'incremento delle temperature previsto nei prossimi anni, possa influenzare negativamente la sicurezza alimentare, favorendo condizioni ambientali più adatte alla diffusione e persistenza. È noto che il riscaldamento climatico avrà un forte impatto negativo sulla sicurezza alimentare soprattutto nelle zone in via di sviluppo (Janni et al., 2024).

L'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) si propone di monitorare attivamente le tendenze nella produzione agricola e i fattori che la influenzano, con il fine di aumentare la produzione agricola, migliorare la vita delle popolazioni rurali e contribuire alla crescita economica mondiale nel territorio. Si può fare tutto questo anche attraverso diversi progetti come l'EMPRES (Emergency Prevention System) che si propone di monitorare e controllare malattie zootecniche di alto impatto ed effettuando ricerche sui nuovi patogeni emergenti, e il GIEWS (Global Information and Early Warning System on Food and Agriculture) che monitora costantemente domanda e offerta alimentare e diversi indicatori per valutare il livello di sicurezza alimentare in tutte le zone mondiali.

Da questi report emerge che il raccolto in Unione Europea compreso della porzione invernale e la più ridotta porzione primaverile, sarà di circa 128 milioni di tonnellate, questo significa che ci sarà il 5% in meno di raccolto rispetto alla media dei tre anni precedenti.

Tale decremento è dovuto principalmente ad un'importante riduzione della semina invernale causata da eccessive piogge durante il periodo di semina del 2023, inoltre la resa è stata inferiore a causa di periodi di siccità nelle aree meridionali ed eccessivi periodi di umidità nelle regioni settentrionali, in particolare in Italia, il che ha contribuito ulteriormente alla riduzione delle previsioni di produzione per il 2024.

Fino al 2004, in Europa si riteneva che il rischio di contaminazione da aflatossine fosse principalmente associato a prodotti importati, in particolare dalle aree tropicali e subtropicali, poiché queste regioni sono note per essere maggiormente soggette a focolai critici di *Aspergillus*. L'Europa rappresenta un ottimo spot di monitoraggio per quanto riguarda la diffusione di specie patogene: infatti, climaticamente, sono rappresentate zone differenti tra loro, separate da distanze relativamente limitate. Da una profonda ed importante indagine dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) è risultato che a causa del clima subtropicale che sta interessando l'Europa meridionale negli ultimi anni, sta emergendo una contaminazione critica di Aflatossina in mais, mandorle e pistacchi. Come riportato da Battilani (2016) a causa di diverse stagioni calde e

secche negli ultimi 15 anni, sono stati riscontrati casi gravi di infezioni di *A. flavus* in mais in zone europee come Italia, Romania, Spagna e Serbia. È altresì interessante anche il caso di come il cambiamento climatico abbia modificato la diffusione del genere *Fusarium*.

La fusariosi produce una dimensione più contenuta delle spighe ed una conseguente diminuzione drastica della resa, inoltre provoca la contaminazione con micotossine dannose (Walter et al., 2009). L'aumento della temperatura è un fattore chiave che può intensificare la virulenza e la distribuzione geografica di specifici funghi fitopatogeni. Un incremento termico, infatti, favorisce il processo di evapotraspirazione, aumentando i livelli di umidità ambientale: condizione ideale per la proliferazione di questi organismi. Il cambiamento climatico potrebbe, dunque, estendere le aree geografiche vulnerabili alle infezioni fungine, facilitando lo sviluppo e la diffusione di malattie fungine nelle colture agricole.

In Europa centrale e meridionale, storicamente, il principale produttore di DON è *F. graminearum* mentre nelle aree nordiche tra Scandinavia e Finlandia, uno dei principali patogeni è *F. culmorum*. Negli ultimi dieci anni, tuttavia, è stato segnalato un aumento nelle zone centrali e settentrionali d'Europa da parte di *F. graminearum*. Questo stesso pattern è possibile trovarlo in Gran Bretagna, Germania, nei Paesi Bassi e Polonia, nei quali fino a qualche decennio fa la specie dominante era *F. culmorum* più abituato a climi temperati e freddi (Parikka et al., 2012).

Ciò che sappiamo degli effetti delle micotossine sulle piante è relativamente carente: questo perché gli studi si sono da sempre maggiormente concentrati agli effetti causati dal binomio fungo patogeno-micotossina con particolare attenzione alle piante utilizzate per l'alimentazione del bestiame. Questi studi hanno privilegiato l'analisi dei danni causati ai mammiferi, sia animali che umani, in caso di ingestione.

Emblematico è il fatto che la prima pubblicazione scientifica riguardante le micotossine è del 1961 (Sargent et al., 1961): il caso, comunemente noto come Turkey-X-disease, avvenne nel 1960 in Gran Bretagna, e causò la morte di circa 100.000 tacchini ed anatroccoli a causa della presenza nel mangime di arachidi importate dal Brasile e contaminate da una tossina prodotta dal fungo *A. flavus* (A=Aspergillus, FLA= flavus, TOSSINA: *aflatossina*).

Per poter comprendere al meglio la tossicità che le micotossine esercitano sulle piante e le strategie che queste ultime mettono in atto per contrastare tale effetto è bene suddividerle e catalogarle. In passato si era soliti suddividere i funghi patogeni tra quelli da "campo" come, per esempio, quelli

dei generi *Cladosporium*, *Fusarium* e *Alternaria* e *Botrytis*, cioè quelli che riescono a raggiungere il seme o la pianta durante le fasi di crescita, e quelli di “stoccaggio” come quelli dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* che tendono a svilupparsi maggiormente durante lo stoccaggio e la conservazione della granella. Una classificazione abbastanza approssimativa in cui bisogna tenere conto che per entrambi i casi, comunque, la fonte dell’infezione rimane il campo.

Essendo una realtà estremamente complessa è possibile ordinare il rapporto tra le micotossine ed i loro produttori sotto diverse chiavi di lettura:

Tabella 4 Produttori fungini delle principali micotossine (Miller, 1995; Marin, 2013)

<i>Aspergillus spp.</i>	Aflatossine (B1, B2, G1, G2): Prodotte principalmente da <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> . Ochratossina A (OTA): Prodotta da <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>
<i>Fusarium spp.</i>	Tricoteceni (Deossinivalenolo, T-2 tossina, Nivalenolo): Prodotti da <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> e <i>Fusarium sporotrichioides</i> . Zearalenone (ZEN): Prodotto da <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Fusarium culmorum</i> . Fumonisine (B1, B2): Prodotte da <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Fusarium proliferatum</i>
<i>Penicillium spp.</i>	Ochratossina A (OTA): Anche prodotta da specie di <i>Penicillium</i> come <i>Penicillium verrucosum</i> . Patulina: Prodotta da <i>Penicillium expansum</i> . Citrinina: Prodotta da <i>Penicillium citrinum</i> e <i>Penicillium verrucosum</i>
<i>Alternaria spp.</i>	Alternariol (AOH) e Alternariol monometil etere (AME): Prodotti da <i>Alternaria alternata</i> . Acido tenuazonico: Prodotto da <i>Alternaria tenuis</i>
<i>Claviceps spp.</i>	Alcaloidi dell'ergot (Ergotamina, Ergosina): Prodotti da <i>Claviceps purpurea</i> .
<i>Stachybotrys spp.</i>	Tricoteceni macrociclici: Prodotti da <i>Stachybotrys chartarum</i> .
<i>Byssosclamyces spp.</i>	Patulina: Anche associata a <i>Byssosclamyces nivea</i> , un fungo che contamina frutti e succhi, simile a <i>Penicillium expansum</i>

Tabella 5 Classificazione delle tossine in base alla struttura chimica (Richard, 2003, Bennett, 2003)

Cumarine e Derivati	Aflatossine: Le aflatossine, tra cui Aflatossina B1, B2, G1 e G2, sono difuranocumarine prodotte principalmente dai funghi del genere <i>Aspergillus</i> (<i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>).
Lattone	Zearalenone: È un lattone macrociclico resorcilico prodotto da funghi del genere <i>Fusarium</i> (<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>).
Polichetoni	Patulina: Prodotta da <i>Penicillium expansum</i> e <i>Byssosclamyces nivea</i> , la patulina è un policheto tossico che contamina frutta, in particolare le mele. Fumonisine: Le fumonisine, tra cui la Fumonisina B1 e B2, sono polichetoni prodotti da <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>F. proliferatum</i> .
Isocumarine	Ochratossina A (OTA): È un derivato dell'isocumarina prodotto da funghi dei generi <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .

Tricoteceni	Tricoteceni Tipo A (T-2 tossina, HT-2 tossina): Sono composti sesquiterpenici prodotti principalmente da <i>Fusarium sporotrichioides</i> e <i>Fusarium poae</i> . Tricoteceni Tipo B (Deossinivalenolo, Nivalenolo): Prodotti da <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Fusarium culmorum</i> . Il Deossinivalenolo (DON) è anche noto come "vomitossina" per la sua capacità di indurre il vomito.
Aminoacidi e Derivati	Citrinina: È un derivato della metilfenilpiridina, prodotto da <i>Penicillium citrinum</i> e <i>Monascus ruber</i> . È noto per la sua nefrotossicità. Acido Penicillico: Derivato dall'acido aspartico, prodotto da <i>Penicillium chrysogenum</i> , con attività antibiotica ma anche tossicità per reni e fegato.
Alcaloidi	Alcaloidi dell'ergot (Ergotamina, Ergocristina): questi alcaloidi indolici hanno effetti vasocostrittori e neurotossici.
Piperazina	Fumitremorgine: È una tossina neurotossica prodotta da <i>Aspergillus fumigatus</i> . È classificata come alcaloide della piperazina, nota per indurre tremori.

1.2.3 Effetti delle principali micotossine sulle piante

Mentre gli effetti delle micotossine sull'uomo e animali, a causa del loro impatto sulla salute sono molto indagati, meno investigati sono invece le interazioni con la biologia delle piante contaminate.

Aflatossine

Esistono più di 18 diversi tipi di aflatossine, i cui rappresentanti principali sono ad esempio prodotti dalle specie *A. flavus* e *A. parasiticus*; AFB₁ (Figura 2) è la forma più tossica e mutagenica (Richard et al., 2003). Questa molecola è in grado di inibire la germinazione dei semi, di ridurre la crescita e la produzione di biomassa di diverse specie vegetali, tra cui diverse varietà di grano (Sinha et al., 1993), mais (Chatterjee et al., 1988), senape (Ahmad et al., 2002), fagiolo (Avilala et al., 2011) e verdure a foglia verde (Hariprasad et al., 2013). Determina inoltre un notevole effetto di inibizione sulla sintesi di clorofilla e carotenoidi in diverse specie, tra cui mais (Abdelaziz et al., 2022), cetriolo e agrumi portando a virescenza ed albinismo (Navya et al., 2020).

Da uno studio (McLean et al., 1995) è emerso che AFB₁ ha un effetto fitotossico su piante rigenerate di *Nicotiana tabacum*; nello specifico, somministrando alle piante 0.5µg/mL di AFB₁, si è osservata una inibizione dello sviluppo dell'apparato radicale e fogliare. È riportato inoltre che AFB₁ è in grado di legarsi al DNA di piante di *Zea mays*, e che in semi trattati con questa tossina presentino una diminuzione della sintesi di DNA, RNA e proteine, nonché un'inibizione di

DNA-polimerasi (McLean et al., 1992). Ad un livello ultrastrutturale è stato dimostrato, che dosi elevate (reticolo endoplasmatico) e tonoplasto (McLean et al., 1992).

Ocratossina A

Questa tossina (Figura 2) è in grado di determinare un danno alle strutture ultracellulari e diminuire drasticamente la germinabilità con un'azione dose-dipendente in semi di grano (El-Taher et al., 2012). Può inoltre inibire la crescita in *Arabidopsis thaliana* sia delle porzioni aeree che ipogee portando a piante meno sviluppate e vigorose ed il suo accumulo all'interno delle piante porta ad un aumento dello stress ossidativo accompagnato ad un danno delle membrane (Peng et al., 2010). Tale molecola è anche responsabile di alterazioni dell'apparato fotosintetico di *A. thaliana*, con conseguente riduzione sulla capacità fotosintetica (Wang et al., 2012).

Zearalenone (ZEN)

Si tratta di una micotossina (Figura 2) prodotta dal genere *Fusarium*. Da uno studio condotto su cece (*Cicer arietinum*) e senape (*Brassica juncea*) è stato dimostrato che zearalenone ha un effetto parzialmente inibitorio sia sulla germinazione che sulla crescita e lo sviluppo di foglie e radici.

È stata evidenziata inoltre anche una clorosi fogliare, il che può indicare l'effetto (500 µg/L) della tossina su clorofille e carotenoidi. Tutti gli effetti descritti, compresa la morte, sia dei semi che delle piantine, segue un andamento dose-dipendente (Kumar et al., 1995).

Da studi recenti è emerso che questa tossina possa avere un comportamento ormono-simile; infatti, se somministrata a basse concentrazioni, può stimolare lo sviluppo della pianta, mentre a dosi elevate porta ad una riduzione della crescita dei vegetali (Filek et al., 2019).

Nivalenolo (NIV) e Deossinivalenolo (DON)

Entrambe queste tossine (Figura 2) sono prodotte da alcune specie del genere *Fusarium*. Anche in questo caso sono stati riportati sintomi di clorosi, necrosi e riduzione del contenuto di clorofille "a" e "b" e di carotenoidi totali in *Hordeum vulgare* contaminate con queste tossine (Bushnell et al., 2010). Sono in grado, inoltre, di inibire la germinazione di *Orobancha ramosa* (Zonno et al.,

2022), inoltre è stato riportato un effetto negativo sulla crescita di germogli di *A. thaliana* ed una conseguente morfologia aberrante (Masuda et al., 2007). Sono inoltre in grado di inibire la sintesi proteica causando una riduzione della crescita delle radici e delle foglie in grano. A livello biochimico, è stato riportato un aumento dello stress ossidativo cellulare, con conseguente produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS); tali alterazioni si traducono in perossidazioni lipidiche a carico delle membrane con conseguenti danni strutturali che possono portare alla morte della cellula (Desmond et al., 2008).

T-2 e HT-2

Anche per le tossine T2 e HT2 (Figura 2) sono riportati fenomeni di inibizione di sintesi proteica con conseguente riduzione della proliferazione cellulare nelle piante (Nathanail et al., 2015). Già a basse concentrazioni queste tossine inibiscono in *A. thaliana* la germinazione e lo sviluppo dei germogli e delle radici causando nanismo e una morfologia aberrante (Masuda et al., 2007).

Secondo quanto riportato da Ismaiel (2015), la tossina T2, alla concentrazione di 1 µg/mL, ha significativamente ridotto la crescita delle radici e dei germogli delle piantine di grano in fase di germinazione. Inoltre, evidenzia che raddoppiando la dose di T2, da 3,3 a 6,7 µg/mL, in esperimenti condotti su *Lemna minor*, si è osservata una riduzione del tasso di crescita delle foglie e il contenuto di clorofilla è diminuito rispettivamente di 10 e 2,5 volte.

1.2.4 Meccanismi di infezione fungina nelle piante

Per colonizzare le piante ospiti, i funghi fitopatogeni hanno evoluto diverse strategie di ingresso, diffusione e sviluppo all'interno dei tessuti vegetali.

Analogamente a batteri e virus, alcuni funghi parassiti ed opportunistici possono colonizzare l'ospite attraverso meccanismi passivi, sfruttando lesioni preesistenti o aperture naturali. Durante l'esposizione della superficie fogliare, le ife fungine tentano di penetrare all'interno della foglia attraverso gli stomi. Questo processo, che avviene nell'arco di 1-13 giorni, si verifica in assenza di strutture specializzate per l'adesione e/o per la penetrazione (Hauelsen, 2018; Fantozzi et al., 2023; Battache,

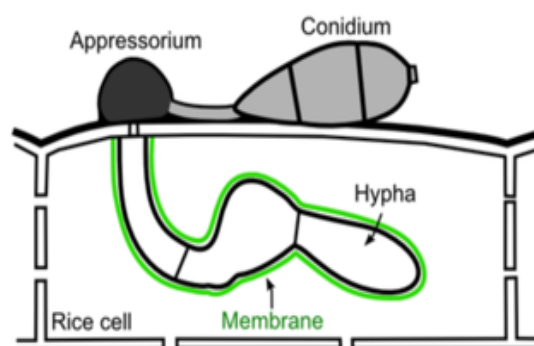


Figura 3 Strategia di ingresso di un patogeno fungino in una cellula vegetale (Khang et al, 2010)

2024). Contrariamente, la capacità penetrazione da parte di altri patogeni obbligatoriamente biotrofi, come la ruggine (*Puccinia* spp.) e lo oidio (causata da funghi della famiglia delle Erysiphaceae), dipendono dall'integrità dei tessuti tegumentali (Lee, 2020). Questi ultimi sono in grado di formare dei tubi germinali sulla cuticola delle foglie che daranno origine a cellule infettive dette appressori (Zeilinger, 2016) (Figura 3). Queste strutture si ancorano saldamente alla superficie permettendo al patogeno di fare breccia all'interno della parete cellulare combinando sia forza meccanica sia attraverso la secrezione di enzimi in grado di degradarla, come cutinasi, pectinasi e proteasi (Horbach, 2010). L'azione di questi enzimi è finalizzata alla degradazione, anche solo parziale, dei legami intramolecolari delle macromolecole di parete delle cellule epidermiche (Perincherry et al., 2020). Oltre ad enzimi litici, alcune specie, accumulano anche molecole effettrici nelle cellule dell'ospite per evitare l'attivazione di risposte di difesa (Stergiopoulos and de Wit, 2009; Horbach, 2010). Un'altra risorsa che i patogeni possono adottare è la diffusione all'interno dell'ospite di metaboliti di varia natura, quali ad esempio molecole con funzione ormonale (Chanclud et al., 2016; Biesaga-Koscielniak et al., 2020). Fitormoni come auxine, citochinine (CK), acidi gibberellici (GA), etilene (ET), acido abscissico (ABA), acido jasmonico (JA) e acido salicilico (SA), sono ben noti per controllare lo sviluppo delle piante e per innescare importanti eventi di segnalazione (Davies, 2010). Sebbene queste molecole siano prodotte anche da diverse specie fungine il loro ruolo nell'interazione fungo-pianta non è ancora stato del tutto chiarito (Chanclud et al., 2016, Leontovyčová et al., 2020, Anand et al., 2020, Chen et al., 2023).

1.3 Colture agronomiche

Il contatto tra esseri umani e agricoltura ha radici estremamente antiche e da sempre l'Uomo ha cercato di migliorare le proprie strategie agronomiche. Le più antiche e rigogliose civiltà si sono sviluppate a ridosso dei grandi fiumi (Macklin, 2015) e già i babilonesi erano in grado di coltivare diverse specie: lenticchie, aglio, pere ed albicocche (Mauer, 1983).

Già in questo periodo si è iniziata una selezione genetica dei cereali: questo avveniva scegliendo per le semine, le spighe spontanee migliori, cioè quelle più ricche in granelle e più resistenti. Le varietà che conosciamo oggi e che ancora coltiviamo non sono altro che il frutto di una domesticazione di 8-10 mila anni fa (Pankin e von Korff, 2017).

Una rivoluzione sulla gestione dei campi arrivò nell'alto Medioevo, intorno al VIII secolo, quando si sviluppò la rotazione triennale dei campi che consisteva nel coltivare i terreni alternando

cereali e legumi o lasciandoli liberi per il pascolo (Bruns, 2012). I legumi, infatti, hanno la capacità di fissare l'azoto atmosferico nei suoli e renderlo più disponibile per le successive semine. Negli anni sono state studiate diverse e numerose variazioni di rotazione riassunte dal grande agronomo tedesco Albrecht Thaer, estremamente conosciuto per i suoi studi che permisero la coltivazione della patata nei rigidi climi tedeschi (Uhl, 2022).

Nella seconda metà del 1700, in Inghilterra, avvenne quella che conosciamo come Rivoluzione Agricola, che consentì un rapido aumento della popolazione. Furono molte le cause che portarono a questo aumento della produzione agricola: la recinzione dei campi, le innovazioni tecnologiche, il passaggio da una rotazione triennale ad una pluriennale e un cambiamento di mentalità, più imprenditoriale, che via via portò alla Rivoluzione Industriale.

Gli approcci all'agricoltura rimangono pressoché invariati per molto tempo, fino ad arrivare alla Rivoluzione Verde che ha trovato la sua origine nel 1944 in Messico (Hogg, 2020) grazie al lavoro di un agronomo ed ambientalista statunitense, Norman Borlaug, vincitore del premio Nobel per la Pace nel 1970.

L'idea era quella di sviluppare varietà ibride, sfruttando la selezione artificiale, che permettessero un aumento della produzione delle principali specie di interesse (grano, riso e mais). I migliori risultati di questa innovazione si sono verificati senza dubbio in India, nel sud-est asiatico e nel centro e sud America (John e Babu, 2021). Una delle maggiori innovazioni che ebbe un enorme impatto sull'alimentazione di estese e diverse aree del mondo arriva dal *International Rice Research Institute* (IRRI). L'obiettivo di questo istituto delle Filippine con l'aiuto e l'appoggio di due fondazioni statunitensi era quello di creare una nuova varietà di riso che potesse evitare ulteriori decimazioni delle popolazioni causate dalle carestie e che potesse assicurare la sopravvivenza delle popolazioni a seguito del boom demografico.

Nel 1962, incrociando più di 10 mila varietà di riso, si diede vita all'IR 8, una nuova varietà che, se debitamente coltivato, grazie all'utilizzo di pesticidi e fertilizzanti, era in grado di aumentare di 10 volte il raccolto. Il suo utilizzo in India, per i suoi eccezionali risultati, gli conferì l'appellativo di "riso dei miracoli". Ad oggi l'IRRI sta lavorando per poter produrre varietà che possano rispondere *ad hoc* alle diverse esigenze ambientali. La sfida attuale, infatti, è quella di far fronte ai drastici cambiamenti che avvengono a livello globale e che influiscono con l'agricoltura. Scenari come la desertificazione, innalzamento delle temperature, tropicalizzazione di climi temperati, sono alcuni esempi di cambiamenti repentini che avvengono in varie parti del mondo. Le colture

tradizionali, quindi, devono subire un rinnovamento da vari punti di vista, sia tecnico che biologico (Altieri et al., 2015).

A questo riguardo è interessante lo studio di Battilani e collaboratori (2016) che consiste in una previsione della contaminazione da parte di aflatossina B₁ su grano e mais entro i prossimi 100 anni, considerando uno scenario di cambiamento climatico in cui si hanno due possibilità: l'aumento di 2 °C e un aumento di 5 °C rispetto alla media Europea.

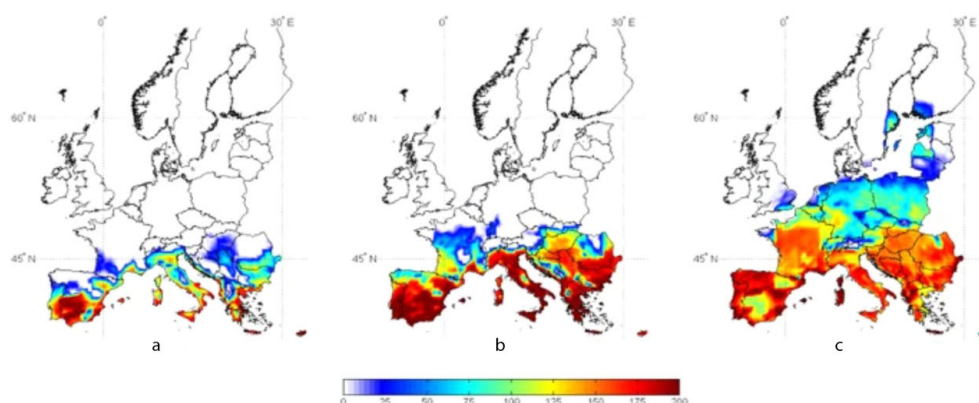


Figura 4 Indice di diffusione della AFB₁ in Europa con nello scenario attuale (a), a +2° (b), e +5°(c)

Lo scenario mostra come già ad un incremento di 2 °C (Figura 4, b) corrisponda un sensibile aumento del rischio di contaminazione delle derrate cerealicole da parte dell'aflatossina B₁ (AFB₁) nelle regioni europee del Mediterraneo, mentre ad un incremento di 5 °C (Figura 4, c) il rischio di incidenza aumenti anche per le zone più settentrionali che attualmente non sono interessate dal problema.

Ad oggi, infatti, la zona con una possibile contaminazione di aflatossina, per quanto riguarda il mais, si trova in aree principalmente inferiori alla latitudine di 45° nord. L'aumento della temperatura allarga l'area di interesse. Nello scenario +5°C infatti è prevista che arriverà anche a latitudini intorno ai 60° nord, una distribuzione molto più settentrionale rispetto a quella attuale. In entrambe gli scenari le zone più soggette all'aumento della contaminazione da aflatossina sono l'Europa orientale, la penisola balcanica e le regioni del Mediterraneo.

Non è da sottovalutare in oltre un aspetto che riguarda la contaminazione di micotossine dei suoli, delle acque irrigue e deiezioni animali utilizzate come fertilizzanti (Juraschek, et al., 2022). Anche se, parte di queste tossine possono essere degradate per opera del microbioma del suolo (Fouchè et al., 2020) tale fenomeno non può essere sottovalutato al fine della qualità delle colture in atto.

1.3.1 Alternative varietali dei grani commerciali

Oltre alla ricerca per individuare specie più produttive e facili da coltivare si sta cercando anche di creare nuove linee che abbiano una resistenza maggiore nei confronti dei patogeni grazie all'ingegneria genetica. Un esempio è quello prodotto da Risk e colleghi (2013) in cui hanno trasferito il gene Lr34 (codifica per un trasportatore di adenosina) di grano nell'orzo. Questo gene era da tempo noto per conferire un'importante resistenza nei confronti di un'ampia varietà di patogeni fungini nella pianta del grano. Il risultato di questo lavoro di trasformazione è stato quello di creare una varietà di orzo che presenta una resistenza multipatogena nella prima fase di sviluppo della pianta.

Tra le tante specie di cereali è doveroso citare il grano, una delle varietà di cereali più coltivate e



Figura 5 Visualizzazione della produzione globale di grano per paese (2000-2020)

consumate a livello mondiale (Figura 5). I componenti principali dell'endosperma del grano, amido e proteine, influenzano la qualità del prodotto finale. La differenza tra grano duro (*Triticum durum*) e tenero (*Triticum aestivum*), sta nella forza di legame dei granuli di amido con proteine e lipidi. Nel grano tenero, a causa della maggiore espressione di proteine implicate nella plasticità della cariosside, puroindoline PINA e PINB, la farina risulta essere più elastica (Kumar et al., 2016).

Per quanto la selezione da parte dell'uomo su questo cereale risalgia fin dai primordi dell'umanità, la ricerca scientifica non si è mai arrestata. Un esempio è l'argentino HB4, dalla Bioceres Crop Solutions Corp.

La particolarità di questa varietà sta nella resistenza allo stress della siccità grazie al gene del girasole reattivo alla siccità Hahb4 (Pushpendra et al, 2024).

Parallelamente, si stanno selezionando varietà di grano che possano apportare benefici nutraceutici, tra cui spiccano i grani pigmentati. Questi grani presentano una colorazione caratteristica sulla cariosside, legata alla presenza di antociani, pigmenti idrosolubili della famiglia dei flavonoidi. La gamma di colori varia dal blu al rosso e al viola, in base alla composizione specifica dei pigmenti. Ad esempio, i grani viola devono il loro colore principalmente ai derivati della cianidina, tipicamente concentrati nel pericarpo, mentre il colore blu è dovuto ai derivati della delphinidina, presenti prevalentemente nello strato aleuronico. Alte concentrazioni di pelargonidina e tannini catechinici determinano una colorazione rossa nella

granella (Iametti et al., 2018). Le cariossidi di grano nero, risultanti dall'ibridazione tra quelli viola e blu, sono caratterizzati da una notevole capacità antiossidante, grazie alla loro capacità di eliminare i radicali liberi (Gupta et al., 2021). Questa selezione di grani pigmentati non solo è importante per il miglioramento nutrizionale, ma anche per le potenziali applicazioni nella prevenzione di malattie croniche, in virtù del loro contenuto bioattivo.

La crescente attenzione verso la sostenibilità ambientale e la conservazione delle terre agricole ha evidenziato i limiti dell'agricoltura basata su monoculture annuali, che generano effetti negativi sull'ecosistema, tra cui l'inquinamento delle acque e l'erosione del suolo (Monfreda et al., 2018). In questo contesto, lo sviluppo di varietà di grano perenne è stato proposto come una soluzione promettente per migliorare la sostenibilità della produzione agricola, la sicurezza alimentare e la qualità ambientale (Gazza et al., 2016). Le piante perenni, grazie al loro apparato radicale più esteso e profondo, rispetto alle varietà annuali, forniscono una copertura del terreno prolungata, riducendo l'erosione del suolo e preservando le risorse idriche. Inoltre, la loro stagione di crescita più lunga contribuisce a minimizzare la lisciviazione dei nutrienti e a mantenere un ecosistema più stabile (Cui et al., 2018).

Lo studio condotto da Bertola (2023) ha esaminato in dettaglio l'evoluzione della composizione e dell'attività del rizobioma, la struttura e la diversità delle comunità microbiche nella rizosfera e nell'endosfera (Visioli, et al., 2015), in quattro linee (235A, 280B, 11955, OK72) di grano perenne. I risultati hanno mostrato che la permanenza prolungata (4 anni) di queste colture nel suolo non solo altera significativamente la qualità, ma anche la quantità degli essudati radicali. Questa trasformazione rimodella la comunità microbica del suolo, creando un ambiente più favorevole che promuove un'interazione più efficiente (crosstalk) tra la pianta e il microbioma. Tale interazione rafforza la resilienza della pianta agli stress di natura abiotica e biotica. Attualmente sono scarse le informazioni inerenti a questo tipo di cereali e le ricerche vengono attuate ad ampio spettro, considerando, fattori genetici, agro-ecologici, nutrizionali e non da meno, le interazioni con patogeni.

1.4 Meccanismi di difesa delle piante in risposta all'infezione del patogeno e alle tossine

Ad ogni stadio di crescita le piante sono sottoposte alla possibilità di essere infettate da patogeni presenti nell'ambiente. In questo contesto di continuo conflitto il concetto di resistenza diventa fondamentale. Questo fenomeno venne descritto per la prima volta da Ward (1902) che riferì di

una reazione di resistenza alla ruggine del bromus. Secondo Teetes (2009), la resistenza delle piante è definita come "la conseguenza di qualità vegetali ereditarie che determinano che una pianta sia relativamente meno danneggiata di una senza tali qualità. In termini pratici, una cultivar resistente è quella che produce di più rispetto ad una cultivar suscettibile, cioè priva di queste caratteristiche".

Le piante hanno sviluppato una vasta gamma di meccanismi di difesa che possono essere distinti in difese costitutive e difese inducibili a seguito di danni o in seguito al rilevamento di erbivori (Agrawal, 1999; Van Zandt, 2007, Frattini, 2024).

Le prime sono costituite da un'ampia gamma di difese dirette, innate, sempre presenti, e non specifiche: le strutture superficiali degli organi vegetali, come la cuticola costituiscono un'impalcatura rigida e spessa con funzione di barriera meccanica (Lażniewska, 2012).

Anche la presenza di cere epicuticolari (costituite da una miscela molto eterogenea di idrocarburi, acidi grassi a catena lunga, aldeidi grassi, alcoli primari e secondari, chetoni ed esteri), è stato dimostrato, svolgere un ruolo significativo come barriera fisica (Ni et al., 2014; Watts e Kariyat, 2022).

Esistono anche vari tipi di peli di superficie (tricomi) che si originano dalle cellule epidermiche e che sporgono dalle foglie e/o dallo stelo e svolgono sia la funzione di barriera fisica, ma anche quella di riserve chimiche per composti di difesa verso svariati fattori biotici ed abiotici, incluso l'attacco di patogeni (Lażniewska, 2012, Celedon, 2020).

Le difese inducibili vengono rapidamente attivate a seguito di un danno (Cheng, 2008; Turner, 2002; Frattini, 2024). Queste difese consistono di tre fasi: sorveglianza, trasduzione del segnale e produzione di sostanze chimiche difensive. Nella fase iniziale, il sistema di sorveglianza della pianta individua l'attacco dei parassiti tramite il riconoscimento specifico di segnali molecolari. Questi segnali vengono poi trasmessi attraverso una complessa rete di vie di trasduzione, culminando nella sintesi di composti chimici di difesa (Cheng, 2008). Un esempio è la liberazione di composti organici volatili (VOC) generalmente costituiti da una miscela di metaboliti secondari come i terpeni, ed altri composti derivati dall'acido shikimico e prodotti derivati dagli acidi grassi (Turlings, 1992) che svolgono un importante ruolo nella comunicazione pianta-pianta attivando il priming di difesa (Hu, 2021).

Questo fenomeno consiste nel fatto che piante sottoposte all'attacco da parte di insetti erbivori emettono miscele specifiche di volatili vegetali indotti dagli erbivori (HIPV). Gli HIPV possono

indurre i tessuti vegetali intatti a rispondere più rapidamente e/o fortemente al successivo attacco degli erbivori (Hilker e Schmülling, 2019, Ye, 2019). Tra le difese inducibili troviamo anche la regolazione della produzione di sostanze chimiche tossiche come, per esempio, la nicotina prodotta dalle foglie di tabacco (*N. tabacum*) come conseguenza dell'attacco di erbivori (Mithöfer et al., 2012).

Oltre a queste strategie troviamo anche la produzione di enzimi con il compito di degradare le strutture biologiche dei patogeni o portare all'apoptosi delle cellule vegetali così da "isolare" il parassita (Salguero-Linares et al., 2023). Fanno parte della difesa inducibile anche vari metaboliti secondari (Karban, 2011) che si possono distinguere in tre macrogruppi: terpeni, fenoli ed alcaloidi.

I primi comprendono più di 22.000 composti noti, classificati in base al numero di unità di isoprene che li costituisce.

Tra i più noti troviamo gli oli essenziali, miscele di terpeni volatili estremamente attive nella difesa contro insetti fitofagi e microrganismi fitopatogeni (Taheri et al., 2023). Nello stesso gruppo troviamo anche i triterpeni come l'acido rotundico che ha mostrato un'ampia attività antimicrobica contro batteri, lieviti e funghi filamentosi come *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus chinensis* (Haraguchi et al., 1999).

Nella classe dei fenoli troviamo flavonoidi, le antocianine, le fitoalessine, i tannini e la lignina, metaboliti con marcata attività antimicrobica (Wang et al., 2024; Ahuja et al., 2012). I primi agiscono come antimicotici ed antivirali (Ahmad, 2015), ed essendo antiossidanti, al contempo proteggono la pianta dallo stress ossidativo indotto dall'infezione. Le fitoalessine, prodotte in seguito ad un attacco, sono in grado di bloccare la crescita e la moltiplicazione del patogeno all'interno delle cellule vegetali (Bizuneh et al., 2021). I tannini conferiscono un sapore forte ed amaro in diverse parti della pianta contribuendo a dissuadere gli erbivori, per esempio proteggendo foglie e frutti acerbi. Inoltre, possiedono proprietà antimicrobiche che possono contrastare le infezioni batteriche (Iqbal, 2025; Kulbat, 2016). La lignina oltre a conferire un ruolo chiave nel supporto strutturale per la crescita verso l'alto della pianta, e permettendo il trasporto d'acqua a lunga distanza, possiede anche un'importante funzione di difesa (Xie, 2016; Khan, 2022). L'ultimo gruppo, gli alcaloidi, è composto da strutture azotate, con struttura estremamente eterogenea, con un tipico sapore amaro. Fanno parte degli alcaloidi, la cocaina (*Erythroxylon coca* Lam), la morfina (*Papaver somniferum*), la nicotina (*Nicotiana tabacum*) e la caffeina (*Coffea arabica*, *Theobroma cacao*, *Camellia sinensis*). Quest'ultima risulta tossica sia

per insetti che per i funghi (Ali, 2019), tant'è che livelli alti di caffeina prodotti da una pianta possono inibire la germinazione di altri semi nelle vicinanze (fenomeno noto con il termine di allelopatia) (Tanti, 2016).

Un altro metodo efficace per contrastare l'attacco da parte di patogeni è la sintesi rapida di callosio, un polisaccaride costituito da unità di β -1,3-glucano, normalmente distribuito nelle piante superiori che può essere riallocato sia a livello di parete nel sito di attacco, che nei plasmodesmi per limitare l'eventuale diffusione del patogeno nei tessuti (Wang, 2021; Jingsheng, 2024).

1.4.1 Riconoscimento

L'attivazione delle risposte di difesa nella pianta dipende dalla loro capacità di percepire tempestivamente la presenza del patogeno (Gomez, 2004). La percezione ed il riconoscimento rappresentano una caratteristica fondamentale del successo evolutivo e della sopravvivenza delle piante (Dalio, 2020). Il primo evento necessario per attivare la risposta difensiva è la percezione del patogeno. È noto che alcuni componenti di origine fungina vengono riconosciuti dagli ospiti come risposta ad una infezione (Esquerré-Tugayé et al., 1979; Zhang et al., 2020). Attraverso recettori transmembrana, come le chinasi (RLK) o i recettori di riconoscimento del pattern (PRR), la pianta è in grado di riconoscere diversi pattern molecolari conservati in patogeni/danni/erbivori (PAMP/DAMP/MAMP/HAMP) come per i funghi la chitina, i β -glucani ed ergosterolo (Mishina et al., 2007; Fesel et al., 2015), la flagellina, il peptidoglicano e i lipopolisaccaridi per i batteri (Newman et al., 2013).

Questo riconoscimento innesca una serie di risposte "immunitarie" chiamate Pattern-Triggered Immunity (PTI). Queste si attivano subito dopo aver riconosciuto i pattern, aumentando l'afflusso di ioni calcio (Ca^{2+}), la produzione di ROS e l'attivazione della proteina chinasi (MAPK) (Ding et al., 2022). Nella stretta co-evoluzione tra piante e patogeni, questi ultimi si sono evoluti per aggirare o sopprimere la PTI attraverso la liberazione di molecole effettrici; questo si traduce nella suscettibilità innescata dall'effettore (ETS) per la pianta. Queste, a loro volta, hanno sviluppato recettori intracellulari ricchi di leucina (NLR), in grado di legare nucleotidi e rilevare gli effettori, spesso codificati dai geni di resistenza (R) che individuano specifici patogeni. Questo processo attiva l'immunità innescata dall'effettore (ETI) in risposta alla percezione dell'effettore stesso. (Jones et al., 2006; Pok Man Ngou, 2022). L'interazione tra PTI, ETS ed ETI si traduce nel concetto di "zig-zag" proposto da Jones e Dangl (2006).

La resistenza è modulata da una complessa rete di trasduzione del segnale, che attiva l'espressione di numerosi geni associati alla risposta di difesa (Ding et al., 2022).

1.4.2 *Meccanismi di detossificazione*

La cellula vegetale rappresenta un ambiente chimico e biologico molto complesso: il citosol è caratterizzato da un pH che viene generalmente mantenuto vicino alla neutralità; il succo vacuolare è invece un ambiente mediamente acido (pH compreso tra 4 e 5). L'insieme delle pareti e degli spazi intercellulari (definito apoplasto) è altresì un ambiente mediamente acido (pH intorno al 5). Per questo motivo le membrane, sia il plasmalemma che il tonoplasto, sono particolarmente ricche di proteine carriers e canali transmembrana che permettono il traffico di varie molecole da e per i vari compartimenti, al fine di mantenere l'omeostasi chimica e metabolica. Nelle piante vascolari, il sistema di trasporto delle molecole a lunga distanza è rappresentato dal tessuto vascolare, formato da xilema (trasporto di soluzioni assorbite dalla radice) e floema (trasporto di soluzioni organiche derivate dalla fotosintesi), all'interno dei quali viaggiano soluzioni acquose la cui composizione varia largamente in base a diversi fattori ambientali e di sviluppo.

Appare evidente quindi, che le caratteristiche chimico-fisiche delle molecole presenti nei tessuti vegetali, possano variare in funzione dell'ambiente in cui si trovano. Queste variazioni determinano anche il tipo di movimento a cui sono sottoposte (Ju et al., 2020). La solubilità in acqua (descritta mediante $\log K_{ow}$) influenza l'interazione delle molecole con i diversi componenti della cellula vegetale: quelle più idrofobiche tendono a essere facilmente trattenute dalle pareti cellulari e dagli organuli citoplasmatici. Molecole con valori $\log K_{ow}$ compresa tra 1 e 3, sono facilmente solubili in acqua, sono assorbiti velocemente dall'apparato radicale e traslocati verso le parti aeree della pianta. Molecole con $\log K_{ow}$ superiore a 3, generalmente sono poco mobili all'interno della pianta e rimangono nei tessuti della radice (Cao et al., 2023).

Gli xenobiotici sono sostanze chimiche riconosciute come estranee dall'organismo. In linea generale, gli xenobiotici rappresentano una contaminazione naturale o antropica dell'ambiente in cui si sviluppa la pianta. Fitofarmaci, sali inorganici, metalli pesanti, farmaci, idrocarburi, miscele di oli ed altri inquinanti, rappresentano i principali inquinanti ambientali a cui le piante sono sottoposte. Tali sostanze, per vie differenti, possono entrare nei tessuti vegetali e, poiché non fanno parte del metabolismo, rappresentano uno stress. Allo stesso modo, molecole

organiche prodotte da altri organismi (batteri e funghi) vengono riconosciute dalle piante come sostanze “estrane” al pari di xenobiotici di altra natura.

Per poter evitare un accumulo eccessivo di xenobiotici, le piante, hanno sviluppato un efficace meccanismo di detossificazione.

Molti xenobiotici sono lipofili, il che significa che tendono a penetrare facilmente nelle cellule vegetali, distribuendosi ed accumulandosi all’interno della cellula fino a raggiungere concentrazioni tossiche. Tuttavia, le piante dispongono di sistemi di detossificazione che permettono di neutralizzare o eliminare queste sostanze, impedendo che raggiungano livelli nocivi per la sopravvivenza della pianta.

Questo meccanismo di detossificazione consiste di due processi sequenziali (Coleman et al., 1997):

- Trasformazione chimica (modificazione)
- Compartimentalizzazione

Per quanto riguarda il primo punto, le trasformazioni chimiche coinvolgono più enzimi che vanno a modificare la molecola originaria. Allo stato attuale delle conoscenze il tasso di modificazioni e i risultati di queste, possono dipendere dalla specie vegetale e dagli organi considerati; la catalisi che permette questa detossificazione è infatti operata da enzimi che normalmente contribuiscono al metabolismo della pianta stessa. Poiché l’evoluzione ha portato a diversi gradi di adattamento biochimico alle varie condizioni ambientali, le diverse specie instaurano rapporti differenti con gli xenobiotici.

Da queste trasformazioni si ottengono molecole più idrofile, e quindi meno mobili tra le pareti biologiche evitando così la loro distribuzione all’interno dei diversi tessuti.

La prima fase della detossificazione, trasformazione chimica, si divide in due passaggi: nel primo, la molecola estranea viene generalmente idrossilata o va incontro ad ossidazione. In questa fase sono diverse le reazioni che vengono effettuate e sono molti gli enzimi coinvolti; il complesso enzimatico più rilevante è il citocromo P450, una super-famiglia di proteine ematiche localizzate principalmente nel reticolo endoplasmatico. Esistono diverse isoforme del citocromo P450, ciascuna specializzata in reazioni biochimiche differenti, il che amplia la varietà di substrati metabolizzabili e delle reazioni catalizzate. Per alcune molecole prodotte nella fase I, è necessaria un’ulteriore modifica chimica (fase II) che prevede l’incorporazione di una molecola fortemente idrofila (zuccheri, amminoacidi, glutazione, ecc.) che ne facilita il passaggio successivo, la

compartimentalizzazione nel vacuolo o nella parete cellulare (Coleman et al., 1997; Kawahigashi et al., 2009).

Non tutti gli xenobiotici seguono il percorso metabolico sopra descritto. Alcune molecole, infatti, possiedono già le caratteristiche chimico-fisiche necessarie per essere direttamente compartimentate all'interno delle cellule vegetali. Questi composti bypassano le reazioni catalizzate nelle fasi I e II del metabolismo, evitando così le modifiche strutturali tipicamente richieste per aumentarne la solubilità.

Anche le micotossine rilasciate nei tessuti in seguito all'infezione fungina seguono questo tipo di modifiche: reazioni di glicosilazione, acetilazione, coniugazione o modifiche strutturali portano ad ottenere quelle che vengono definite "micotossine mascherate". In questa forma possono essere stoccate in spazi non condivisi dal sistema metabolico, quali la parete cellulare, o direttamente nel vacuolo. Il sequestro dal citosol di questi composti riduce drasticamente la loro tossicità, rendendone efficace il meccanismo di detossificazione.

Tra gli esempi più noti ed indagati di micotossine mascherate troviamo il Deossinivalenolo-3-glucoside (D3G), ossia il prodotto della glicosilazione del deossinivalenolo (DON) (Figura 6) (Ovando-Martínez et al., 2013).

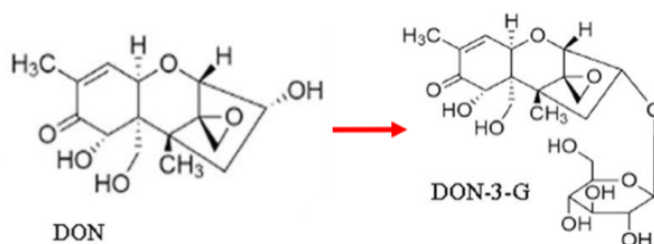


Figura 6 Schematizzazione della modificazione di DON in D3G

Oltre al DON-3-glucoside, per quanto risulti il principale metabolita della detossificazione del deossinivalenolo, sono stati individuati diversi derivati, come il DON-3-solfato (D3S), il DON-15-solfato (D15S), il DON-glutatione (DON-GSH), il DON-malonilglucoside, il DON-di-esoside, il DON-15-O- β -D-glucoside (D15G), il 15-acetil-DON-3-O- β -D-glucoside (15-ADON3G) e il 15-acetil-DON-3-solfato (15-ADON3S) (Schmeitzl et al., 2015).

Questa “micotossina mascherata” è il risultato dell'idrossilazione di fase I operata prevalentemente dal citocromo P450 (Figura 7). Nello studio recente (Righetti et al., nel 2021), piantine di *Z. mays* sono state coltivate *in vitro* e trattate per 14 giorni con AFB₁ ed è emerso che, oltre alla tossina originaria, erano presenti anche l'aflatossina B₂ (AFB₂), l'aflatossina M₁ e l'aflatossina M₂, suggerendo un esteso metabolismo di fase I.



Fondamentale è la presenza e l'omeostasi del glutatione (proteina composta da glicina, cisteina e acido glutammico). Esso può agire sia da riducente, proteggendo la cellula in caso di aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS), ma anche come nucleofilo proteggendo la cellula dalla tossicità degli xenobiotici attraverso modificazioni chimiche. La sua coniugazione a molecole elettrofile può avvenire sia in modo spontaneo sia grazie al supporto della glutatione-S-transferasi (GST).

Lo stoccaggio e la compartimentazione sono necessari perché i coniugati non rimangano nel citosol, in cui avviene la coniugazione con il glutatione. In caso contrario, possono bloccare l'attività della glutathione-S-transferasi (GST) portando all'accumulo di xenobiotici elettrofili liberi, creando un potenziale danno per la cellula (Dorion et al., 2021).

1.4.3 *Resistenza Sistemica Acquisita (SAR)*

Un altro importante meccanismo di difesa vegetale consiste nella Resistenza Sistemica Acquisita (SAR). Questa conferisce alla pianta un'efficace resistenza verso i patogeni sul lungo periodo, e si attiva sempre in seguito ad un'iniziale infezione localizzata da parte di un patogeno. Questo meccanismo conferisce un maggiore stato difensivo in tutte le parti della pianta non direttamente interessate dall'infezione (Conrath et al., 2006; Hartman et al., 2016).

Si tratta di un perfetto esempio di difesa inducibile, a cui si può pensare come un "sistema immunitario" vegetale: le piante non possiedono un sistema circolatorio, cellule immunitarie mobili, non possiedono recettori immunitari per il rilevamento del *non-self*, ma anch'esse sono in grado di dare risposte immunitarie efficienti e soprattutto creare una "memoria" nei confronti dei patogeni con cui erano già entrati in contatto (Spoel et al., 2012). Nella SAR, le piante vengono predisposte (sensibilizzate) a rispondere in modo più rapido ed efficace a un successivo attacco da parte di patogeni. Poiché questo meccanismo si basa su una serie di eventi a livello molecolare, biochimico e fisiologico, portano ad una capacità difensiva che può essere sfruttata come "memoria vegetale" (Conrath et al., 2006; Kim et al., 2023).

Il punto centrale della Resistenza Sistemica Acquisita è che agisce in zone distanti dal punto di infezione: perché questo avvenga sono necessari dei segnalatori in grado di muoversi a lunga distanza nell'organismo vegetale.

Tra gli ormoni vegetali, l'acido jasmonico (JA) e i suoi derivati e l'acido salicilico (SA) sono tra i principali elicitori coinvolti nella risposta delle piante agli stress biotici (Giri et al., 2016). Infatti, entrambi giocano un ruolo chiave sia nell'attivazione che nella regolazione dei meccanismi di difesa contro le infezioni da patogeni (Pieterse et al.; 2004, Kachroo et al., 2007; Mamun et al.; 2024). L'acido jasmonico (JA) è riconosciuto come una molecola centrale nei processi di difesa, segnalazione e sviluppo delle piante. Insieme ad altri fitormoni, tra cui acido salicilico, etilene, acido indolo-3-acetico, acido abscissico, citochinine e gibberelline, contribuisce alla risposta di difesa dell'ospite e alla regolazione dei segnali immunitari. Il suo ruolo è particolarmente

rilevante nell'adattamento agli stress biotici, come l'attacco di patogeni ed erbivori, oltre che nella risposta a condizioni ambientali avverse (Huang et al., 2017; Irankhah et al., 2020; Orsoni et al., 2020). I geni e i loro prodotti, inclusi i fattori di trascrizione (TF) coinvolti nella biosintesi e nella segnalazione dell'acido jasmonico (JA), regolano la risposta immunitaria delle piante attivando sia la segnalazione locale che sistemica. Questi processi portano all'espressione di geni e proteine associate alla resistenza ai patogeni (PR), alla sintesi di fitoalessine e alla modulazione degli effettori attraverso l'interazione con le proteine dell'ospite. Inoltre, l'applicazione esogena di JA può stimolare significativamente il circuito immunitario vegetale, influenzando l'espressione genica e le interazioni proteiche. Di conseguenza, JA contribuisce al rafforzamento delle difese della pianta mediante la resistenza acquisita sistemica (SAR) e la resistenza sistemica indotta (ISR) (Roychowdhury et al., 2025).

L'acido salicilico viene riconosciuto da due classi di recettori, NONEXPRESSER OF PR GENES1 (NPR1) e NPR1-LIKE PROTEIN 3 (NPR3)/NPR4, e attiva due distinti percorsi di segnalazione coinvolti nell'induzione dell'espressione di geni associati alla risposta di difesa della pianta (Ding, 2018; Liu, 2020). In particolare, il legame tra SA e NPR1 promuove l'attività di NPR1, che ha funzione di attivatore trascrizionale. Al contrario, il legame di SA a NPR3/NPR4 inibisce la loro attività di repressore, portando quindi alla de-repressione dei loro geni target, repressione normalmente attiva in assenza di infezione da patogeni (Liu et al., 2020).

1.4.4 *Aspetti molecolari della risposta all'infezione fungina*

Le risposte che le piante sono in grado di mettere in atto per ostacolare gli stress biotici sono numerose, complesse e su vari livelli. La relazione tra patogeno e ospite è un'interazione che comprende reti complesse di molecole, percorsi di segnalazione e strategie per regolare le difese e gli attacchi l'uno dall'altra (Diaz et al., 2018).

Le piante, però, non elaborano una reazione specifica per ciascun patogeno, ma quando sono sottoposte ai vari fattori di stress, avviano cascate di segnalazione che influenzano molteplici espressioni geniche e inducono l'adattamento. In risposta agli attacchi, le piante adottano una vasta gamma di modifiche che influenzano vari aspetti del proprio funzionamento.

Sono diversi i geni coinvolti nella risposta difensiva:

- Geni codificanti trasportatori dello zucchero:

Il trasporto (source-to-sink) e la distribuzione degli zuccheri svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dello sviluppo delle piante e nella loro risposta agli stress biotici e abiotici (Lemoine et al., 2013). Nella maggior parte delle interazioni tra pianta e patogeno, i nutrienti vengono trasferiti dalla pianta al microrganismo, mentre le cellule ospiti cercano di contrastare questo processo riprogrammando il loro metabolismo e il trasporto del carbonio. Nel corso di questo conflitto, l'attività fotosintetica subisce un calo, con una modifica d'espressione dei geni associati. Il ruolo della modulazione del metabolismo e del trasporto degli zuccheri durante l'infezione è evidente dal fatto che il contenuto di zuccheri solubili nelle foglie di mais (*Zea mays*) subisce alterazioni significative durante l'infezione da parte del patogeno biotrofico *Ustilago maydis* (Doehleemann et al., 2008). In questo contesto si inserisce la famiglia di trasportatori di zucchero SWEET, composta da 18 membri, denominati in base alla loro percentuale di identità di sequenza con le proteine SWEET di *Arabidopsis*, che includono lo stesso numero di membri. Il ruolo dei trasportatori di zucchero nell'interazione vite/patogeno è stato ampiamente riportato (Breia et al., 2021; Chong et al., 2014; Zhong et al., 2024; Prezelj et al., 2016). Esistono evidenze anche per il riso, in cui questi trasportatori sono il bersaglio di batteri che hanno sviluppato meccanismi mirati per modificarne l'espressione e ottenere zuccheri necessari per la loro crescita (Chong, 2014).

- Geni coinvolti nel rimodellamento della parete:

Le pareti cellulari sono la prima barriera per ostacolare l'ingresso dei patogeni, esse sono formate da tre tipi principali di polisaccaridi: cellulosa, diverse emicellulose e pectine. La composizione, per tipo e quantità di carboidrati determina le caratteristiche biologiche e strutturali della parete stessa. Alterazioni di queste proprietà possono determinare diverse suscettibilità all'attacco di microrganismi.

L'infezione da parte di patogeni inizia infatti, con alcune alterazioni della parete cellulare vegetale da parte di enzimi (CWME), che hanno come bersaglio i polisaccaridi. È noto che la suscettibilità/resistenza delle piante verso i patogeni dipende anche dalla composizione e dalla struttura della parete cellulare, che determinano la facilità di degradazione da parte dei CWME prodotte dai patogeni (Pogorelko, 2013).

Frammenti della parete cellulare (ad esempio oligalatturonidi), possono funzionare da DAMP (modelli molecolari associati al danno), ed essere riconosciuti da specifici recettori di membrana.

Questo innesca diverse vie di segnalazione a valle che mediano risposte di difesa, come la produzione di ROS, le vie mediate da ormoni dei pathway delle PR (pathogen related), riparazione della parete ed attivazione delle fitoalessine.

Alcuni patogeni necrotrofi sfruttano enzimi per degradare la cellulosa e facilitare il proprio ingresso nella foglia. È stato evidenziato che esiste una connessione tra cellulosa e resistenza alle patologie: l'inibizione della sintesi di cellulosa, e quindi dei geni CesA (cellulosa sintasi), per esempio, induce la sintesi di acido jasmonico (JA), un fitormone legato alla risposta agli stress (Ramirez et al., 2011).

È evidente come i geni che regolano la struttura e la robustezza della parete siano essenziali, e per questo usati nell'analisi molecolare per lo studio delle infezioni: i geni PGIP svolgono un ruolo essenziale nella risposta verso i patogeni fungini. Le PGIP sono glicoproteine che si trovano nella parete cellulare delle piante che riducono l'attività idrolitica delle poligalatturonasi (PG). Questi enzimi idrolizzano l'omogalatturonano (HG) della parete cellulare delle piante e svolgono un ruolo di virulenza andando ad indebolire la parete vegetale facilitando la penetrazione fungina.

- Geni codificanti proteine legate alla patogenesi (PR proteins):

A seguito del riconoscimento della presenza del patogeno, la pianta è in grado di produrre molecole che vanno a degradare la parete cellulare fungina come l'enzima CHI4c: si tratta di una chitinasi in grado di catalizzare la scissione idrolitica del legame β -1,4-glicosidico presente nella chitina, un componente importante della parete dei funghi patogeni. Le chitinasi sono proteine antifungine ben caratterizzate coinvolte nella risposta di difesa contro i patogeni (Veluthakkal et al., 2012).

Inoltre, in risposta all'infezione, la pianta dà l'avvio ad una serie di complessi meccanismi molecolari che attivano una cascata di molecole di segnalazione e di difesa.

Tra le molecole reclutate per questo scopo, sono state evidenziate le proteine correlate alla patogenesi (PR). Alcune PR, a discapito del nome, sono presenti a bassi livelli anche nei tessuti vegetali sani. In risposta alla patogenesi, queste PR possono aumentare, agendo come linea di difesa. Pertanto, le PR svolgono un ruolo chiave nei primi eventi di difesa, e possono ridurre i danni e la mortalità causati dai patogeni (Dos Santos et al., 2023).

In particolare, a seguito dell'infezione, sappiamo che entrano in gioco alcune molecole segnalatrici ormonali, SA e JA, che attivano l'espressione di PR10, e proprio questa espressione è

stata identificata come l'innesco della risposta ipersensibile (HR) e nell'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Lopes et al., 2023).

1.5 Strategie di studio *in vitro* della risposta delle piante all'infezione

Le colture *in vitro* hanno rivoluzionato la ricerca botanica ed agronomica sin dalla loro introduzione all'inizio del XX secolo. Pionieri come Gottlieb Haberlandt, considerato il padre della coltura cellulare vegetale, posero le basi per lo sviluppo di tecniche che avrebbero permesso la propagazione e lo studio di piante in condizioni controllate.

1950: questo è stato il periodo fondamentale per le tecniche di coltura di tessuti vegetali, è proprio in questo contesto che sono stati scoperti i regolatori di crescita, come auxine e citochinine, necessarie per il successo delle colture di tessuti vegetali.

Anni 60 e 70: questi anni hanno segnato i maggiori e significativi progressi nel campo, sono stati sviluppati i protocolli per la rigenerazione di piante a partire da cellule singole o da tessuti, ed il successo della coltura di varie specie importanti dal punto di vista economico. Inoltre, è in questi anni che si diffondono le tecniche di selezione e di biotecnologie vegetali.

1980: questi anni sono stati caratterizzati dalla commercializzazione delle tecniche di coltura *in vitro*, in particolare nel campo dell'ingegneria genetica, sviluppando piante geneticamente modificate, e nella propagazione delle piante su larga scala. La tendenza odierna è quella di preferire un approccio più ecologico e spostare la sperimentazione dal laboratorio al campo.

In effetti questo approccio porta con sé svariati benefici, soprattutto nella ricerca agronomica ed ecologica:

Condizioni realistiche: gli esperimenti condotti in campo sono influenzati dalle stesse condizioni che troviamo in natura, questo rende sicuramente i risultati applicabili a scenari del mondo reale.

Fattori ambientali: in campo la sperimentazione è influenzata da diversi fattori biotici ed abiotici come, i parassiti, i patogeni ed i cambiamenti climatici, questo fa sì che i trattamenti siano interpretati a tutto tondo.

Applicabilità: i dati ed i risultati degli esperimenti svolti in campo possono essere applicate direttamente alle pratiche agricole, i dati sono immediatamente disponibili per migliorare la gestione delle colture.

Comprensione olistica: L'osservazione di come le piante crescono ed interagiscono con l'ambiente e con fattori biotici che le circondano, dando importanti indicazioni sulla complessità degli ecosistemi.

Il principale punto di forza delle colture *in vitro* risiede nella capacità di eliminare completamente le variabili esterne, permettendo di osservare la risposta delle piante al massimo del loro potenziale. Questo consente di ottenere risultati chiari e precisi, fondamentali per comprendere i meccanismi vegetali nella loro forma più "pura". Una volta definiti questi meccanismi, diventerà più semplice analizzare ed interpretare le risposte delle piante quando il sistema sperimentale viene trasferito in un ambiente più complesso e soggetto a variabili.

Oltre a questo aspetto sono tanti i vantaggi che offre la coltura *in vitro*:

- 1) Controllo delle variabili: gli esperimenti vengono condotti in un ambiente facilmente controllabile, consentendo al ricercatore di poter decidere con precisione alcune variabili, come il fotoperiodo e l'intensità luminosa, la temperatura, i nutrienti e gli ormoni. Questo fa sì che si possano isolare alcuni fattori specifici che influenzano la crescita e lo sviluppo della pianta.
- 2) Produzione rapida durante tutto l'anno: queste tecniche consentono una rapida moltiplicazione delle piante, e la produzione di un gran numero di cloni. Questo aspetto è estremamente utile sia in campo commerciale che per aspetti legati alla conservazione di piante rare o a rischio; inoltre utilizzando queste tecniche si è completamente svincolati dalla stagionalità e dalla posizione geografica potendo così avere la garanzia di avere a disposizione costantemente materiale vegetale.
- 3) Colture prive di agenti patogeni: una prerogativa delle colture *in vitro* è che queste siano asettiche. Le piante vengono tenute in condizioni sterili in modo da evitare qualsiasi interferenza biotica.
- 4) Manipolazione genetica: questo sistema di coltura è uno strumento fondamentale per l'ingegneria genetica e le biotecnologie. Permette lo studio della funzione di geni, modulandone

i propri livelli di espressione, in piante geneticamente modificate in base alle caratteristiche desiderate.

Le tecniche di coltura *in vitro* si basano sul concetto di “totipotenza” (Figura 8), stabilita dal botanico austro-ungarico Gottlieb Haberlandt nel 1902. Le cellule vegetali già differenziate in tessuti, hanno la capacità di rigenerare un intero organismo.

Perché questo sia possibile sono necessarie adeguate condizioni di crescita:

- Specifici terreni di coltura
- Fonti di carbonio ed azoto
- Vitamine
- Ormoni
- Fattori ambientali come pH, luce e temperatura
- Condizioni asettiche

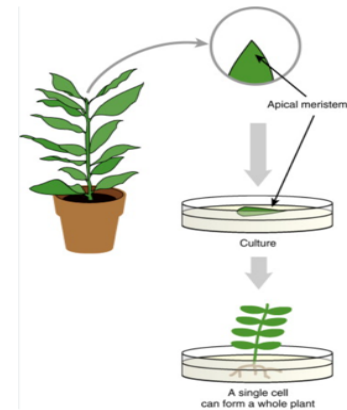


Figura 8 Schematizzazione del concetto di totipotenza

1.5.1 Tecniche di coltura *in vitro*

Diverse sono le tecniche di coltivazione in condizioni axeniche, sfruttabili per gli scopi più diversi:

- Micropropagazione: con questa tecnica è possibile ottenere un vasto numero di cloni, piante geneticamente identiche in tempo molto breve. Utilizzando inizialmente un meristema, tessuto vegetale le cui cellule mantengono la capacità di dividersi per mitosi, è possibile ottenere un germoglio e dopo alcuni cicli di propagazione, e con l'aiuto di specifici regolatori di crescita, si ottiene una piantina intera.
- Embriogenesi somatica: permette, partendo da cellule somatiche differenziate, di avere embrioni che possono successivamente formare piante intere. Questa tecnica è utilizzata per il miglioramento genetico e la conservazione di specie.
- Coltura di protoplasti: consiste nella rimozione, mediante specifici enzimi, della parete cellulare, lasciando solo la membrana plasmatica. Questa tecnica è usata per facilitare gli studi di ingegneria genetica, ibridazione e ricerca di base sulla fisiologia vegetale.
- Coltura di calli: consiste nella crescita *in vitro* di un agglomerato di cellule indifferenziate, note con il nome di “callo” che viene prodotto a partire da tessuti vegetali. Questi calli, se coltivati in un mezzo adeguato, mantengono la capacità di differenziarsi fino a formare un'intera pianta o

tessuti specifici. Mediante questa tecnica è possibile avviare colture di singole cellule in sospensione.

2. SCOPO DEL LAVORO

Le micotossine rappresentano una minaccia per la sicurezza alimentare globale e la salute pubblica. In previsione dell'innalzamento delle temperature che sta accompagnando questo secolo, e la nuova attenzione nei confronti di acque e suoli contaminati, lo studio delle interazioni tra piante e tossine è di primaria importanza.

Inoltre, comprendere meglio la risposta vegetale a queste, consente non solo il miglioramento delle pratiche agricole, ma anche una conoscenza più approfondita dei meccanismi di risposta delle piante. La conoscenza di questi aspetti potrebbe gettare le basi per studi futuri volti a sviluppare soluzioni alternative all'uso di pesticidi, promuovendo strategie di difesa naturale e contribuendo così a una maggiore sostenibilità agricola.

Il presente lavoro ha lo scopo di indagare quattro aspetti cruciali per una comprensione più chiara dei meccanismi di risposta vegetale in seguito alla somministrazione di diverse micotossine prodotte da alcuni funghi fitopatogeni. Nello specifico:

1. Condurre uno screening della capacità di detossificazione del DON:

Negli ultimi anni la tendenza all'uso di alimenti nutraceutici ha posto l'attenzione verso cereali non convenzionali quali, ad esempio, varietà di grano dall'elevato contenuto, nelle cariossidi, di antocianine. Queste molecole hanno un'elevata capacità protettiva verso stress ossidativi. Di questi grani, definiti "pigmentati", non è nota l'interazione nei confronti di patogeni e sostanze xenobiotiche, tra cui le micotossine. Si sono volute quindi valutare le differenze nella capacità metabolica di detossificazione della tossina deossinivalenolo (DON). In aggiunta, si è voluto valutare l'eventuale risposta metabolica alle micotossine tra cellule indifferenziate e piante completamente formate.

L'attenzione riguardo a pratiche agricole meno impattanti per l'ambiente ha portato alla creazione di varietà di grano cosiddette "perennanti", poiché non necessitano di essere seminate annualmente. Sebbene siano ancora in corso le sperimentazioni inerenti agli aspetti nutrizionali e di resa, in questo contesto si è voluto valutare la loro risposta biologica al trattamento con tossine fungine.

2. Indagare aspetti fisiologici relativi all'eventuale mobilità delle micotossine nella pianta:

Per mezzo di due set di esperimenti, mirati, si è voluto verificare l'eventuale movimento tra vari organi della pianta di micotossine, scelte sulla base di criteri di solubilità e peso molecolare. Per questo tipo di esperimenti si è scelto, come pianta modello, il mais per la semplicità di esecuzione delle prove.

3. Valutazione di effetti di AFB₁ su mais:

Al fine di determinare eventuali differenze nella risposta delle piante con aflatossina B₁, sono stati condotti saggi volti a valutare un eventuale cambiamento nel profilo proteomico e sulla capacità antiossidante delle piante.

4. Discriminare la risposta molecolare della pianta all'infezione da *Aspergillus* dalla risposta indotta dalla tossina:

Al fine di valutare alcune risposte molecolari della risposta delle piante a seguito dell'infezione da patogeni e micotossine, si sono utilizzate come modello sperimentale collezioni di germoplasma di *Vitis vinifera* allestite presso l'Università di Minho, (Portogallo). In questo ambito si sono condotte sperimentazioni su foglie e sospensioni cellulari inoculate con spore di *Aspergillus* o con Ocratossina A.

3. MATERIALI E METODI

In questo lavoro sono stati condotti esperimenti in sterilità, impiegando tecniche di coltura *in vitro* e prove condotte *in vivo*. In entrambi i casi si è optato per la sterilizzazione di tutti i materiali impiegati al fine di garantire una migliore qualità dei risultati.

Bottiglie di vetro, cilindri graduati, beute, piastre da taglio, supporti necessari per la crescita delle piante in terreno liquido e terreni di crescita sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 minuti con una pressione di 1 atm. Vasi e provette di vetro per le colture sono state sterilizzate termicamente in stufa per 4 ore a 200 °C.

La soluzione standard dell'auxina sintetica, Acido-2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) (Duchefa biochemie), è stata preparata sciogliendo la polvere in dimetilsolfossido (DMSO) (Sigma Aldrich). Tutte le operazioni di manipolazione del materiale vegetale sterilizzato, i trattamenti, i campionamenti dei terreni di coltura, la preparazione dei regolatori di crescita, e le soluzioni di tossine sono state eseguite in ambiente asettico grazie all'impiego di cappe a flusso laminare previa sterilizzazione di pinze e bisturi per mezzo di fiamma Bunsen.

3.1 Materiale vegetale utilizzate nello studio

- grani pigmentati (*Triticum aestivum*, L.) e grani perennanti (Tabella 6): provenienti da campi sperimentali di Cigliano in provincia di Vercelli (Italia).

Tabella 6 Genotipo e pedigree di grani perennanti

Genotipo	Pedigree
Kernza	<i>Thinopyrum elongatum</i>
235A	<i>Th. elongatum</i> / <i>T. aestivum</i> // <i>T. aestivum</i> (WSU)
11955	<i>Triticum</i> spp./ <i>Thinopyrum</i> spp. (USA)
OK72	<i>T. aestivum</i> / <i>Th. ponticum</i> (USA)
20238	<i>T. turgidum</i> / <i>Th. elongatum</i>

- granella di *Zea Mays*, L.: varietà “Belgrano” sono stati acquistati presso LG Seeds.
- sospensioni cellulari di *V. vinifera* cv. Gamay Frechau e semi di Loureiro sono stati forniti dal Dipartimento di Agrochimica e Biochimica dell'Università di Alicante

3.2 Terreni di crescita e condizioni di allevamento delle piante

Per quanto riguarda le prove condotte *in vitro*, sono state impiegate variazioni del terreno standard Murashige & Skoog, "MS" (Duchefa biochemie) (Tabella 7). In particolare, come substrato di semina in sterilità, si è utilizzato un terreno contenente $\frac{1}{4}$ dei Sali MS, solidificato mediante l'aggiunta di Phytoagar (Duchefa biochemie) (0,8% p/v) definito "AT" (Tabella 8). Il terreno MS, a seconda del tipo di colture, è stato impiegato in forma liquida (crescita di piante) oppure in forma solida (crescita colture di calli); in questo caso è stato addizionato di Phytoagar (0,8% p/v) prima della sterilizzazione in autoclave.

Per la coltura di *Vitis Vinifera* e il substrato sperimentale è stato utilizzato terreno Gamborg B5 (Tabella 9).

Tabella 7 Composizione terreno MS

COMPOSIZIONE TERRENO MS			
MICROELEMENTI SALI MS		MACROELEMENTI SALI MS	
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025 mg/L	CaCl ₂	332,02 mg/L
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025 mg/L	KH ₂ PO ₄	170,00 mg/L
FeNa EDTA	36,70 mg/L	KNO ₃	1900,00 mg/L
H ₃ BO ₃	6,20 mg/L	MgSO ₄	180,54 mg/L
KI	0,83 mg/L	NH ₄ NO ₃	1650 mg/L
MnSO ₄ * H ₂ O	16,90 mg/L	VITAMINE	
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25 mg/L		Glicina 2,00 mg/L
SACCAROSIO	30 g/L		Myo-Inositolo 100,00 mg/L
(AGAR	0.8%)		Acido nicotinico 0,50 mg/L
pH	5.8		Piridossina HCl 0,50 mg/L
			Tiamina HCl 0,10 mg/L

Tabella 8 Composizione terreno AT

COMPOSIZIONE TERRENO AT	
$\frac{1}{4}$ sali MS	
AGAR	0.8%
pH	5.8

Tabella 9 Composizione terreno Gamborg B5 (Sigma)

COMPOSIZIONE TERRENO GAMBORG B5	
MICROELEMENTI SALI	MACROELEMENTI SALI
CoCl ₂ * 6H ₂ O 0,025 mg/L	CaCl ₂ 113,23 mg/L
CuSO ₄ * 5H ₂ O 0,025 mg/L	KNO ₃ 2500 mg/L
FeNa EDTA 36,70 mg/L	KNO ₃ 1900,00 mg/L
H ₃ BO ₃ 3.00 mg/L	MgSO ₄ 121,56 mg/L
KI 0,75 mg/L	NaH ₂ PO ₄ 130,44 mg/L
MnSO ₄ * H ₂ O 10.00 mg/L	250 mg/L idrolizzato enzimatico di caseina; 0,1 mg/L acido α-napthaleneacetico (NAA); 0,2 mg/L cinetina
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O 0,25 mg/L	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O 2.00 mg/L	
SACCAROSIO 30 g/L	
pH 5,7	

3.3 Preparazione delle soluzioni di tossine

Negli esperimenti condotti con micotossine (aflatossina B₁, AFB₁; deossinivalenolo, DON; tossina T₂, T₂; ocratossina A, OTA; zearalenone, ZEN), sono state preparate opportune soluzioni acquose: per le prove condotte in sterilità, il solvente era rappresentato da terreno MS in forma liquida. Per i saggi condotti *in vivo*, le stesse sostanze sono state disciolte in acqua distillata. Tali soluzioni sono state sterilizzate mediante filtri monouso di Polietersulfone (diametro dei pori pari a 0.22 µm).

Ogni soluzione è stata preparata sciogliendo 100 µg di tossina in 50 mL di solvente opportuno e nel contesto si è proceduto alla filtrazione sterilizzante. Durante tale operazione, venivano aggiunte quantità adeguate di dimetilsolfossido (DMSO) in modo che la concentrazione finale nel medium non superasse quella considerata tossica per la crescita vegetale (0.2%).

3.4 Sterilizzazione delle cariossidi

Al fine di ottenere materiale vegetale privo di agenti biologici indesiderati (batteri e funghi), le cariossidi sono state sottoposte a protocolli di decontaminazione. È stato eseguito un primo lavaggio con etanolo (EtOH) 70%, per un tempo di 5 min. L'etanolo è stato sostituito con una soluzione di ipoclorito di sodio (NaClO) 1,5%; al fine di migliorare la penetrazione dell'agente disinfettante, i semi immersi in tale soluzione sono stati sottoposti a vuoto per 40 min.

Dopo avere eliminato l'ipoclorito di sodio, sono stati eseguiti 3 lavaggi con acqua distillata sterile, ed i semi sono stati lasciati germinare su terreno AT in contenitori di vetro trasparenti sterili in camera di crescita con condizioni controllate: 25° ± 1°C con un fotoperiodo di 16 ore ad un'intensità luminosa di 27 µmol m⁻² s⁻¹.

3.5 Esperimenti con grani di varietà pigmentate

Per determinare se la capacità di detossificazione di micotossine da parte delle piante, fosse correlata con il differenziamento in organi, si sono condotti esperimenti in parallelo tra piante completamente formate e sospensioni di cellule indifferenziate.

In questa serie di prove si sono utilizzate alcune varietà di grano caratterizzate da una biosintesi di antociani molto evidente, in particolare nei tegumenti delle cariossidi. Per questo motivo, tali varietà vengono comunemente indicate come “grani pigmentati” (Figura 9).



Figura 9 Granelle di grani pigmentati

Come trattamento comune (piante o cellule) si è optato per la tossina DON; il parametro che fornisce il grado di efficienza nella biotrasformazione è il rapporto tra la sua forma originaria (DON) e la principale forma modificata (D3G). Come controllo varietale, si sono scelte due varietà non pigmentate: Bologna e Bagou (Tabella 10).

Tabella 10 Varietà utilizzate di grani pigmentati

Varietà di grani commerciali	Varietà di grani pigmentati	“colore”
Bologna	Aubusson	Rosso
Bagou	Ceraso	Viola
	KM 106-18	Viola
	Merlot	Viola
	Rosso	Viola
	Skorpion	Blu
	KM 72-18	Blu
	KM 15-17	Nero
	KM 98-18	Nero

3.5.1 *Trattamento con DON su piante in vitro*

Piante cresciute da semi decontaminati, dopo 7-10 giorni dalla germinazione, vengono private del seme ma non delle radici. Questi espianti sono inseriti in appositi supporti di materiale plastico, all'interno di vasi da coltura; l'utilizzo di questi supporti è stato necessario in quanto le piante sono state lasciate crescere e sviluppare in terreno liquido MS. Quando l'apparato radicale risulta ben sviluppato, dopo circa due settimane, il terreno liquido viene sostituito con la soluzione contenente deossinivalenolo (DON).

Per verificare l'effettivo assorbimento della tossina da parte dell'apparato radicale, si sono eseguiti campionamenti di terreno ad intervalli specifici: tempo 0 (prima che la soluzione contenente il DON entrasse in contatto con la pianta), dopo 24 ore, 7 giorni ed alla fine dell'esperimento, 14 giorni. Al termine delle prove, il materiale vegetale (suddiviso in radici e foglie) è stato congelato (-20 °C) e mantenuto tale fino alle analisi.

3.5.2 *Trattamento con DON su cellule indifferenziate (sospensioni cellulari)*

Al fine di poter avviare colture di cellule vegetali in sospensione, è stata allestita una collezione di "calli" per ciascuna delle varietà considerate. Semi maturi di grano sono stati sterilizzati e l'embrione di ciascuno è stato tagliato mediante bisturi, al fine di non permettere lo sviluppo corretto della pianta. I semi sono stati adagiati su terreno MS addizionato con 2,4-D alla concentrazione di 10 μ M, all'interno di capsule di Petri. Queste sono state poste al buio in cella climatica. Trascorse due/tre settimane, dai resti di embrione, si è formata una massa di cellule indifferenziata (callo) che è stata trasferita su nuovo terreno, a pari condizioni, al fine di permettere un incremento di biomassa.

Per avviare le sospensioni cellulari, circa 2 grammi di callo friabile, sono stati inoculati in beute contenenti in 50 mL di terreno MS liquido addizionato a 10 μ M di 2,4-D e lasciati al buio in agitazione a 60 rpm. Settimanalmente viene aggiunto circa 1/3 del volume di nuovo terreno MS liquido con 10 μ M 2,4-D. Questa coltura viene protratta fino ad ottenere un volume finale di 200 mL ed una densità di popolazione cellulare di circa 200-250.000 cellule per mL.

A questo punto la sospensione cellulare era pronta per il trattamento con la micotossina: ad essa venivano addizionati 50 mL di soluzione (MS + 10 μ M 2,4-D) contenente la tossina DON.

Anche in questo caso venivano eseguiti campionamenti di terreno volti a verificare l'assorbimento di DON da parte delle cellule. Il campionamento a tempo 0 avviene direttamente

dalla soluzione contenente la tossina prima che questa entri in contatto con la sospensione cellulare.

Attesi 5 minuti dall'inoculo della tossina viene prelevata un'aliquota (1 mL) di sospensione cellulare e centrifugata per 10 minuti a 10000 x g per separare le cellule dal terreno, la porzione liquida verrà raccolta e rappresenterà il campionamento al tempo 0'.

La sospensione viene mantenuta al buio ed in agitazione ed il campionato del terreno di coltura è stato eseguito dopo 24 ore, 7 giorni e 14 giorni.

Al termine dell'esperimento l'intera sospensione viene centrifugata (12000 x g), congelata e mantenuta a -20 °C fino ad analisi.

3.6 Esperimento con grani di varietà perennanti

Per comprendere se varietà di grani perennanti avessero capacità diverse di detossificazione rispetto ai grani comunemente coltivati e commercializzati, si è allestito un esperimento per confrontare il metabolismo di cinque grani di questo cluster (Tabella 11) rispetto alla varietà Bologna.

Tabella 11 Varietà utilizzate di grani perennanti

Varietà di controllo	Varietà perenni
Bologna	OK72
	20238
	235A
	11955
	Kernza

Per valutare potenziali differenze nella capacità di biotrasformazione tra le diverse varietà, è stato selezionato come parametro chiave il rapporto tra DON e 3-glucoside (D3G). Questo rapporto è stato misurato dopo l'esposizione delle piante al deossinivalenolo, consentendo di quantificare l'efficienza del processo di biotrasformazione.

Per quanto riguarda il protocollo di sterilizzazione, sviluppo sperimentale e campionamento, si faccia riferimento a quanto descritto precedentemente nella sezione 3.4.

3.7 Studio sulla mobilità di micotossine nei sistemi vegetali

L'evidenza che le piante di cereali siano in grado di assorbire e trasportare le tossine disciolte nel terreno di crescita è stata chiaramente dimostrata in diverse specie, tra cui grano e mais (Righetti et al., 2020; 2021). Tuttavia, queste informazioni sollevano diversi quesiti riguardo ai meccanismi ed alle modalità con cui le tossine si muovono all'interno dei tessuti vegetali. Per comprendere meglio questi processi ed identificare i percorsi delle tossine una volta che sono penetrate nella pianta, sono stati allestiti due set sperimentali specificatamente progettati per indagare questi fenomeni. Questi esperimenti hanno il fine di fornire informazioni più dettagliate sul movimento delle tossine nei diversi compartimenti vegetali.

Per entrambi gli esperimenti, è stata fatta la scelta di saggiare quattro tossine specifiche: aflatossina B1, deossinivalenolo, zearalenone e tossina T2. La selezione di queste tossine si è basata su diversi criteri. Il primo, di natura ecologica, riguarda il fatto che tutte queste tossine sono prodotte da funghi patogeni che infettano naturalmente i cereali, rappresentando quindi una minaccia comune nelle colture agricole. Gli altri due criteri adottati sono di natura chimica. In primo luogo, è stato considerato il coefficiente di ripartizione tra ottanolo e acqua (K_{ow}), un parametro fondamentale che indica la solubilità della molecola in acqua e, di conseguenza, la loro capacità di attraversare le membrane biologiche e diffondersi nei tessuti vegetali. In secondo luogo, si è valutata il peso molecolare di ciascuna tossina, poiché le dimensioni molecolari possono influenzare il trasporto attraverso le barriere cellulari e il comportamento all'interno dei compartimenti della pianta. Questi criteri chimici (Tabella 12) sono essenziali per comprendere meglio non solo il potenziale di assorbimento delle tossine da parte delle piante, ma anche il loro successivo movimento e accumulo nei tessuti vegetali.

Tabella 12 Caratteristiche chimico-fisiche delle tossine scelte

Tossina	Aflatossina B1 (AFB ₁)	Deossinivalenolo (DON)	Zearalenone (ZEN)	Tossina T2 (T2)
Log Kow	1,23	-0,7	3,6	0,9
Peso molecolare	312,27	296,31	318,37	466,52

3.7.1 *Esperimento di somministrazione fogliare*

In questo primo set sperimentale, si è scelto di inoculare la tossina direttamente a livello fogliare con l'obiettivo principale di determinare se essa fosse effettivamente in grado di penetrare all'interno dei tessuti. Un ulteriore obiettivo era verificare se, una volta assorbita, la tossina potesse muoversi attraverso i vari compartimenti della pianta, seguendo potenziali vie di trasporto come il sistema vascolare o si muovesse per diffusione (ad esempio, nell'apoplasto). Comprendere questi aspetti è cruciale per chiarire i meccanismi di assorbimento e traslocazione delle tossine all'interno della pianta.

I semi di mais della varietà Belgrano sono stati sterilizzati applicando la metodologia precedentemente illustrata. La granella, dopo essere stata risciacquata per 3 volte con acqua, è stata seminata singolarmente in vasi da 0,5 L contenenti terriccio commerciale sterile e mantenuto umido per tutta la durata dell'esperimento e posto in cella climatica. Trascorse tre settimane, si sono sviluppate piante con tre foglie ben formate.

Il trattamento è stato eseguito sulla seconda foglia.

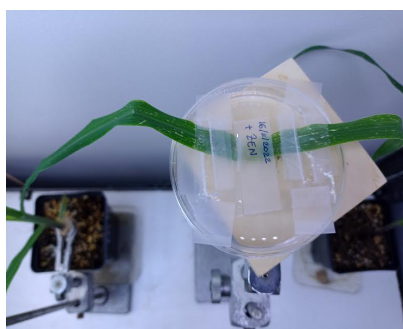


Figura 10 Foglia trattata

Per la preparazione della foglia: un guanto in lattice bagnato con acqua distillata è stato utilizzato per tamponare ripetutamente una sezione mediana della foglia, per un'area di circa 2 cm.

Si è proceduto alla rimozione della cuticola e delle cere da entrambe le superfici della foglia utilizzando carta vetrata (grana 600) (Campbell e McInnes, 1999). La foglia trattata viene quindi inserita in una piastra di Petri opportunamente preparata: sul coperchio della piastra vengono effettuati due tagli in modo che solo la sezione di 2 cm della foglia scarificata rimanga all'interno della piastra (Figura 10), che contiene la soluzione di tossina scelta (AFB₁, DON, ZEN, T2).

Il campionamento della soluzione contenente la tossina viene eseguito prima che questa entri in contatto con la foglia (tempo 0), dopo 24h, dopo 7 giorni ed al quattordicesimo giorno.

Al termine dell'esperimento (14 giorni) viene raccolto il materiale vegetale suddiviso in: foglia trattata, foglia distale (la foglia opposta a quella trattata) e radici (dopo averle lavate dal terriccio). I campioni vengono congelati fino allo svolgimento delle analisi.

3.7.2 Esperimento di somministrazione radicale, “split-root”

Nel secondo esperimento, la tossina è stata somministrata esclusivamente su una porzione del sistema radicale, precedentemente diviso in due parti e mantenuto separato per tutta la durata dell'esperimento. L'ipotesi di partenza era duplice: da un lato, si intendeva confermare che la tossina potesse essere assorbita dalle radici esposte, e dall'altro, verificare se la tossina fosse in grado di raggiungere la porzione di radice non esposta. Questo approccio sperimentale mira non solo a fornire evidenze sull'assorbimento e sul trasporto della tossina all'interno del sistema radicale, ma anche a sollevare nuove ipotesi riguardanti i meccanismi di traslocazione della tossina all'interno della pianta. I risultati ottenuti potrebbero offrire spunti per ulteriori studi su come le tossine si muovono nei tessuti vegetali e attraverso quali vie di trasporto si diffondono.



Figura 11 Esperimento di split-root

I semi di mais (varietà Belgrano) sono stati sterilizzati seguendo la procedura descritta in precedenza e successivamente posti a germinare in un vaso di vetro sterile contenente terreno solido AT.

Dopo circa dieci giorni le piantine sono state trasferite nel sistema destinato al trattamento per garantire uno sviluppo adeguato: l'apparato radicale delle piantine è stato diviso in due porzioni, ciascuna delle quali è stata inserita all'interno di un tubo di vetro sterile, con volume noto, riempito con una soluzione liquida contenente $\frac{1}{4}$ dei sali di Murashige&Skoog (MS).

Il fusto della pianta veniva fissato ad un supporto meccanico sovrastante, al fine di mantenere la corretta polarità del vegetale. I tubi sono stati sigillati con parafilm e la soluzione è stata aggiunta ogni due giorni al fine di evitare il disseccamento delle radici.

Quando l'apparato radicale risulta ben sviluppato e omogeneo in entrambi i tubi (Figura 11), si procede con il trattamento. Il terreno liquido è stato rimosso da entrambi i tubi e sostituito. Il tubo designato come “donatore” (D) viene riempito con la soluzione, portata a volume finale, di

tossina di interesse (AFB₁, DON, ZEN, T2), alla concentrazione di 100 µg/50 mL, mentre il tubo designato come “ricevente” (R) viene riempito con terreno ¼ MS.

Il campionamento veniva effettuato prima che le soluzioni venissero a contatto con la porzione di radice (tempo 0-D, tempo 0-R), dopo 24 ore, 7 giorni ed a conclusione dell’esperimento, dopo 14 giorni. Al termine dell’esperimento venivano raccolte le radici contenute nelle due provette, “D” ed “R” e le foglie. Il materiale vegetale è quindi stato congelato e mantenuto a – 20°C fino alle analisi.

3.8 Esperimento per la valutazione degli essudati radicali

L’esperimento è stato progettato con l’obiettivo di indagare se l’esposizione delle piante alle sole tossine possa essere sufficiente a stimolare una risposta sistemica acquisita (SAR). Questa risposta è un meccanismo di difesa attivato dalle piante quando sono esposte a condizioni di stress, come la presenza di agenti patogeni o sostanze tossiche. In particolare, si vuole comprendere se il contatto diretto con le tossine possa innescare una serie di segnali molecolari e biochimici che promuovono la resistenza non solo a livello locale (nel punto di esposizione), ma anche in altre parti della pianta non esposte direttamente allo stress. Il fine ultimo è verificare se questo stimolo specifico sia in grado di potenziare le difese “immunitarie” della pianta in modo sistemico, contribuendo a una maggiore resistenza a vari tipi di stress.

Partendo da una collezione di una varietà di grano micropropagata, Svevo, le piante (4 per vaso) sono state lasciate radicare all’interno di vasi di vetro sterili, fissate a un supporto sterile che garantisse il loro corretto sviluppo in terreno liquido Murashige e Skoog (MS). Durante la fase di crescita, il terreno liquido è stato sostituito ogni tre settimane per mantenere condizioni ottimali. Al momento del trattamento, il terreno liquido MS è stato sostituito con una soluzione contenente deossinivalenolo (DON) alla concentrazione di 100 µg/100 mL. È stata prestata particolare attenzione affinché le foglie non entrassero mai in contatto diretto con la tossina, evitando possibili interferenze nel trattamento.

I campionamenti del medium sono stati effettuati in quattro tempi: al tempo 0, cioè prima che la tossina entrasse in contatto con le radici, dopo 24 ore, a 7 giorni e al termine dell’esperimento, al quattordicesimo giorno. Alla fine delle prove, è stato raccolto il materiale vegetale, suddiviso tra radici e foglie. Tutti i campioni sono stati immediatamente congelati per la successiva analisi.

3.9 Valutazione della risposta metabolica di piante di mais trattate con AFB₁

Piante cresciute da semi sterili, dopo 7 giorni dalla germinazione, sono state private del seme ma non delle radici. Questi espianti sono stati inseriti in appositi supporti di materiale plastico sterile per essere coltivate in terreno liquido. Quando l'apparato radicale è risultato adeguatamente sviluppato (7 giorni) si è proceduto al trattamento: il terreno di coltura è stato sostituito con la soluzione di AFB₁ e il trattamento è stato mantenuto per un periodo di 14 giorni. Le piante di controllo sono state coltivate allo stesso modo, ma mantenute in terreno liquido MS per tutta la durata dell'esperimento.

Sono stati eseguiti campionamenti dei medium ad intervalli temporali specifici: al tempo 0 (prima del contatto tra la soluzione di AFB₁ e la pianta), dopo 24 ore, dopo 7 giorni ed al termine dell'esperimento (14 giorni). Al completamento delle prove sperimentali, il materiale vegetale, suddiviso in radici e foglie, è stato immediatamente congelato a -80 °C e mantenuto a tale temperatura fino alle successive analisi.

3.9.1 *Analisi bidimensionale del profilo elettroforetico (2D-E)*

Estrazione: circa 150/200 mg di materiale vegetale provenienti da foglie e radici di mais trattate con AFB₁ sono stati congelati in N₂ liquido e successivamente polverizzati con micropestello direttamente in Eppendorf; ad ogni campione sono stati aggiunti 300 µL di Extraction Buffer (Tabella 13) così composto:

Tabella 13 Buffer di estrazione

Tris HCl	50 mM pH 7,5 80 mg
Urea	7 M 4,2 g
Tiourea	2 M 1,52 g
DTT 1%	100 mg
PVP 2%	200 mg
Triton X-100	200 µl
H ₂ O bidi	10 ml
β-mercaptoetanol	2µl/ml
PMSF 100 mM	40 µl/ml

I campioni sono stati poi centrifugati due volte per 20' a 13,000 rpm a 4 °C e il surnatante recuperato, trasferito in una Eppendorf per poi essere sottoposto immediatamente ad analisi.

Precipitazione: gli estratti sono stati precipitati aggiungendo 100 µL di TCA 45% ogni 300 µL di campione di partenza. Dopo averli sottoposti al vortex per 15'' ognuno e incubati in ghiaccio per 10', essi sono stati centrifugati per 15' a 13,000 rpm a 4 °C; dopo almeno 3 lavaggi con 200 µL di acetone freddo (-20 °C) alternati a incubazioni di 15' a -20°C, i pellet sono stati portati a secco in SpeedVac e reidratati con 70 µL Rehydration Buffer (urea 8 M + CHAPS 2% + DTT). Solo questo punto si è proceduto alla determinazione della concentrazione proteica totale mediante metodo Bradford (Bradford, 1976).

Isoelettrofocusing (IEF): in questo lavoro sono state utilizzate strips lineari Bio-Rad ReadyStrip® IPG (pH 3-10 e pH 5-8) da 7 cm, sulle quali è consigliato il caricamento di 120 µg di proteine totali. In un volume totale di 125 µL/strip sono stati aggiunti al volume di estratto 1.25 µl di anfoliti 100x (pH 3-10; Bio-Rad), 1 µL di tracciante LB (Laemmli) e portato a volume con Rehydration Buffer. La reidratazione passiva delle strip è stata condotta a 20 °C. La prima dimensione (isoelettrofocusing) è stata condotta (Bio-Rad PROTEAN® IEF CELL) secondo il protocollo suggerito dal produttore per il tipo di strips utilizzate (50 µA/strip fino a 14000 V/h). Al termine del focusing,

gli strip sono stati incubati in agitazione per 10' in 2.5 mL di Equilibration Buffer 1 (Urea 6 M, Tris HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 2%, glicerolo 20%; DTT 2%) e successivamente per 10' in 2.5 ml di Equilibration Buffer 2 (Equilibration Buffer + iodoacetamide 2.5 %) per un trattamento di riduzione/alchilazione delle proteine.

Corsa elettroforetica e colorazione: al termine di questa fase le strip sono state caricate sul lato superiore di gel denaturanti di poliacrilamide al 12% (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad) e fissate al gel con 1 ml di una soluzione di agarosio 0.5% e tracciante blu. La corsa è stata condotta per 30' a 200 V in una Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad), in cui la cella interna contiene Laemmli Buffer 2X e la cella esterna Laemmli Buffer 1X.

Al termine della corsa i gel sono stati smontati e processati per la colorazione con un fluorescente secondo protocollo Bio-Rad: dopo 2 lavaggi da 30' ciascuno in Fixing Solution (MetOH 50% + CH₃COOH 7%) i gel sono stati incubati per 4-5 h con SYPRO®Ruby Protein Stain (Bio-Rad) e lavati per 30' in Washing Solution (MetOH 10% + CH₃COOH 7%); dopo un breve lavaggio in H₂O ultrapura i gel sono stati acquisiti con Molecular Imager® VersaDoc™ (Bio-Rad).

Elaborazione delle immagini per l'identificazione di spot differenzialmente espressi: una volta acquisite le immagini in fluorescenza dei gel 2D, l'elaborazione degli spot differenziali è stata condotta tramite PDQuest™ Advanced software (Bio-Rad) versione 8.0.1. La normalizzazione volumetrica degli spot è stata ottenuta secondo "total quantity in valid spots"; il confronto è stato condotto su 4 repliche (4 gel) per campione, considerando significative variazioni di volume tra spot identici di almeno 2 volte rispetto alla condizione di riferimento (controllo), e solo per gli spot presenti in almeno 2 delle 3 repliche. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il t-test di Student ($p \leq 0.05$). Il totale degli spot differenziali è stato dunque ottenuto dall'intersezione booleana tra la categoria degli spot significativamente più/meno abbondanti e la categoria degli spot statisticamente differenti. Una volta individuati gli spot differenzialmente espressi si è proceduto alla costruzione di una mappa per il recupero degli stessi.

Colorazione con Coomassie Blue Staining e identificazione delle specie proteiche differenziali: per procedere al recupero degli spot differenziali, i gel sono stati ricolorati con Coomassie Blu dopo un lavaggio di 30 min in Washing Solution (MetOH 10% + CH₃COOH 7%) e un risciacquo con H₂O bidistillata, La colorazione è stata condotta in agitazione overnight in Coomassie Blu Staining (115

mg di Coomassie Blue R-250 in 100 ml di soluzione 30% MetOH + 10% CH₃COOH). Al termine dell'incubazione, i gel sono stati trasferiti in una soluzione di destaining (30% MetOH + 10% CH₃COOH) e lasciati in agitazione il tempo necessario affinché la decolorazione portasse ad un contrasto soddisfacente.

Gli spot identificati sono stati recuperati manualmente e inviati a York per l'identificazione delle specie proteiche.

Una volta recuperati manualmente gli spot (in triplicato), i campioni sono stati inviati al BTF-MAPLab dell'Università di York per l'identificazione delle specie proteiche, che è stata ottenuta tramite MALDI-MS/MS.

3.9.2 *Determinazione dell'attività antiossidante di scavenging (DPPH)*

Per la determinazione dell'attività antiossidante degli estratti è stato utilizzato il saggio del DPPH (Brand-Williams et al., 1995). È stata preparata una soluzione 1 mM di DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) usando come solvente MeOH 100% e lasciata al buio a RT per 4 ore.

In breve: 150-200 mg di tessuto fresco fogliare o radicale sono stati omogenati in mortaio con 2 mL di metanolo (MeOH) 70%. L'omogenato è stato trasferito in provette da 2 mL e centrifugato a 14000 rpm per 10 min a 4°C; il supernatante è stato recuperato e utilizzato per i saggi successivi.

Ad un volume di estratto di 50 µL sono stati aggiunti 700 µL di MeOH 70% e 250 µL di DPPH; i campioni sono stati quindi incubati al buio a RT per 30 min., al termine dei quali è stata misurata l'assorbanza del DPPH alla lunghezza d'onda a 517 nm.

La preparazione della curva di calibrazione è stata preparata utilizzando una soluzione madre di acido ascorbico in MeOH 70%, alla concentrazione di 10 mM.

L'attività di scavenging degli estratti è stata poi calcolata come percentuale di inattivazione del DPPH, secondo la formula:

$$I\% = ((A_{517} \text{ DPPH} - A) / A \text{ DPPH}) * 100$$

3.9.3 *Determinazione del contenuto di polifenoli*

Per la quantificazione dei polifenoli totali è stato seguito il metodo di Folin-Ciocalteu (Dewanto, 2002). In breve: ad un volume di 50 μL di estratto metanolico di radici e foglie (3.10.2) sono stati aggiunti 75 μL di MeOH 70% e 125 μL di reattivo di Folin-Ciocalteu. Dopo un'incubazione a RT di 5-6 min, ad ogni campione sono stati aggiunti 1.25 mL di NaHCO_3 7% (w/v). La reazione è stata condotta in bagnetto termostato a 40 °C per 30 min. L'assorbanza dei campioni è stata misurata alla lunghezza d'onda di 765 nm.

Per la preparazione della curva di calibrazione è stata utilizzata una soluzione madre di acido gallico in MeOH 70%, alla concentrazione di 6 mg/mL.

La concentrazione di polifenoli totali, espressa come equivalenti di acido gallico (GAE), è stata infine espressa come mg Eq. di Ac Gallico su grammi di peso fresco.

3.9.4 *Determinazione del contenuto di flavonoidi*

Per la quantificazione dei flavonoidi totali è stato seguito il metodo di Cesar, 2017. In breve: a un volume specifico di estratto metanolico di foglie e radici (vedi punto 3.10.2.1) (massimo 250 μL) vengono aggiunti 75 μL di NaNO_2 (5% w/v), 75 μL di AlCl_3 (10% w/v) e 500 μL di NaOH (1 M), e successivamente la miscela viene incubata al buio a RT per 15 min. La lettura dell'assorbanza specifica viene effettuata a 510 nm.

La curva di calibrazione è stata costruita a partire da una soluzione madre di catechina (Sigma Aldrich, CAS 1251) alla concentrazione di 10 mg/mL in MeOH 100%.

Nel saggio sono stati utilizzati 50 μL degli stessi estratti metanolici da foglia e radice utilizzati nel saggio del DPPH e descritti precedentemente.

La concentrazione di flavonoidi è stata espressa come mg Eq. catechina su grammi di peso fresco.

3.10 Valutazione della risposta in *Vitis vinifera* alla presenza di *A. carbonarius* e OTA

Il ceppo *A. carbonarius*, (num.01.08, Figura 12), ci è stato fornito dal Centro di Ingegneria Biologica dell'Università di Minho ed è stato conservato in piastre Petri con Potato dextrose agar (PDA) (MP Biomedicals), al buio a temperatura ambiente e trasferito ogni 7-10 giorni. Le spore sono state raccolte mezzo di un'ansa e conservate a -20°C fino all'utilizzo.

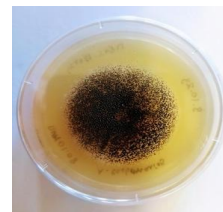


Figura 12 *Aspergillus carbonarius*

3.10.1 Esperimento su foglie intere di *Vitis* cv. Loureiro

Foglie di vite della varietà Loureiro (una cultivar di uva bianca coltivata nel nord-ovest della penisola iberica, tra Galizia, Spagna e Minho, Portogallo) ottenute da piante micropropagate sono state trattate sia con spore di *A. carbonarius* che con OTA.

Le foglie trattate sono state collocate su piastre Petri contenenti acqua distillata sterile solidificata con agar 0.8%, e sulla loro superficie, in diversi punti, sono stati inoculati 5 μ L di una soluzione di OTA (4,95 μ M) o di una sospensione di spore di *A. carbonarius* (Figura 13).

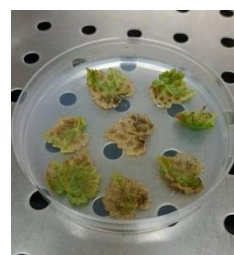


Figura 13 Trattamento su foglie con spore di *A. carbonarius*

Il controllo è stato eseguito allo stesso modo utilizzando una soluzione di acqua distillata sterile e DMSO (6 μ L).

Per ciascuna condizione sperimentale sono state preparate 10 piastre, contenenti da 5 a 8 foglie ciascuna, a seconda delle loro dimensioni. Il campionamento è avvenuto a 72 ore. I campioni sono stati successivamente sottoposti a Real-Time PCR per l'analisi dell'espressione genica.

3.10.2 Esperimento su sospensioni cellulari di *Vitis* cv. Gamay Frechau

Sospensioni cellulari di Gamay Frechau (un vitigno a bacca nera originario della Borgogna) sono state ottenute e fornite dal Dipartimento di Agrochimica e Biochimica dell'Università di Alicante. Mantenate in terreno Gamborg B5 (Tabella 3), al raggiungimento di una densità di circa 200.000 cellule/mL di sospensione è stato avviato l'esperimento. Le beute sono state suddivise in tre

gruppi, contenente ognuna 20 mL di sospensione cellulare: tre sono state trattate con OTA, tre con *A. carbonarius* (Figura 14) e le restanti tre sono state utilizzate come controllo.

OTA:

beute trattate con 400 μ L di tossina [4,95 μ M]

Aspergillus carbonarius:

beute con 20 μ L di sospensione con concentrazione di spore pari a $3,78 \times 10^6$ per mL + 400 μ L di acqua + 6 μ L di DMSO



Figura 14 Sospensioni cellulari trattate con spore di *Asp. carbonarius*

Controllo:

beute con + 400 μ L di acqua + 6 μ L di DMSO

Il campionamento delle cellule per le successive analisi di espressione genica è avvenuto dopo 72 ore di trattamento, per mezzo di filtrazione mediante vuoto.

3.10.3 Estrazione dell'RNA totale

Il materiale vegetale è stato finemente polverizzato in azoto liquido, in un mortaio. Dopo l'aggiunta di 1 mL di buffer di estrazione (300 mM Tris HCl, pH 8.0; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% CTAB; 2% PVPP; 0.05% spermitotia tricloruro e, appena prima dell'uso, 2% β -mercaptoetanolo) preriscaldato a 60 °C. Dopo il trasferimento in microprovette, sono stati aggiunti 20 μ L di DTT (2M), i campioni sono stati incubati a 60 °C per 10 minuti, mescolando occasionalmente, dopo di che è stato aggiunto 1 mL di una miscela di cloroformio:alcol isoamilico (24:1). Dopo centrifugazione per 15 min a 3500 x g è stato recuperato il supernatante, a cui è stato nuovamente aggiunto 1 mL di miscela cloroformio:alcol isoamilico (24:1), seguito da agitazione e centrifuga a 3500 x g.

Il surnatante è stato prelevato e addizionato con una quantità di NaOAc 3M (pH 5.2) pari al 10% del volume del campione, e isopropanolo pari al 60% del volume. L'RNA è stato dunque precipitato a -80°C per 30 minuti e recuperato mediante centrifugazione a 3.500 x g per 30 minuti a 4 °C.

È stata infine condotta una purificazione in colonna attraverso RNasi Plant Mini Kit (Qiagen). Dopo l'isolamento e la verifica della purezza dell'RNA, i campioni sono stati trattati con DNasi I (Qiagen) ed il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale usando il kit Xpert cDNA Syntesis Master-mix (GRISP).

3.10.4 Analisi dell'espressione genica mediante Real-Time PCR

Il profilo di espressione è stato valutato per i geni target riportati in tabella 7 tramite qPCR.

L'amplificazione è stata condotta con Xpert Fast SYBR Blue (GRISP) in 10 µL finali della seguente miscela di reazione: seguendo le indicazioni del produttore. Il livello di espressione è stato ottenuto con il metodo del deltadelta CT; i risultati sono stati riportati come fold change.

Come gene housekeeping è stato utilizzato VvACT1 (actina), particolarmente adeguato ai fini della normalizzazione dell'espressione genica nelle analisi qPCR in vite (Reid, 2006).

La stabilità dei geni di riferimento è stata confermata dall'analisi automatica del valore M eseguita dal software Bio-Rad® CFX Manager 2.0. Per ciascun gene (Tabella 14), i valori di espressione genica relativa sono stati ottenuti in seguito al calcolo effettuato dal software Bio-Rad® CFX Manager 2.0. Per ciascuno dei tre replicati biologici, dopo l'estrazione dell'RNA e la sintesi del cDNA, è stata eseguita un'analisi qPCR indipendente con tre replicati tecnici interni.

Tabella 14 Sequenze dei primers (Alphagene) utilizzati per l'analisi di espressione

Gene accession number	Gene name	Primer sequence	References
AF159122	VvPME1	F GGATACCAGGACACACTGT R CTTCATGGCTACCGAGGTA	Deytieux-Belleau et al. (2008); Martins et al. (2018)
AY043233	VvPG1	F GAATCAAGACATGGCAGG R TAATCCTAGCTTCCATGCA	Deytieux-Belleau et al. (2008), Martins et al. (2018)
AF305093.1	VvPGIP	F TGTGGTGACCTTCGTTCTC R ATCTGACCGGTGAGGTTAGAGAGC	Martins et al., 2021, a) e b)
AY137377	VvCHIT4c	F GGCGACGAATCCATTTATGTTA R CGGAACAAGGGTTTCATAATTC	Belhadj et al. (2008)
AY156047	VvPIN	F GCAGAAACCATTAAAGAGGGAGA R TCTATCCGATGGTAGGGACACT	Belhadj et al. (2008)
XM_002273752.3	VvPR1	F GGAGTCCATTAGCACTCCTTG R CATAATTCTGGCGTAGGCAG	Le Henanff et al. (2009)
XM_002278961	VvCesA3	F CGAGGGGAGGATACAACTACG R ATAGAAAGACGCTCGGGTGAAG	Fernandes et al. (2016)
XM_002283494	VvEXP6	F AGCGTAAAGGGTCGAAGACAG R CGATGTTCCAGGATGTTGATGT	Fernandes et al. (2016)
GSVIVT01010015001	qVvSWEET1	F GGATGCTCATCATGCTCTTCA R AAGCAGAGAGAAGGCAGTTGAG	Chong et al., 2014

GSVIVT01014088001	<i>qVvSWEET2a</i>	F CGTTCTCTGTTGTGCCAGTC R ACCAAGCAGTTTAGGAGAGCA	Chong et al., 2014
GSVIVT01032489001	<i>qVvSWEET4</i>	F GGCTCGGACTGTGATTGGTA R ACATGCAGTTCATCACTGTGG	Chong et al., 2014
GSVIVT01019601001	<i>qVvSWEET7</i>	F ACCGCAGTTGGCATCCTA R GCAAGGTAGGGAAGTGGTA	Chong et al., 2014
GSVIVT01008595001	<i>qVvSWEET10</i>	F CCATTACCATCCTTTGGTTT R GGGACGTGCATAGAAGCTACA	Chong et al., 2014
<i>qVvSWEET17a</i>	<i>GSVIVT01035138001</i>	F GGTGTTGGTGTGGTTGTTGAA R AGCTAGAAACCCACATCCAA	Chong et al., 2014
<i>qVvSWEET17d</i>	<i>GSVIVT01031170001</i>	F CTGGCGGCTTACTTGTCCT R AAAGCCAACATCCAATACGG	Chong et al., 2014
GSVIVT01009254001	<i>qVvSUC11</i>	F TGTGCCAATCTCAAGTCTGCC R CCTGGGCTGCTGTTATGCTT	Chong et al., 2014
GSVIVT01020031001	<i>qVvSUC12</i>	F ACCAGCTCACCATTATCAGAC R ATTTCATACTGCTCTCAGGGTTG	Chong et al., 2014
GSVIVT01000938001	<i>qVvSWEET15</i>	F GGCCAAGAAACAACTCTCAAA R GCCACTGAGAATGAAGCACAG	Chong et al., 2014
XM_002282480	<i>VvACT1</i>	F CTTGCATCCCTCAGCACCTT R TCCTGTGGACAATGGATGGA	Le Henanff et al. (2009)

3.11 Analisi

Le analisi relative agli esperimenti sui grani di varietà pigmentate e perennanti, sul movimento delle micotossine all'interno della pianta di mais e sugli essudati radicali sono state condotte presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco dell'Università di Parma, nello specifico per mezzo di UHPLC-HRMS e Vion IMS QTof.

Le analisi sul profilo di risposta metabolica di piante di mais trattate con AFB₁ sono state finanziate dalla Professoressa Chiara Dall'Asta del Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco dell'Università di Parma.

Le analisi relative all'espressione genica di *Vitis vinifera* inoculata con spore di *Asp. Carbonarius* e dalla relativa tossina (OTA), sono state eseguite presso il laboratorio di biologia molecolare vegetale presso l'Università di Minho.

3.12 Analisi statistica

In questa tesi vengono presentati diversi approcci sperimentali utili per lo screening varietale della risposta al trattamento di tossine. In alcuni casi verranno presentati dati preliminari sull'eventuale mobilità di micotossine all'interno del copro della pianta in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche delle molecole in oggetto di studio.

Per motivi indipendenti dalla candidata, non è stato possibile ottenere dati analitici relativi alle repliche degli esperimenti. Vengono quindi proposti gli approcci statistici, utilizzando i dati di repliche tecniche, necessari al completamento della discussione dei dati.

Le differenze statistiche nella capacità di detossificazione del deossinivalenolo, intesa come rapporto tra DON/D3G, sia per gli esperimenti condotti *in vitro* con piante e sospensioni cellulari di grani pigmentati, sia con piante di grani perennanti, sono state calcolate per mezzo di ANOVA ad una via, seguita dal test post hoc di Dunnett.

I dati sulla mobilità delle micotossine all'interno della pianta vengono presentati come dati preliminari qualitativi relativi alla presenza o assenza delle varie micotossine nei diversi organi delle piante trattate.

Le analisi relative al profilo antiossidante e fenolico di piante di mais trattate con AFB₁ presentavano due sole variabili: controllo e trattato. In questo caso per l'approccio statistico è stato eseguito un T-test.

Le analisi sono state effettuate con il software R (<https://www.r-project.org/>).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Esperimento con grani pigmentati

A causa del crescente interesse da parte sia di consumatori che dei produttori nei confronti di grani interessanti dal punto di vista nutraceutico, si è scelto di effettuare uno screening sul livello di detossificazione da parte di grani pigmentati.

I colori nei grafici rappresentano i cluster di appartenenza delle diverse varietà in base alla colorazione. I controlli, grani comunemente commercializzati, sono rappresentati in giallo.

Le piante coltivate *in vitro* sono state trattate con la stessa dose di DON, somministrato al terreno di coltura liquido (100 µg/100 mL) per una durata di 14 giorni. I dati relativi all'assorbimento della tossina da parte delle piante sono riportati in figura 15.

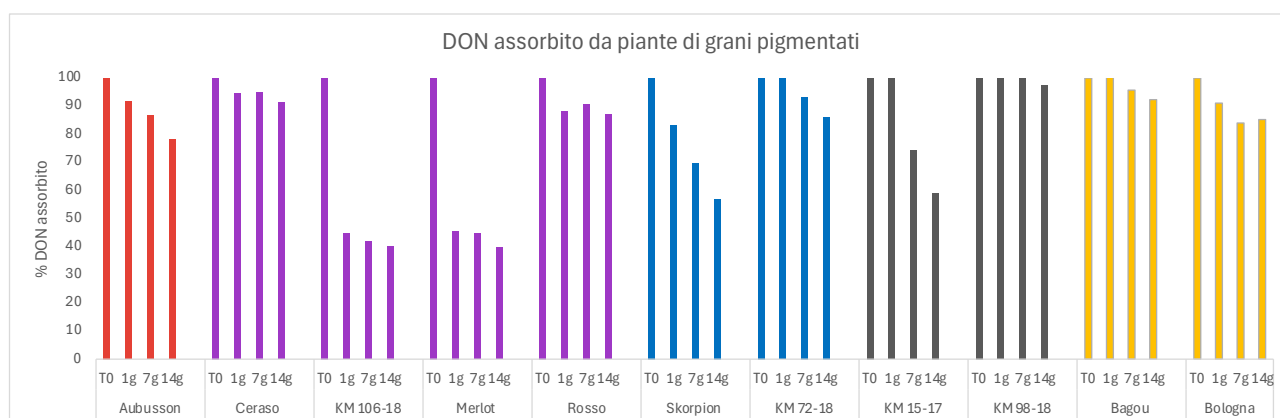


Figura 15 Assorbimento di DON nel tempo da parte di piante di grani pigmentati

Sebbene tendenzialmente tutte le varietà abbiano mostrato un assorbimento tempo-dipendente, sono state evidenziate alcune differenze imputabili alle diverse varietà. Ad esempio, l'assorbimento della tossina da parte di KM 98-18 (cluster nero) è risultato quasi nullo nel tempo. Al contrario, in varietà come KM 106-18 e Merlot (cluster viola) la metà della tossina presente nel medium era stata assorbita già dopo 1 giorno. Nonostante l'idea fosse intrigante, non è stato possibile, tuttavia, attribuire comportamenti simili di assorbimento sulla base della pigmentazione, poiché, tranne che per la varietà Aubusson, che era l'unico rappresentante del cluster rosso, ogni raggruppamento ha presentato sia varietà in cui la tossina veniva assorbita in modo molto efficiente che varietà in cui l'assorbimento era molto limitato.

Una volta confermato l'assorbimento del DON, ci si è interrogati sulla misura in cui fosse stato modificato e in che quantità. Il parametro scelto per indagare eventuali differenze tra le varietà

nella capacità di detossificare il DON è il rapporto tra questo e la sua principale modificazione, il DON 3 glucoside (D3G).

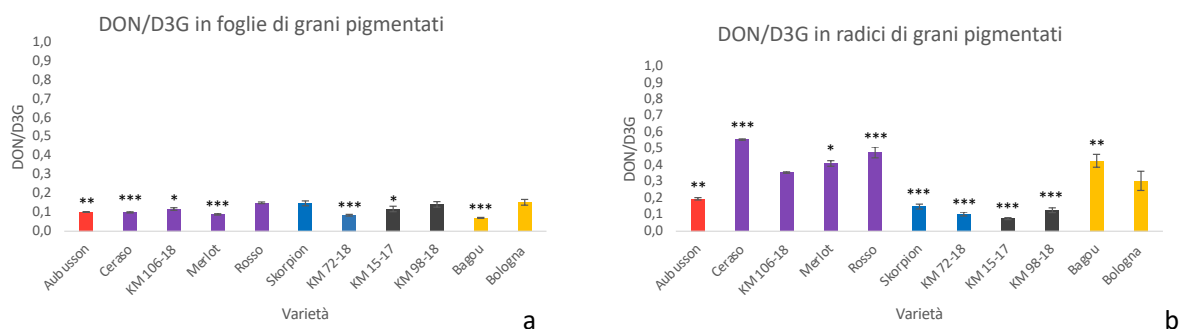


Figura 16 Confronto dei valori di DON/D3G tra i diversi organi di diverse varietà di grani pigmentati. I dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD). L'analisi statistica è stata effettuata tramite ANOVA a una via, seguita dal test post hoc di Dunnett. Gli asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

I dati relativi al rapporto DON/D3G, di foglie e apparati radicali, sono rappresentati in figura 16. Sono stati eseguiti confronti tra diverse varietà di grani pigmentati e il grano commerciale Bagou. Come genotipo di controllo non pigmentato, è stata scelta la varietà Bologna.

Le analisi relative alle foglie di tutte le varietà analizzate (Figura 16 a) mostrano un rapporto DON/D3G inferiore rispetto a Bologna, con differenze statisticamente significative evidenziate dagli asterischi ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***). In particolare, le varietà Aubusson, Ceraso, Merlot, KM72-18 e Bagou mostrano le riduzioni più marcate ($p < 0,001$), suggerendo una maggiore capacità di detossificazione nelle foglie rispetto alla varietà di riferimento. Alcune varietà di diversi cluster mostrano una capacità metabolica molto simile rispetto al controllo, tra cui KM 106-18, Rosso (viola) Skorpion (blu), ed entrambe le varietà del cluster nero (KM15-17 e KM98-18).

Per quanto riguarda le analisi condotte sulle radici (Figura 16 b), le varietà che presentano un rapporto DON/D3G significativamente diverso ed inferiore rispetto al controllo fanno parte di tre cluster, quello rosso, quello blu e quello nero che, nello specifico presentano nelle radici una maggiore capacità di detossificazione del DON. La varietà commerciale Bagou, e tre grani del cluster viola (Ceraso, Merlot e Rosso) presentano una minore capacità metabolica rispetto a Bologna.

Nel complesso, questi dati evidenziano una marcata variabilità, relativamente alla capacità di detossificazione del DON tra le diverse varietà e tra e diversi organi. Queste differenze risultano maggiormente marcate nelle radici; questo dato è supportato dalla letteratura recente (Righetti et al., 2020) che ha già dimostrato come alcune varietà di grano (Kofa e Svevo) presentino differenze tra foglie e radici per quanto riguarda il rapporto tra tossina e i suoi derivati. Non è possibile, tuttavia, stabilire se tali differenze siano correlabili ad un diverso metabolismo (organo dipendente) oppure siano imputabili ad una diversa capacità di trasporto delle varie forme chimiche delle tossine.

Le stesse varietà di grani pigmentati sono state impiegate per un set di esperimenti in cui sospensioni di cellule indifferenziate venivano incubate con medium contenente DON (100µg/100mL) per 14 giorni. In questo caso è stato analizzato anche il terreno di coltura per verificare l'effettivo assorbimento della tossina da parte delle cellule (Figura 17).

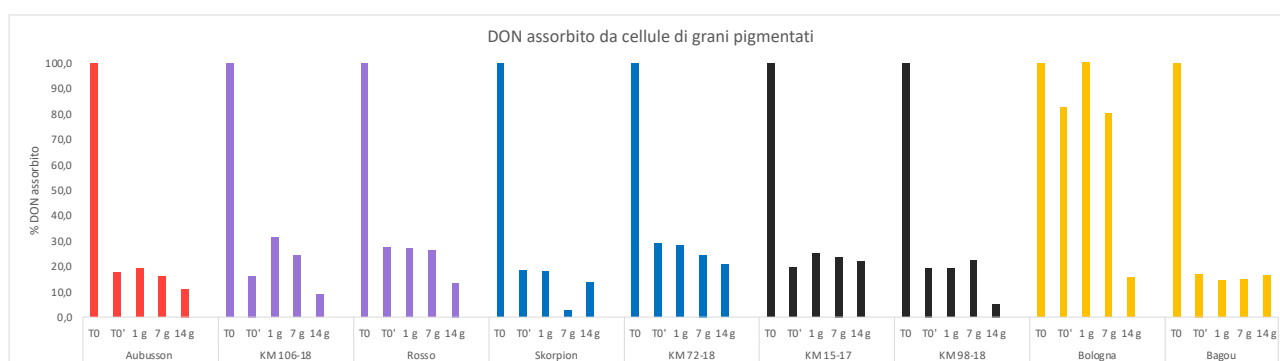


Figura 17 Assorbimento nel tempo di deossinivalenolo da parte di cellule indifferenziate di grani pigmentati

Come osservazione generale, si può osservare come per tutte le varietà (ad eccezione del Bologna) si assista ad una diminuzione rapida del contenuto di tossina nel terreno di crescita già dopo 5 minuti dall'inizio del trattamento (t0'). L'assorbimento del DON sembra avvenire in modo tempo dipendente per alcune varietà: KM 72-18, Rosso, KM 98-18, Aubusson) mentre per altre (come KM 15-17 e Bagou) sembra invece raggiungere un massimo nei tempi più precoci.

Le cellule della varietà Bologna (cluster giallo) si sono dimostrate le meno inclini all'assorbimento della tossina, che comunque ha raggiunto il livello delle altre varietà al termine del periodo di osservazione (14 giorni).

Anche in questo esperimento è stato valutato l'indice di detossificazione del DON, inteso come rapporto tra quantità di tossina nativa (DON) e tossina modificata (D3G). I risultati sono riportati in Figura 18.

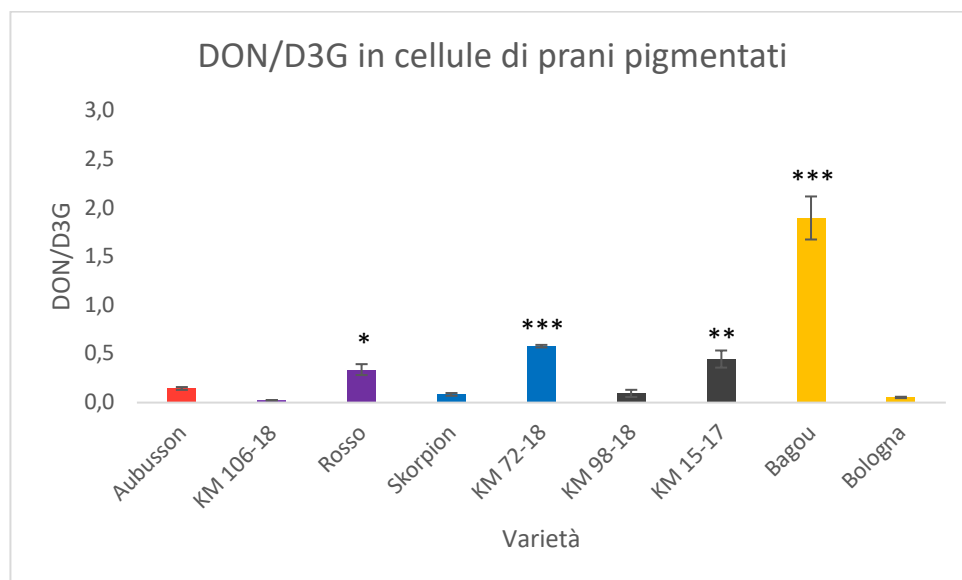


Figura 18 Rapporto DON/D3G nelle cellule di diverse varietà di grani pigmentati. I dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD). L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA ad una via, seguita dal test di Dunnett. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative rispetto a Bologna ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

L'analisi del rapporto DON/D3G nelle sospensioni di cellule dei grani pigmentati ha evidenziato alcune differenze significative tra le varietà analizzate rispetto al controllo Bologna. In particolare, le varietà KM72-18 e Bagou hanno mostrato una capacità di detossificazione del DON significativamente minori ($p < 0,001$). Anche KM15-17 ha mostrato un incremento significativo di DON-3-Glicoside ($p < 0,01$), mentre la varietà Rosso ha presentato una differenza meno marcata ($p < 0,05$). Non si notano pattern nella capacità di trasformare DON in D3G tra i diversi cluster.

Dai risultati ottenuti eseguendo esperimenti con piante complete e con cellule indifferenziate si possono osservare alcune peculiarità. Innanzitutto, la capacità di detossificazione del DON sembra essere legata al differenziamento cellulare in tessuti ed organi, e sembra comunque essere maggiore nelle foglie.

Occorre però considerare che le due forme di tossina riscontrate nelle parti epigee della pianta potrebbero derivare sia da un metabolismo di detossificazione tipico dell'organo che essere il risultato del trasporto a lunga distanza. Infatti, essendo il D3G più idrofilo, potrebbe essere maggiormente mobile all'interno della pianta. È importante dunque sottolineare che il rapporto

D3G/DON non può essere assunto come indice della effettiva capacità differenziale di detossificazione tra gli organi della pianta.

L'impiego di colture *in vitro* di piante e relative sospensioni cellulari sono tecniche utilizzate per screening dei potenziali effetti di xenobiotici sul metabolismo vegetale (Davis et al., 1984, Harms et al., 1986, Harms, 1992). In questo ambito le sospensioni di cellule indifferenziate, di varietà di grano pigmentato sono state utilizzate per valutare il metabolismo basale in seguito al trattamento con DON. Il rapido assorbimento della tossina potrebbe essere spiegato dal rapporto volume/superficie estremamente favorevole nelle cellule libere rispetto alle cellule organizzate in tessuti (come nella porzione rizodermica della radice): infatti, la maggior superficie assorbente garantita dal fatto che tutta la cellula è a contatto con il terreno di coltura, e dunque con la tossina in esso disciolta, potrebbe ragionevolmente aver accelerato il processo di uptake del DON stesso. Nelle radici, al contrario, la superficie realmente assorbente che è rappresentata dalla superficie dei tricoli radicali non può raggiungere la sommatoria delle aree cellulari coinvolte.

Questo tipo di indagine può essere definita come uno screening metabolico applicabile alle diverse varietà di cereali con la finalità di individuare le cultivar più resistenti alle micotossine. È infatti noto dalla letteratura (Pasquet et al., 2016) che esiste una relazione tra la parziale resistenza verso FHB e la capacità di convertire DON in D3G. È stato confermato (Pasquet et al., 2016), che tale conversione può essere operata da classe di enzimi appartenenti alla famiglia delle glicosidasi, tra cui un noto rappresentante è la UDP-glucosiltrasferasi (UGT).

Questi esperimenti si riferiscono tuttavia a piante e cellule coltivate *in vitro*; quindi, esenti da fattori ambientali di carattere sia biotico che abiotico.

4.2 Esperimento con grani perennanti

La capacità di assorbimento, traslocazione e detossificazione del DON sono stati valutati anche in varietà di frumento perennanti. Le varietà selezionate per questo scopo sono *Thinopyrum ponticum* (Kernza), scelto per conferire il tratto “perennante”, e alcune linee (Tabella 6) frutto di incroci con Kernza. Da queste varietà, come per la maggior parte delle specie selvatiche, ci si attendeva una spiccata resistenza a stressori ambientali tra cui microrganismi fitopatogeni. La varietà annuale Bologna è stata utilizzata come controllo.

In questo set di esperimenti, le piante sono state coltivate *in vitro* e trattate per 14 giorni con la stessa dose di DON, somministrato al terreno di coltura liquido (100 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$). Il campionamento della tossina nel medium è stato condotto dopo 1, 7 e 14 giorni di trattamento.

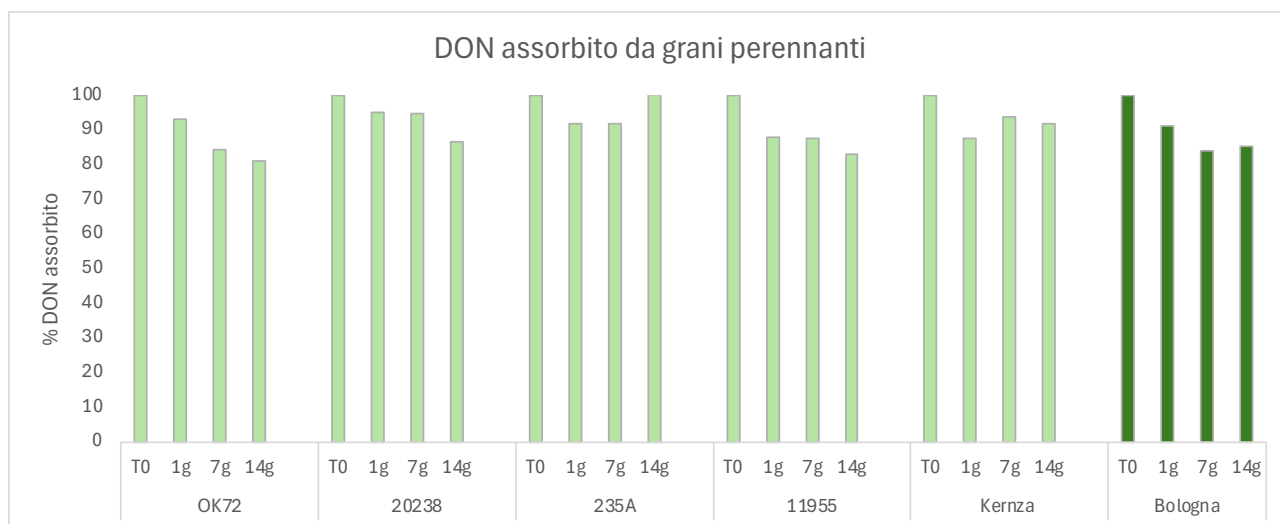


Figura 19 Assorbimento di DON da parte di piante di grani perennanti

La tossina viene assorbita in modo tempo-dipendente in tutte le varietà considerate (con apparente eccezione delle varietà 235A e Kernza, Figura 19).

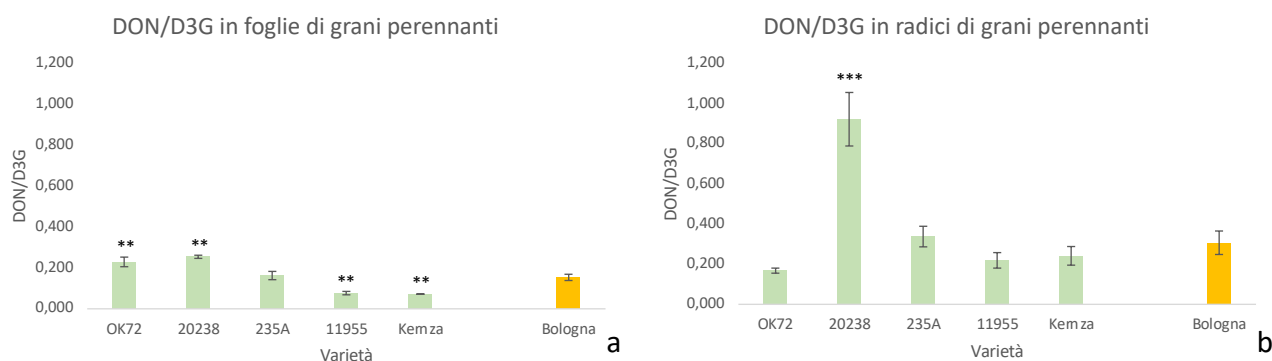


Figura20 Concentrazione del rapporto DON/D3G nelle foglie (a) e nelle radici (b) di diverse varietà di grani perennanti, confrontate con la varietà commerciale Bologna. L'analisi statistica è stata condotta tramite ANOVA seguita dal test di Dunnett. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard (SD). Gli asterischi indicano differenze significative rispetto a Bologna ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

L'analisi del rapporto DON/D3G nelle foglie (Figura 20a) ha evidenziato differenze significative tra le varietà di grani perennanti e il controllo commerciale Bologna. In particolare, le varietà OK72 e 20238 hanno mostrato una capacità di conversione del DON in D3G significativamente inferiore ($p < 0,01$) rispetto al controllo, suggerendo un meccanismo di detossificazione meno

efficiente. Al contrario, le varietà 11955 e Kernza hanno evidenziato una maggiore glicosilazione del DON ($p < 0,01$), indicando una potenziale maggiore capacità di detossificazione rispetto a Bologna. Contrariamente, la varietà 235A sembra mostrare le stesse capacità di detossificazione della varietà di controllo.

Per quanto riguarda le radici (Figura 20b), la conversione di DON nella sua principale forma modificata, osserviamo una diversa dinamica rispetto alle foglie. L'unica varietà che presenta una differenza significativa ($p < 0.001$) è la 20238 che sembra avere un meccanismo di detossificazione del DON meno efficiente rispetto al controllo.

4.3 Esperimento di somministrazione fogliare di micotossine

In questo set di esperimenti, soluzioni di AFB₁, ZEN, T2 e DON sono state somministrate per via fogliare per mimare la naturale diffusione delle tossine a seguito di un attacco fungino in cui il patogeno sia riuscito a superare la barriera della cuticola dell'epidermide.

Una foglia di ciascuna pianta è stata preparata rimuovendo la cuticola (Campbel et al., 1999), per un'area definita di 1 cm² ed immersa nella soluzione di tossina. Al termine del periodo di somministrazione (14 giorni) sono state analizzate le foglie trattate, le foglie distali e le radici (Figura 21). Si è deciso di non effettuare campionamenti del terreno di crescita poiché per tutta la durata dell'esperimento la perdita per evaporazione o assorbimento veniva periodicamente compensata con l'aggiunta di nuova soluzione.

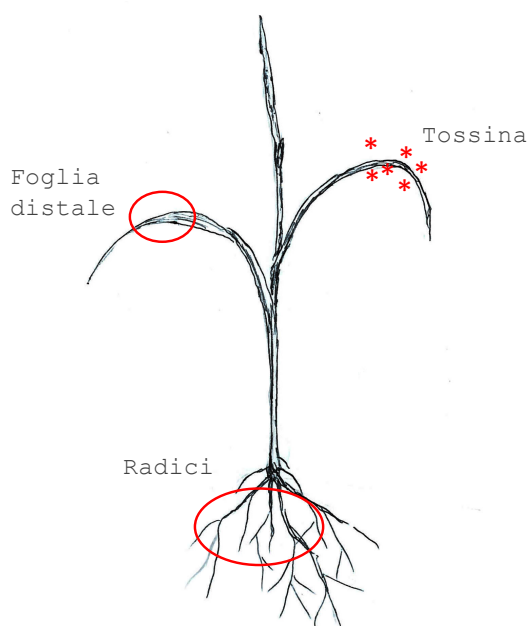


Figura 21 Rappresentazione del disegno sperimentale di somministrazione fogliare di tossina in piante di mais trattati con AFB₁, ZEN, T2 e DON (100µg/50mL)

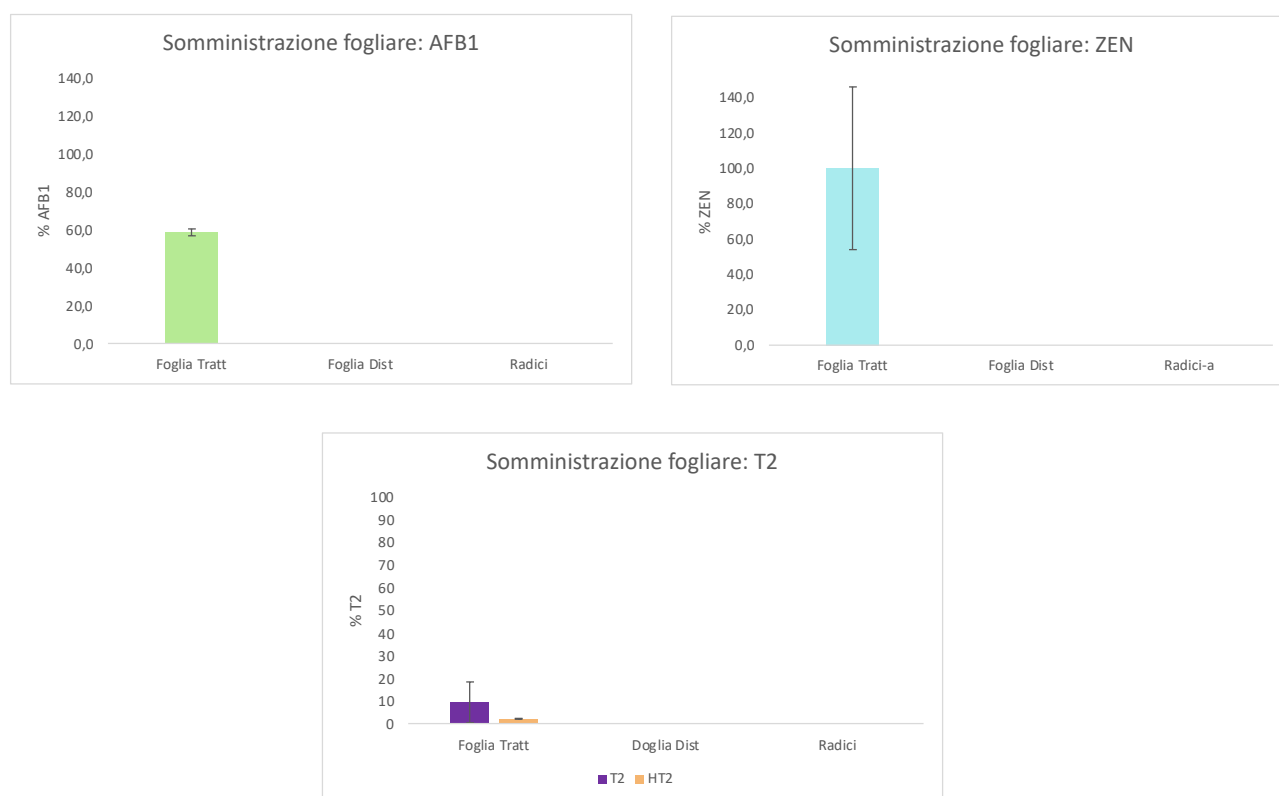


Figura 22 Distribuzione delle micotossine nelle diverse porzioni della pianta dopo somministrazione fogliare. Le figure mostrano la percentuale di tossina rilevata nella foglia trattata (Foglia Tratt), nella foglia distale (Foglia Dist) e nelle radici. I dati sono espressi come percentuale $\pm$ deviazione standard (SD).

La figura 22 mostra le distribuzioni delle diverse micotossine dopo somministrazione fogliare. Per AFB₁ (Figura 22a), la tossina è stata rilevata principalmente nella foglia trattata, con un accumulo pari a circa il 60% della quantità inizialmente somministrata, mentre non è stata individuata nelle altre porzioni della pianta. Un dato simile è stato osservato per ZEN (Figura 22b), che si è accumulato nella foglia trattata con una percentuale intorno al 100%, sebbene con una maggiore variabilità nei dati, e non è stato rilevato nelle altre porzioni della pianta. Per quanto riguarda T2 (Figura 22c), la tossina è stata riscontrata nella foglia trattata, seppur in misura inferiore rispetto alle precedenti, con una piccola percentuale di HT2, la sua principale forma modificata.

Sebbene i dati relativi all'esperimento con deossinivalenolo non vengano mostrati, le analisi preliminari mostrano che il deossinivalenolo è stato individuato nella foglia trattata ed in minima parte anche in quella distale. Interessante sottolineare che la sua principale forma modificata (D3G) sia stata rilevata anche nella foglia distale. I dati qui presentati, riguardano esperimenti preliminari. A causa della mancanza di ulteriori repliche, non è possibile eseguire una corretta analisi statistica dei dati ottenuti.

Risulta evidente che il modello sperimentale proposto per la somministrazione per via fogliare presenta alcune criticità: infatti, la mancata determinazione della presenza della tossina in altre zone della pianta ad esclusione di quella trattata potrebbe indicare che la quantità di micotossina realmente entrata nel tessuto fogliare è estremamente esigua. È necessario anche considerare che la foglia non è un organo deputato all'assorbimento, per cui si può assumere che tossina sia entrata per diffusione, dall'altro la superficie a diretto contatto con la tossina non è paragonabile a quella della radice.

4.4 Somministrazione radicale, “split-root”

L'apparato radicale di piante di mais è stato diviso in due porzioni immerse separatamente in contenitori riempiti di soluzione contenente ¼ di sali MS. La porzione denominata “donatrice” (D) conteneva le diverse tossine (AFB₁, ZEN, T2), singolarmente disciolte in quantità di 100 µg in un volume finale di 80 mL, mentre la porzione indicata come “ricevente” (R) è stata immersa nella stessa soluzione priva di tossina.

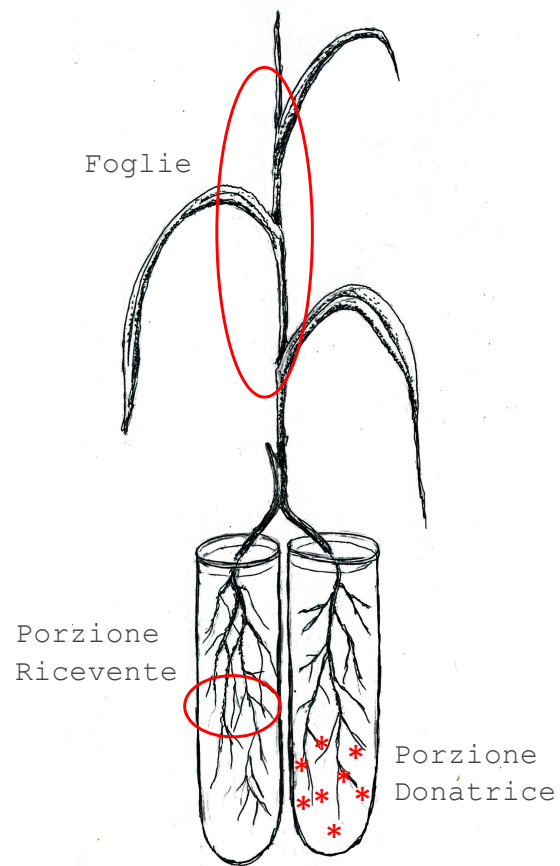


Figura 23 Disegno sperimentale delle porzioni analizzate e della somministrazione della tossina.

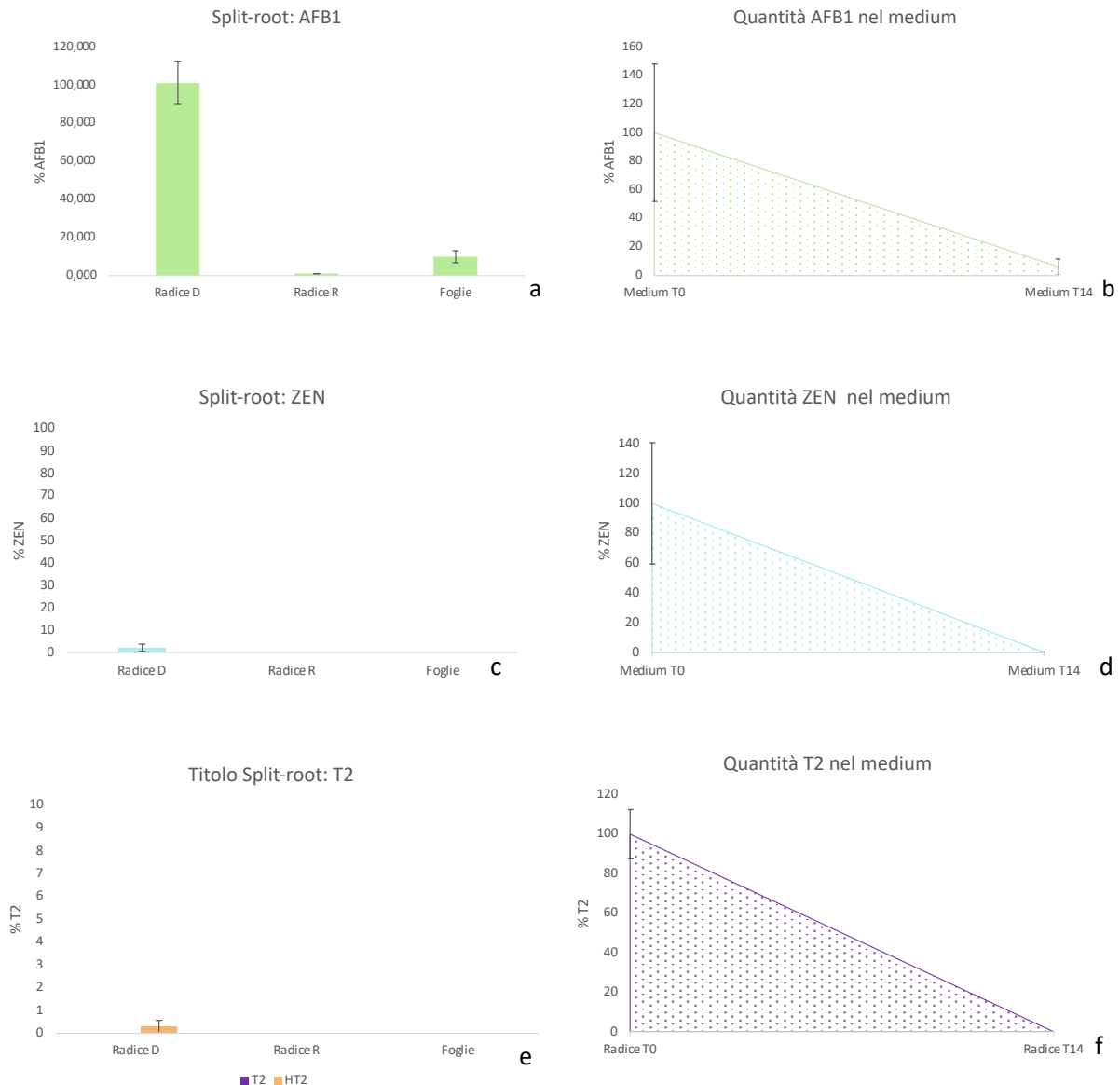


Figura 24 Distribuzione delle tossine testate (AFB₁, ZEN e T2) nel sistema radicale e nelle foglie di piante sottoposte a un esperimento di split-root dopo 14 giorni di esposizione alla tossina (lato sinistro), e la variazione della concentrazione della concentrazione delle stesse nel medium di coltura nel tempo (lato destro). I dati sono espressi come percentuale $\pm$ deviazione standard (SD).

In figura 23a, si osserva che la radice direttamente esposta alla tossina (Radice D) ha accumulato la percentuale più elevata di AFB₁, mentre la radice non esposta (Radice R) presenta solo tracce della tossina. Anche nelle foglie si rileva una bassa, ma quantificabile, percentuale di AFB₁, suggerendo un movimento limitato della tossina dalla radice D verso i tessuti aerei.

In figura 23b, si evidenzia una marcata diminuzione della quantità di AFB₁ nel medium della porzione D tra il tempo iniziale (T0) e il tempo finale (T14). Questa riduzione suggerisce che la tossina è stata assorbita dalle radici nel corso dell'esperimento. In figura 23c si osserva che lo Zearalenone è stato rilevato in bassa quantità solo nella porzione di radice direttamente a

contatto con la tossina, mentre non è stato individuato nelle altre porzioni. Tuttavia, confrontando questi dati con la concentrazione della tossina nel medium (Figura 23d), si evince che essa è stata completamente assorbita nel corso dell'esperimento.

Nella figura 23e si osserva che la tossina T2, somministrata alla pianta, non è stata rilevata in nessuna delle porzioni analizzate. Tuttavia, nella porzione di radice direttamente esposta, è stata individuata la presenza della tossina HT2, una delle principali forme modificate di T2. La figura 23f mostra che, nel corso dei 14 giorni di sperimentazione, la tossina è stata completamente assorbita dalla pianta, come evidenziato dalla progressiva riduzione della sua concentrazione nel medium.

Dai risultati ottenuti non è possibile correlare la mobilità delle tossine ai loro parametri chimico-fisici relativi alla solubilità ($\log K_{ow}$ o peso molecolare): infatti, in questo gruppo di micotossine il deossinivalenolo è la molecola che presenta una maggiore solubilità ($\log K_{ow}$ -0.7) ed il peso molecolare più basso (296.3 g/mol), ma è AFB₁ ($\log K_{ow}$ 1.23, MW: 312.2 g/mol) ad essere stata individuata sia nelle foglie che nelle radici R.

Evidentemente, la mobilità delle tossine all'interno degli organi vegetali non è da porsi in relazione con le caratteristiche di peso molecolare e solubilità. Tuttavia, diversi autori (Ju et al., 2020; Cao, et al., 2023) hanno correlato la mobilità di erbicidi sintetici all'interno delle piante con questi criteri. Molecole xenobiotiche non riconosciute dal metabolismo vegetale rimangono inalterate all'interno dei tessuti e cellule per cui è ipotizzabile che le proprie caratteristiche di solubilità e peso molecolare ne determinano il grado di mobilità. Le micotossine sono soggette a meccanismo di detossificazione che consistono nella modifica strutturale della molecola originaria con conseguente variazione di proprietà chimo-fisiche. L'assenza di T2 e ZEN nelle foglie e nelle radici R potrebbe essere imputabile ad una riduzione metabolica da parte della radice D del quantitativo assoluto delle stesse. Tale riduzione potrebbe determinare una limitazione alla diffusione nei tessuti.

4.5 Analisi degli essudati radicali

Un pool di piante di grano delle varietà Svevo, allevate in condizioni axeniche su terreno MS, sono state trattate con DON (100µg/100mL) per un periodo di 14 giorni. Al termine del periodo di esposizione sono stati campionati e analizzati i terreni di crescita sia delle piante trattate che

delle piante di controllo (non trattate), al fine di individuare, attraverso la caratterizzazione dei componenti degli essudati radicali, un profilo differenziale dovuto all'esposizione alla tossina in assenza di altre interazioni con l'ambiente naturale.

Tabella 15 Molecole identificate nel medium di piante di mais trattate con AFB₁

5-(methahylsulfanyl)pentyl-desulfoglucosinolate	neokestose
4-methylumbelliferyl glucoside	N-feruloyltyramine
4-coumaraldehyde	methyl-2-alpha-L-fucopyranosyl-beta-D-galactoside
3-demethylubiquinol-9	maltotriose
3',5'-di-C-glucosylphloretin	geranyl beta-D-glucopyranoside
2'-deoxyguanosine	galactinol
1-[18-hydroxyoleoyl]-2-[18-hydroxy-linoleoyl]-sn-glycerol 3-phosphate	dopaquinone
1-O-sinapoyl-beta-D-glucose	dhurrin
1-O-galloyl-beta-D-glucose	D-galactosylononitol
1-O-(4-coumaroyl)-beta-D-glucose	cis-zeatin-O-glucoside
1,1-kestotetraose	chlorophyll a
(Z,Z)-biliverdin-IX alpha	CDP-N-methylethanolamine
(indol-3-yl)acetyl-L-aspartate	beta-nicotinate D-ribonucleotide
(4S)-perillyl aldehyde	beta-maltose
(3Z)-hex-3-en-1-yl acetate	benzoyl-beta-D-glucopyranose
UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-beta-L-arabino-hex-4-ulose	alpha-L-xylopyranose
(+)-larreatricin	aldehydo-D-galactose
(+)-cis-abscisic aldehyde	adenylosuccinate
reduced riboflavin	71-dihydroxychlorophyllide a
protopine	7,8-dihydrofolate monoglutamate
pheophorbide a	6G-di-beta-D-fructofuranosylsucrose
petiveriin	6G,6-kestotetraose
pelargonidin-3-O-rutinoside	6-methoxy-3-methyl-2-all-trans-nonaprenyl-
O-acetyl-L-serine	1,4-benzoquinol
	5-hydroxy-coniferaldehyde

A seguito dell'analisi metabolomica sono stati individuati 46 composti differenziali (Tabella 12), identificati tramite PLANT METABOLIC PATHWAY DATABASES (PMN). È stato possibile raggruppare la maggior parte dei composti in 3 cluster principali (biosintesi, degradazione, metabolismo energetico), mentre alcuni sono stati classificati come appartenenti a pathways generici (Figura 24).

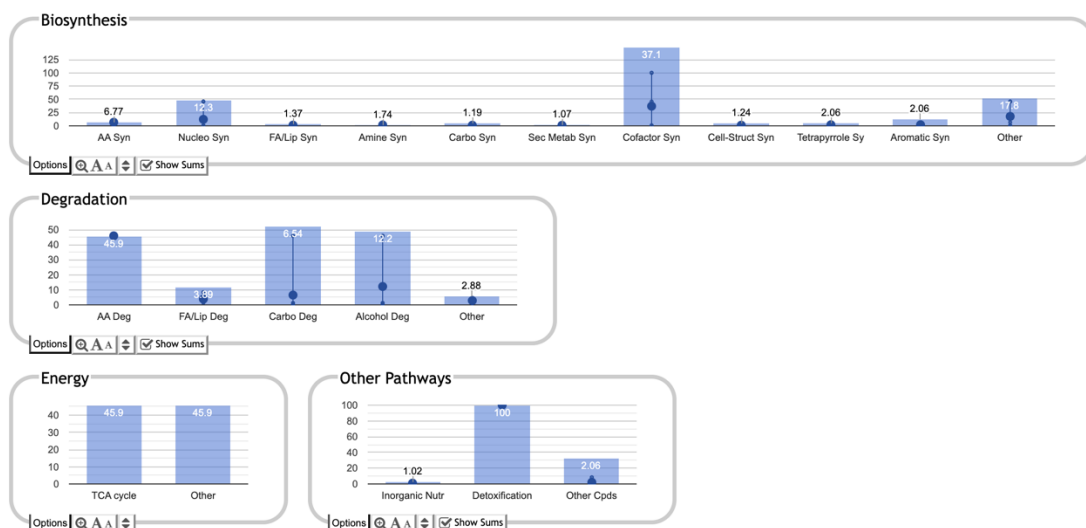


Figura 24 Cluster in cui rientrano i metaboliti individuati

Le differenze più significative sono state però individuate all'interno del cluster del metabolismo anabolico (Biosintesi), ed in particolare nel sotto-cluster relativo alla biosintesi di cofattori, carrier e vitamine (Figura 25).

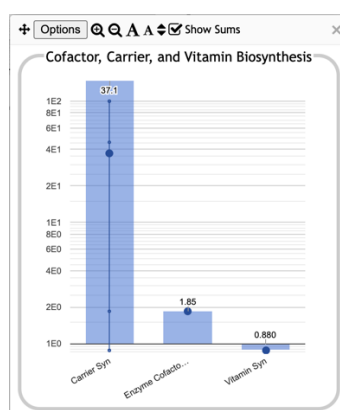


Figura 25 Differenze nella biosintesi di cofattori, carrier e vitamine

Inaspettatamente, anche diverse componenti strutturali sono state identificate come differenziali: ad esempio, sembra che elementi strutturali dell'epidermide siano maggiormente trattenuti dalla pianta. Per contro, si nota una relativa abbondanza negli escreti di elementi della parete secondaria e monomeri di suberina (Figura 26).

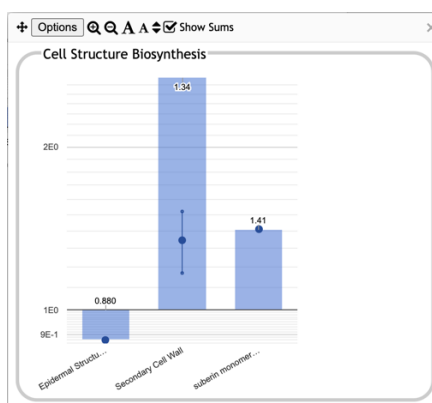


Figura 26 Differenze nei componenti strutturali

Dai dati emerge un'estrema complessità per quanto riguarda la composizione del secretoma. Sono stati infatti rilevati composti di varia natura e funzione, appartenenti a diversi pathway sia di biosintesi che di degradazione. Per l'interpretazione è necessario considerare che questi composti e le loro relative abbondanze si trovano all'esterno della radice quindi le loro variazioni in quantità non sono direttamente riferibili al metabolismo della pianta, è il caso di elementi strutturali quali ceramidi e fosfolipidi (Figura 26) che sono costituenti delle membrane biologiche, quali plasmalemma e tonoplasto ma che in questo caso vengono individuati esternamente alla cellula. Una possibile interpretazione del fenomeno può riguardare la lisi della cellula stessa.

Al contrario, sono state trovate evidenti differenze anche per elementi coinvolti nel metabolismo secondario: ad esempio, le piante trattate con DON hanno rilasciato maggiori quantità di metaboliti coinvolti nella sintesi degli alcaloidi, ma una minor quantità di composti glucosidici contenenti azoto (Figura 27).

I dati ottenuti supportano una alterazione diretta del metabolismo, la cui entità dovrebbe comunque essere diversamente valutata.

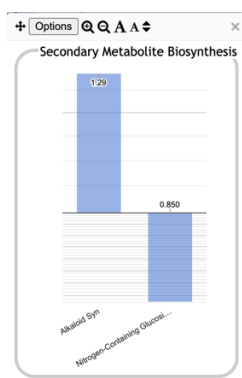


Figura 27 Differenze nel metabolismo secondario

Questa analisi offre risultati estremamente complessi e di non semplice interpretazione. Indubbiamente l'aspetto fondamentale riguarda le differenze riscontrate tra il contenuto all'interno del medium di piante trattate con DON e piante non trattate. Sebbene la presenza di questi metaboliti possa essere attribuita ad eventi puramente fisiologici come la lisi cellulare, per altri composti, sarà necessaria una ulteriore e più definita indagine al fine di valutare se questi abbiano un ruolo attivo nell'eventuale segnalazione dello stress biotico.

4.6 Valutazione della risposta metabolica di piante di mais trattate con AFB₁

Con l'intento di approfondire l'effetto che l'esposizione diretta alla tossina AFB₁ esercita sul metabolismo delle piante di mais, è stata condotta una valutazione del profilo proteomico e antiossidante di foglie e radici di piante trattate per 14 giorni. Al termine del trattamento, lo stato fitosanitario generale delle piante è stato valutato visivamente; non sono stati riscontrati sintomi visibili di sofferenza a carico delle porzioni epigee o ipogee in seguito all'esposizione alla tossina (Figura 28).



Figura 28 Effetto del trattamento con AFB_1 100 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ sullo stato fitosanitario delle piante di mais. a) non trattato (controllo), b) trattato (AFB_1)

4.6.1 Analisi proteomica tramite 2-DE

Le proteine totali estratte dalle foglie e dalle radici sono state quindi sottoposte a elettroforesi bidimensionale per l'identificazione delle specie proteiche differenzialmente espresse nelle due condizioni (AFB_1 e controllo). Per una maggiore comprensione è stato valutato il profilo proteico compreso tra pH 3 e pH 10.

L'analisi per imaging condotta con PDQuest Software (Bio-Rad) ha permesso di individuare 16 spot differenziali nella radice, di cui i 7 più significativi sono stati recuperati e identificati, e 57 nella foglia, di cui i 16 più significativi sono stati recuperati e identificati. L'identificazione è stata ottenuta presso il BTF-MAPLab dell'Università di York tramite digestione in gel, successiva analisi con nano-ESI LCMS e database mining tramite Scaffold 5 proteome Tool (<https://www.proteomesoftware.com/products/scaffold-5>) e MSFragger (<https://msfragger.nesvilab.org/>) in *Zea mays* database.

I risultati sono riportati in Tabella 16.

Tabella 16 Elenco delle proteine differenziali identificate in radici e foglie di piante di mais trattate per 14 giorni con AFB_1

RADICE				
SSP	Regulation	Fold change	Protein ID	Protein accession
3201	↑	3,1	Translationally controlled tumor1	A0A1D6GY43
4302	↑	3,1	Absciscic acid stress ripening 3	A0A1D6EB22

5416-5418	↓	0,3 – 0,3	Peroxidase (oxidoreductase)	A0A1D6MSC0
5408-5407	↓	0.3 – 0,4	Peroxidase (oxidoreductase)	B6THU9
5303	↓	0,4	Germin-like protein	B4FY73
FOGLIE				
2403	↑	6,6	Translationally controlled tumor1	A0A1D6GY43
2612	↑	3,1	Mg-protoporphyrin chelatase	A0A804RFC1
3206	↓	0.3	Ribulose biphosphate carboxylase (small subunit)	B4FSJ3
NLR	↓	0,2	Chaperonin	B6T8U7
3611	↑	2,4	Rubisco activase2	B6T416
4412	↑	3,5	Triose phosphate isomerase 4	B4FNW1
4604	↑	2,1	Leucine aminopeptidase 2	A0A1D6HN61
4710	↑	4,9	Transketolase	A0A1D6NVZ7
5612	↑	3,5	ATP synthase subunit alpha	A0A804RMW6
6402	↑	3,6	Glutathione transferase	B4FK84
6503	↑	3,8	Ferredoxin-NADP reductase	Q9SLP6
6511	↑	3,4	Hydroxyproline-rich glycoprotein	A0A1D6K1B9
6609	↑	5,8	Fumarate hydratase	C0PDA6
7402	↑	36,7	Glutathione transferase	B6T7H0
7602	↑	4,3	Fructose biphosphate aldolase	B4FAL9
7603	↑	2,9	Fructose biphosphate aldolase	B4FAL9

L'analisi delle radici ha evidenziato come il trattamento con AFB₁ abbia determinato una up-regolazione di 3,1 volte delle due proteine thioredoxin H-type (SSP 3201) e Absciscic acid stress ripening 3 (SSP 4302). Queste proteine presentano un ruolo biologico di protezione da stress abiotici che la pianta può subire: la thioredoxin H-type, infatti, è coinvolta in attività antiossidanti, mentre la proteina Absciscic acid stress ripening 3 partecipa principalmente ai meccanismi di salvaguardia in caso di stress idrico o salino.

Al contrario, due perossidasi (SSP 5416 e 5418, e SSP 5408 e 5407) e una Germin-like protein (cupin-type 1) (SSP 5303) risultano down-regolate dall'esposizione alla tossina. Anche queste proteine svolgono un ruolo importante nei meccanismi aspecifici di difesa verso vari tipi di stress. L'analisi delle foglie ha portato all'individuazione di due gruppi principali. Il primo riguarda enzimi coinvolti nelle risposte da stress di varia natura che sono risultati up-regolati dal trattamento. Le proteine identificate in questo gruppo sono la Translationally controlled tumor 1 (SSP 2403) proteina nota per indurre la morte cellulare programmata come risposta a stress anossici, l'Hydroxyproline-rich glycoprotein, la quale, sebbene abbia un ruolo strutturale, è coinvolta nelle risposte di difesa (SSP 6511). L'incremento maggiore (36,7 volte) è stato registrato per una Glutathione transferase (SSP 7402); il dato non sorprende in quanto è noto che questi enzimi

svolgono un ruolo preponderante nei processi di detossificazione di diversi xenobiotici (Cummins, et al., 2011).

Il secondo gruppo riguarda quelle proteine che sono implicate a vario titolo nel metabolismo energetico della cellula, tra cui: Rubisco attivase 2 (SSP 3611), Triose phosphate isomerase 4 (TPI) (SSP 4412), Transketolase (SSP 4710), Mg-protoporphyrin chelatase (SSP 2612), Fumarate hydratase (6609), Leucine aminopeptidase 2 (SSP 4604), ATP synthase subunit alpha (SSP 5612), Ferredoxine-NADP reductase (SSP 6503), Fructose biphosphate aldolase (SSP 7602) e Ribulose biphosphate carboxylase (SSP 3206); queste sono risultate mediamente up-regolate nelle foglie dei trattati. La foglia attua una risposta aspecifica ad uno stress percepito. La modulazione del proprio metabolismo energetico potrebbe rappresentare una compensazione agli effetti negativi indotti dalla tossina.

I risultati dimostrano come la quantità di tossina somministrata (100 µg/100 mL) non sia letale né particolarmente tossica per la pianta; risulta tuttavia evidente che si sia verificata una percezione e un successivo riarrangiamento dell'assetto proteomico dell'organismo a livello sia di radice che di foglia, e, dato ancor più interessante, che nonostante la somministrazione sia avvenuta per via radicale, il numero di specie proteiche modulate sia molto maggiore nelle foglie. Questa osservazione non solo conferma l'avvenuta traslocazione della tossina dall'apparato radicale a quello fogliare, ma suggerisce anche che risposte specifiche siano differenzialmente attivate nei due organi.

4.6.2 Determinazione del profilo antiossidante e fenolico di foglie e radici

Per la valutazione del profilo antiossidante delle piante trattate con la tossina sono stati condotti alcuni saggi spettrofotometrici su estratti metanolici di foglie e radici.

L'attività di scavenging è stata valutata tramite saggio DPPH, ed espressa come mg equivalenti di acido ascorbico per grammo di peso fresco.

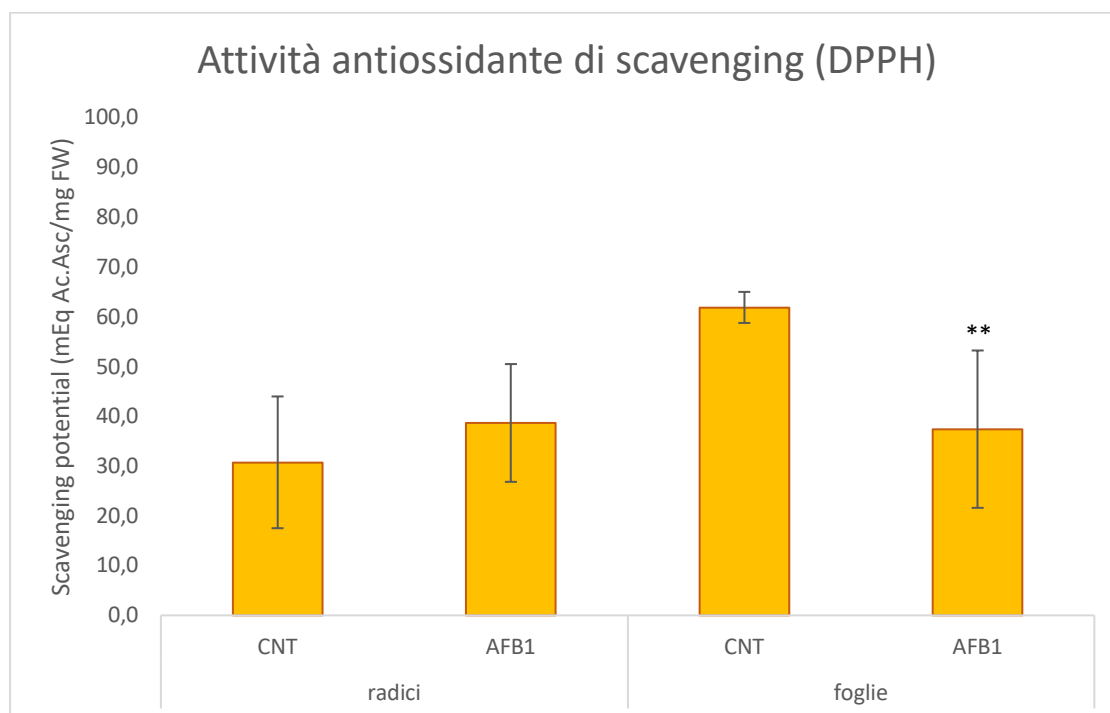


Figura 29 Attività antiossidante di scavenging (DPPH). L'analisi statistica è stata effettuata mediante due T test confrontando controllo e trattato di radici e foglie separatamente. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo non trattato ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

I risultati hanno mostrato che le foglie delle piante non trattate presentano una maggiore attività antiossidante rispetto alle radici (Figura 29). Questo dato non sorprende, poiché le attività metaboliche che avvengono nei tessuti fogliari determinano normalmente livelli più alti di ROS rispetto alle radici, portando alla necessità di un maggior contenuto di composti antiossidanti. Al contrario, non sono state invece osservate differenze nella capacità di scavenging degli estratti di foglie e radici ottenute dalle piante esposte alla tossina. Questo potrebbe significare che, mentre il trattamento non impatta sul profilo antiossidante dei tessuti radicali, a livello fogliare la tossina innesca una serie di processi che risultano nel calo del pool di antiossidanti.

Con lo scopo di investigare il contributo della componente fenolica nel determinare l'attività antiossidante osservata negli estratti, è stato quindi condotto un dosaggio dei polifenoli totali tramite reattivo di Folin-Ciocalteu (Figura 30 a). I risultati dimostrano che, come atteso, il contenuto di polifenoli nelle radici è molto inferiore a quello delle foglie, e che non vi sono differenze dovute al trattamento per quanto riguarda la parte ipogea (coerentemente con quanto osservato nel saggio del DPPH); tuttavia, e inaspettatamente, non si sono osservate differenze significative nel trattamento a livello fogliare. Questa apparente discrepanza con il

dato di attività antiossidante (Figura 29) è stata inizialmente attribuita a una diversa composizione nel pool di polifenoli antiossidanti; per questo motivo la componente polifenolica è stata dissezionata analizzando specificatamente la quantità di flavonoidi (Figura 30 b).

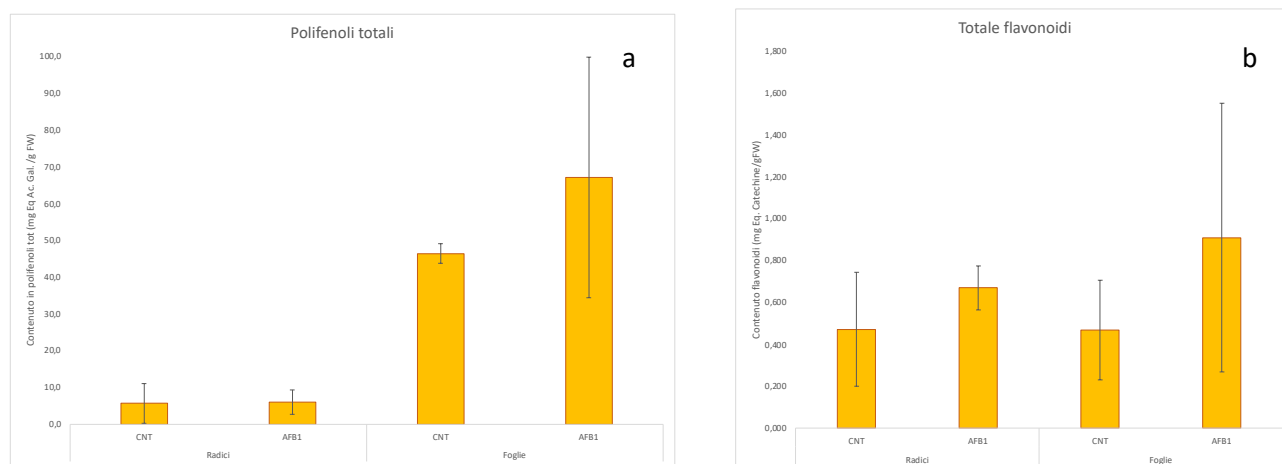


Figura 30 Polifenoli totali (a) e flavonoidi (b). L'analisi statistica è stata effettuata mediante due T test confrontando controllo e trattato di radici e foglie separatamente. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo non trattato ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

Anche in questo caso, tuttavia, non è stato possibile apprezzare differenze né dovute al trattamento, né dovute all'organo, a dimostrazione del fatto che l'alterazione dei livelli di attività antiossidante indotti dalla tossina non dipendono dal contenuto di flavonoidi, e molto probabilmente neanche dall'assetto del profilo polifenolico. Resta comunque la necessità di approfondire questo aspetto, tenendo però in considerazione che i dati ottenuti non sembrano indicare l'effettiva presenza di uno stato di stress.

4.7 Analisi molecolari della risposta all'infezione fungina

Le contaminazioni fungine non interessano solo le specie monocotiledoni; numerose altre piante di rilevanza commerciale e agronomica presentano problematiche analoghe. Per discriminare il ruolo della tossina nello sviluppo della sintomatologia, sono stati allestiti due esperimenti utilizzando foglie e sospensioni di cellule indifferenziate di *Vitis vinifera*. Entrambe le colture sono state esposte all'infezione di spore di *A. carbonarius* e alla tossina corrispondente, OTA. Se da un lato sono note le risposte vegetali a seguito dell'infezione fungina, per contro estremamente scarsi sono i dati relativi all'espressione di geni associati al trattamento con sole tossine.

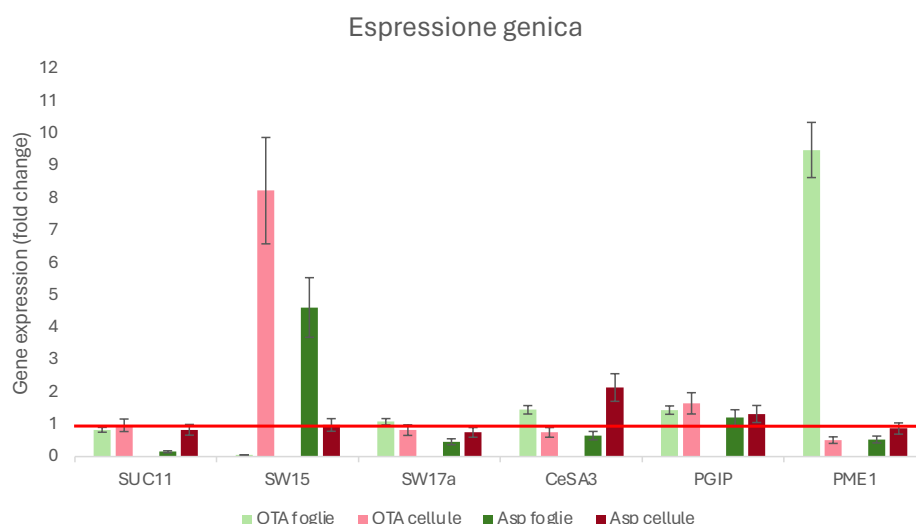


Figura 31 Effetto dell'esposizione al fungo fitopatogeno *A. carbonarius* ed a OTA sull'espressione di geni target in foglie e sospensioni cellulari di *V. vinifera*.

Come si può osservare in figura 31, le risposte di foglie e sospensioni cellulari trattate con OTA o con *A. carbonarius* in termini di espressione dei geni target non sono paragonabili. Infatti, la quasi totalità dei geni considerati ha mostrato una direzione opposta di regolazione in dipendenza dal trattamento o dal tessuto analizzato.

L'unica eccezione sembra essere relativa all'espressione del gene PGIP, che è risultato up-regolato da entrambi i trattamenti, sia su foglie che su cellule.

SUC11 e SW17a, due dei tre geni correlati al trasporto di zuccheri, sono risultati down-regolati in tutti i trattamenti, ma è osservabile una diminuzione nei casi in cui le foglie sono state inoculate con le spore fungine.

Il gene SW15, anch'esso associato al trasporto di carboidrati, ha mostrato livelli di espressione molto diversi: sulle foglie, il trattamento con OTA ha comportato un'importante down-regolazione del gene, mentre nelle cellule indifferenziate esso ha determinato una up-regolazione. Al contrario, le spore fungine inoculate sulle foglie hanno indotto una maggior espressione del gene, mentre lo stesso trattamento su cellule non sembra aver indotto differenze rispetto al gene target.

Anche per quanto riguarda l'espressione del gene CeSA3, sia nelle foglie che nelle cellule, sono stati evidenziati risultati opposti: il trattamento con OTA sulle foglie causa un'up-regolazione, mentre lo stesso trattamento su cellule mostra l'effetto contrario. Allo stesso modo il

trattamento con *Aspergillus* su foglie down-regola il gene mentre si nota una sovra espressione dello stesso in seguito al trattamento sulle sospensioni cellulari.

Il gene PME1, per entrambe le prove sia con OTA che con le spore, risulta essere meno espresso. Particolarmente rilevante appare la notevole sovra espressione del gene nelle foglie a seguito del trattamento con OTA.

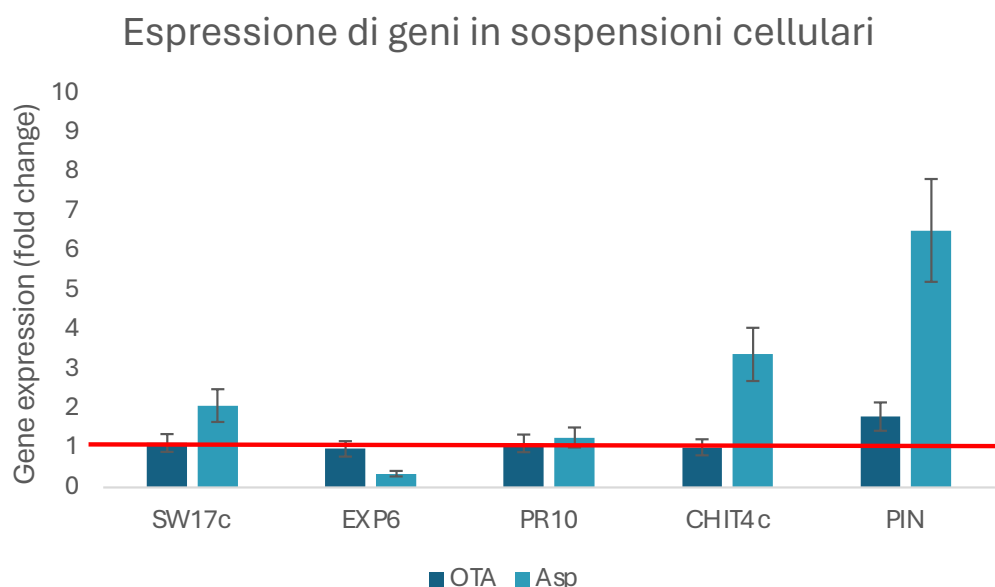


Figura 32 Differenze d'espressione di geni in cellule trattate con OTA e *A. carbonarius*

Un'analisi più approfondita condotta sulle sospensioni cellulari (Figura 32), a seguito degli stessi trattamenti con *Aspergillus* e OTA, ha permesso di evidenziare che solo il gene PIN risulta sovra-espresso a seguito di entrambe le prove.

Il trattamento con il fungo patogeno ha determinato un aumento dell'espressione dei geni CHIT4c e SW17c e una riduzione di EXP6.

Non sembrano esserci differenze per quanto riguarda i livelli di espressione di PR10 in entrambi i trattamenti.

Dai dati ottenuti mediante analisi di espressione genica, emerge che entrambi i trattamenti, su entrambi i sistemi sperimentali, inducano un aumento della quantità dei geni appartenenti alla famiglia SWEET. È noto dalla letteratura (Breia, et al., 2020; Canarini, et al., 2019) che tali geni codificano per il trasportato degli zuccheri verso l'apoplasto. La loro espressione viene modulata

positivamente in seguito all'infezione fungina; questo determina un rilascio di carboidrati solubili all'esterno della cellula, generando un ambiente trofico per le ife fungine.

Sorprendentemente, questa risposta è indotta anche dal trattamento con la sola ocratossina A. La mancata corrispondenza nella risposta tra i due trattamenti (OTA e *Aspergillus*) e i due sistemi considerati (sospensioni cellulari e foglie) potrebbe essere imputabile alla diversa espressione di questi geni in base ai diversi organi della pianta.

La parete della cellula vegetale rappresenta la prima interfaccia all'infezione patogena, per questo la pianta attua una serie di risposte volte a mantenere l'integrità della struttura. Geni importanti in questo ambito sono CeSA3 (cellulosa sintasi), PGIP (inibitore della poligalatturonasi), EXP6 (espansine), PME1 (pectina-metil transferasi) e PIN (inibitore di proteasi).

La risposta che la pianta può attuare in seguito ad uno stress biotico può tradursi anche con una sotto espressione di alcuni geni. Dai risultati ottenuti si può osservare che alcuni geni rispondono in modo univoco come down-regolazione, ad entrambi i trattamenti.

Anche in questo caso, i geni sotto-regolati risultano associati sia ai trasportatori di zucchero, come SUC11 (in cellule indifferenziate e foglie) e SWEET17a in risposta ad entrambi i trattamenti, sia a geni che regolano l'integrità strutturale della parete cellulare come EXP e PME1 (in sospensioni cellulari). Anche in questo caso, si conferma che OTA è in grado di indurre una risposta genica tipicamente riportata in seguito ad un'interazione pianta-patogeno.

4 CONCLUSIONI

Nel corso di questo lavoro sono stati seguiti diversi approcci sperimentali per chiarire le risposte fisiologiche e metaboliche di piante in seguito all'esposizione di micotossine.

Esiste un'ampia letteratura inerente alle risposte vegetali all'infezione fungina, tuttavia, non è ancora completamente chiaro il ruolo che svolgono le micotossine nel processo di patogenesi. In questo ambito sono stati presi in considerazione alcuni aspetti strettamente legati alla risposta vegetale che possono essere riassunti con quanto segue:

È stato eseguito uno screening varietale su diversi grani di interesse sia ecologico che nutraceutico:

per mezzo di saggi biotecnologici che escludono qualsiasi variabile di campo, è possibile determinare differenze varietali per quanto riguarda la capacità di detossificazione del deossinivalenolo. Tali differenze possono essere correlate anche al livello di organizzazione cellulare. Tuttavia, in assenza di esperimenti mirati quali ad esempio la coltura di radici e foglie separate, non è possibile attribuire una differente capacità di detossificazione tra i due organi considerati.

Queste tecniche possono rappresentare un valido strumento per screening biochimici e molecolari che possono coadiuvare le scelte inerenti al miglioramento genetico dei cereali.

Lo studio del movimento delle diverse micotossine all'interno delle piante di mais non sembra essere correlato alle proprietà chimico-fisiche delle molecole considerate. Dai risultati preliminari ottenuti da queste sperimentazioni non è possibile comprendere i gradi di mobilità delle tossine all'interno della pianta; infatti, non si può né escludere né confermare se tale trasporto avvenga per mezzo dei tessuti di conduzione oppure sia imputabile a diffusione semplice tra le cellule.

La presenza della aflatossina B₁ all'interno dei tessuti di mais ha determinato una modulazione del quantitativo di proteine considerate. Questo tipo di risposta generalmente è correlabile ad un evento patogenico, la sola AFB₁ quindi, è in grado di indurre modificazioni anche senza la presenza del fungo. Tuttavia, l'esposizione non sembra indurre né un aumento dello stress ossidativo né un incremento nella sintesi di polifenoli totali, inclusi i flavonoidi.

Una delle tante domande che accompagnano lo studio dell'interazione tra la pianta ospite ed i funghi è capire il ruolo che svolgono le tossine prodotte dal patogeno. Per identificare eventuali

differenze nei meccanismi di difesa attivati nella vite in seguito all'infezione con il fungo *A. carbonarius* e all'esposizione ad ocratossina A, è stata impiegata la Real-Time PCR per monitorare e quantificare l'espressione di specifici geni coinvolti nella risposta difensiva della pianta. È stato dimostrato che, anche in questo caso, la sola tossina OTA, è in grado di indurre una risposta genica tipicamente riportata in seguito ad un'interazione pianta-patogeno.

5 BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., & Magan, N. (2012). A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(69), 757–767. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0482>
- Abdelaziz, A. M., El-Wakil, D. A., Attia, M. S., Ali, O. M., AbdElgawad, H., & Hashem, A. H. (2022). Inhibition of *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production in *Zea mays* L. Using Endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, 8(5), 482. <https://doi.org/10.3390/jof8050482>
- Agrawal, A. A., & Karban, R. (1999). 3 Why Induced Defenses May Be Favored Over Constitutive Strategies in Plants. In *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses* (pp. 45–61). Princeton University Press. <https://doi.org/10.1515/9780691228198-006>
- Agrios, G. N. (2005). Introduction. In *Plant Pathology* (pp. 3–75). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50007-5>
- Ahmad, A., Kaleem, M., Ahmed, Z., & Shafiq, H. (2015). Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Research International*, 77, 221–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.021>
- Ahmad, M., & Sinha, K. (2002). Influence of aflatoxin B1 on seed germination, seedling growth, chlorophyll and carotenoid contents of mustard (*brassica juncea* L. var. pusa bold) seeds. *Mycotoxin Research*, 18(1), 2–6. <https://doi.org/10.1007/BF02946134>
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>
- Alisaac, E., & Mahlein, A.-K. (2023). Fusarium Head Blight on Wheat: Biology, Modern Detection and Diagnosis and Integrated Disease Management. *Toxins*, 15(3), 192. <https://doi.org/10.3390/toxins15030192>
- Al-Zaban, M. I. (2023). Impacts of Temperature and Water Activity Interactions on Growth, Aflatoxin B1 Production and Expression of Major Biosynthetic Genes of AFB₁ in *Aspergillus flavus* Isolates. *Microorganisms*, 11(5), 1199. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051199>
- Altieri, M. A., Nicholls, C. I., Henao, A., & Lana, M. A. (2015). Agroecology and the design of climate change-resilient farming systems. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(3), 869–890. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0285-2>
- Anand, G., Gupta, R., Marash, I., Leibman-Markus, M., & Bar, M. (2022). Cytokinin production and sensing in fungi. *Microbiological Research*, 262, 127103. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127103>
- Battache, M., Suarez-Fernandez, M., Klooster, M. V., Cambon, F., Sánchez-Vallet, A., Lebrun, M.-H., Langin, T., & Saintenac, C. (2024). Stomatal penetration: the cornerstone of plant resistance to the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *BMC Plant Biology*, 24(1), 736. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05426-5>
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., & Mérillon, J.-M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.001>

- Bellincampi, D., Cervone, F., & Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in planta pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00228>
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Bentivenga, G., Spina, A., Ammar, K., Allegra, M., & Cacciola, S. O. (2020). Screening of Durum Wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf.) Husn.) Italian Cultivars for Susceptibility to Fusarium Head Blight Incited by *Fusarium graminearum*. *Plants*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.3390/plants10010068>
- Bertola, M., Righetti, L., Gazza, L., Ferrarini, A., Fornasier, F., Cirlini, M., Lolli, V., Galaverna, G., & Visioli, G. (2023). Perenniality, more than genotypes, shapes biological and chemical rhizosphere composition of perennial wheat lines. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1172857>
- Biesaga-Kos'cielniak, J., & Filek, M. (2010). *Occurrence and Physiology of Zearalenone as a New Plant Hormone* (pp. 419–435). https://doi.org/10.1007/978-90-481-3333-8_15
- Bizuneh, G. K. (2021). The chemical diversity and biological activities of phytoalexins. *Advances in Traditional Medicine*, 21(1), 31–43. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00442-w>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Breia, R., Conde, A., Badim, H., Fortes, A. M., Gerós, H., & Granell, A. (2021). Plant SWEETs: from sugar transport to plant–pathogen interaction and more unexpected physiological roles. *Plant Physiology*, 186(2), 836–852. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab127>
- Breia, R., Conde, A., Pimentel, D., Conde, C., Fortes, A. M., Granell, A., & Gerós, H. (2020). VvSWEET7 Is a Mono- and Disaccharide Transporter Up-Regulated in Response to Botrytis cinerea Infection in Grape Berries. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01753>
- Brooke, N. (2014). Physicochemical properties. In *Essentials of Environmental Public Health Science* (pp. 9–19). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780199682881.003.0002>
- Bushnell, W. R., Perkins-Veazie, P., Russo, V. M., Collins, J., & Seeland, T. M. (2010). Effects of Deoxynivalenol on Content of Chloroplast Pigments in Barley Leaf Tissues. *Phytopathology*®, 100(1), 33–41. <https://doi.org/10.1094/PHTO-100-1-0033>
- Campbell, C. S., & McInnes, K. J. (1999). Response of In Situ Leaf Psychrometer to Cuticle Removal by Abrasion. *Agronomy Journal*, 91(5), 859–862. <https://doi.org/10.2134/agronj1999.915859x>
- Cao, D., Zhang, Y., Fu, X., Wang, F., Wei, H., Zhou, Q., Huang, Y., & Peng, W. (2023). Uptake, Translocation, and Distribution of Cyantraniliprole in a Wheat Planting System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(13), 5127–5135. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08802>

- Caser, M., D'Angiolillo, F., Chitarra, W., Lovisolo, C., Ruffoni, B., Pistelli, L., Pistelli, L., & Scariot, V. (2018). Ecophysiological and phytochemical responses of *Salvia sinaloensis* Fern. to drought stress. *Plant Growth Regulation*, 84(2), 383–394. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0349-1>
- Celedon, J. M., Whitehill, J. G. A., Madilao, L. L., & Bohlmann, J. (2020). Gymnosperm glandular trichomes: expanded dimensions of the conifer terpenoid defense system. *Scientific Reports*, 10(1), 12464. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69373-5>
- Chanclud, E., & Morel, J. (2016). Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular Plant Pathology*, 17(8), 1289–1297. <https://doi.org/10.1111/mpp.12393>
- Chatterjee, D. (1988). Inhibitory effects of aflatoxin B1 on amylase of maize seed. *Letters in Applied Microbiology*, 7(1), 9–11. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1988.tb01241.x>
- Chen, C.-Y., Selvaraj, P., & Naqvi, N. I. (2023). Functional analysis of auxin derived from a symbiotic mycobiont. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1216680>
- Chen, J., Xu, X., Liu, W., Feng, Z., Chen, Q., Zhou, Y., Sun, M., Gan, L., Zhou, T., & Xuan, Y. (2024). Plasmodesmata Function and Callose Deposition in Plant Disease Defense. *Plants*, 13(16), 2242. <https://doi.org/10.3390/plants13162242>
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B., & Frommer, W. B. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323), 527–532. <https://doi.org/10.1038/nature09606>
- Chen, M. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15(2), 101–114. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00190.x>
- Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., & Mestre, P. (2014a). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6589–6601. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru375>
- Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., & Mestre, P. (2014b). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6589–6601. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru375>
- Christopher PW, M. J. G. J. (2015). *Mycotoxin control in low- and middle-income countries* (M. J. G. J. Christopher PW, Ed.).
- Coleman, J., Blake-Kalff, M., & Davies, E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, 2(4), 144–151. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01019-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01019-4)
- Conrath, U. (2006). Systemic Acquired Resistance. *Plant Signaling & Behavior*, 1(4), 179–184. <https://doi.org/10.4161/psb.1.4.3221>
- Coulombe, R. A. (1993). Biological Action of Mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76(3), 880–891. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77414-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77414-7)

- Cui, L., Ren, Y., Murray, T. D., Yan, W., Guo, Q., Niu, Y., Sun, Y., & Li, H. (2018). Development of Perennial Wheat Through Hybridization Between Wheat and Wheatgrasses: A Review. *Engineering*, 4(4), 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.07.003>
- Cummins, I., Dixon, D. P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M., & Edwards, R. (2011). Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 266–280. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.552910>
- Dalio, R. J. D., Paschoal, D., Arena, G. D., Magalhães, D. M., Oliveira, T. S., Merfa, M. v., Maximo, H. J., & Machado, M. A. (2021). Hypersensitive response: From <scp>NLR</scp> pathogen recognition to cell death response. *Annals of Applied Biology*, 178(2), 268–280. <https://doi.org/10.1111/aab.12657>
- Davis, D. G., Stolzenberg, R. L., & Dusky, J. A. (1984). A Comparison of Various Growth Parameters of Cell Suspension Cultures to Determine Phytotoxicity of Xenobiotics. *Weed Science*, 32(2), 235–242. <https://doi.org/10.1017/S0043174500058872>
- Davies, P. J. (2010). *Plant Hormones* (3rd ed.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7>
- Debergh, P. C., & Maene, L. J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 14(4), 335–345. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(81\)90047-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(81)90047-9)
- Desmond, O. J., Manners, J. M., Stephens, A. E., Maclean, D. J., Schenk, P. M., Gardiner, D. M., Munn, A. L., & Kazan, K. (2008). The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 435–445. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00475.x>
- Deytieux-Belleau, C., Vallet, A., Donèche, B., & Geny, L. (2008). Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(7), 638–646. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.04.008>
- Diaz, I. (2018). Plant Defense Genes against Biotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2446. <https://doi.org/10.3390/ijms19082446>
- Ding, L.-N., Li, Y.-T., Wu, Y.-Z., Li, T., Geng, R., Cao, J., Zhang, W., & Tan, X.-L. (2022). Plant Disease Resistance-Related Signaling Pathways: Recent Progress and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 16200. <https://doi.org/10.3390/ijms232416200>
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell*, 173(6), 1454–1467.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044>
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R. J., Voll, L. M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R., & Kämper, J. (2008a). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant Journal*, 56(2), 181–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03590.x>
- Dorion, S., Ouellet, J. C., & Rivoal, J. (2021). Glutathione Metabolism in Plants under Stress: Beyond Reactive Oxygen Species Detoxification. *Metabolites*, 11(9), 641. <https://doi.org/10.3390/metabo11090641>

Dos Santos, C., & Franco, O. L. (2023). Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. *Plants*, 12(11), 2226. <https://doi.org/10.3390/plants12112226>

Dr. Navya H M. (2020). Aflatoxin Contamination in Agricultural Crops and Their Eco-Friendly Management- A Review. *International Journal of Engineering Research And*, V9(06). <https://doi.org/10.17577/IJERTV9IS060314>

El-Taher EM, A. E.-G. T. M. A. M. A. M. (2012). biosecurity for reducing ochratoxin a productivity and their impact on germination and ultrastructures of germinated wheat grains. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(1), 135–151.

Esquerré-Tugayé, M.-T., Lafitte, C., Mazau, D., Toppan, A., & Touzé, A. (1979). Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions. *Plant Physiology*, 64(2), 320–326. <https://doi.org/10.1104/pp.64.2.320>

Fantozzi, E., Kilaru, S., Gurr, S. J., & Steinberg, G. (2021). Asynchronous development of *Zymoseptoria tritici* infection in wheat. *Fungal Genetics and Biology*, 146, 103504. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103504>

Fernandes, J. C., Goulao, L. F., & Amâncio, S. (2016). Regulation of cell wall remodeling in grapevine (*Vitis vinifera* L.) callus under individual mineral stress deficiency. *Journal of Plant Physiology*, 190, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.007>

Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*, 90, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.004>

Filatova, S., Claassen, B., Torres, G., Krause-Kyora, B., Holtgrewe Stukenbrock, E., & Kirleis, W. (2021). Toward an Investigation of Diversity and Cultivation of Rye (*Secale cereale* ssp. *cereale* L.) in Germany: Methodological Insights and First Results from Early Modern Plant Material. *Agronomy*, 11(12), 2451. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122451>

Filek, M., Sieprawska, A., Kościelniak, J., Oklestkova, J., Jurczyk, B., Telk, A., Biesaga-Kościelniak, J., & Janeczko, A. (2019). The role of chloroplasts in the oxidative stress that is induced by zearalenone in wheat plants – The functions of 24-epibrassinolide and selenium in the protective mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 137, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.030>

Fouché, T., Claassens, S., & Maboeta, M. (2020). Aflatoxins in the soil ecosystem: an overview of its occurrence, fate, effects and future perspectives. *Mycotoxin Research*, 36(3), 303–309. <https://doi.org/10.1007/s12550-020-00393-w>

Frattoni, A., González-Martínez, R. M., García, J. M., Minchev, Z., Pozo, M. J., Flors, V., Crava, C. M., & Herrero, S. (2024). Constitutive and inducible tomato defenses contribute to *Bacillus thuringiensis* lethality against *Spodoptera exigua*. *Biological Control*, 198, 105624. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105624>

Fuller, D. Q., Willcox, G., & Allaby, R. G. (2012). Early agricultural pathways: moving outside the ‘core area’ hypothesis in Southwest Asia. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 617–633. <https://doi.org/10.1093/jxb/err307>

Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G., & Perrone, G. (2016). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.026>

Gazza L, G. E. C. P. (2021, June 15). Agronomic, technological and nutritional characterisation of selected perennial wheat lines grown in Italy. *Proceedings of the Perennial Artisan Grain Workshop*.

Gazza, L., Galassi, E., Ciccoritti, R., Cacciatori, P., & Pogna, N. E. (2016). Qualitative traits of perennial wheat lines derived from different *Thinopyrum* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(2), 209–219. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0240-8>

Giri, C. C., & Zaheer, M. (2016). Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0985-6>

GomezGomez, L. (2004). Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular Immunology*, 41(11), 1055–1062. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.008>

Gupta PK. (2016). *Fundamentals of Toxicology* (Academic Press). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-01775-0>

Gupta, P. K. (2024). Drought-tolerant transgenic wheat HB4®: a hope for the future. *Trends in Biotechnology*, 42(7), 807–809. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.12.007>

Gupta, R., Meghwal, M., & Prabhakar, P. K. (2021). Bioactive compounds of pigmented wheat (*Triticum aestivum*): Potential benefits in human health. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.003>

Haraguchi, H., Kataoka, S., Okamoto, S., Hanafi, M., & Shibata, K. (1999). Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. *Phytotherapy Research : PTR*, 13(2), 151–156. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199903\)13:2<151::AID-PTR391>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199903)13:2<151::AID-PTR391>3.0.CO;2-C)

Hariprasad, P., Durivadivel, P., Snigdha, M., & Venkateswaran, G. (2013). Natural occurrence of aflatoxin in green leafy vegetables. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1908–1913. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.093>

Harms, H. H. (1992). In-vitro systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. *Pesticide Science*, 35(3), 277–281. <https://doi.org/10.1002/ps.2780350313>

Harms, H., & Langebartels, C. (1986). Standardized plant cell suspension test systems for an ecotoxicologic evaluation of the metabolic fate of xenobiotics. *Plant Science*, 45(3), 157–165. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(86\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90135-4)

Hartman, G. L., Pawlowski, M. L., Chang, H.-X., & Hill, C. B. (2016). Successful Technologies and Approaches Used to Develop and Manage Resistance against Crop Diseases and Pests. In *Emerging Technologies for Promoting Food Security* (pp. 43–66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-335-5.00003-2>

Haueisen, J., Möller, M., Eschenbrenner, C. J., Grandaubert, J., Seybold, H., Adamiak, H., & Stukenbrock, E. H. (2019). Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecology and Evolution*, 9(1), 275–294. <https://doi.org/10.1002/ece3.4724>

Hilker, M., & Schmülling, T. (2019). Stress priming, memory, and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*, 42(3), 753–761. <https://doi.org/10.1111/pce.13526>

- Hogg, D. (2000). The Road to Mexico's Green Revolution: Maize Research, 1940–55. In *Technological Change in Agriculture* (pp. 175–208). Palgrave Macmillan UK.
https://doi.org/10.1057/9780333981252_7
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., & Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*, 168(1), 51–62.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>
- Hu, L., Zhang, K., Wu, Z., Xu, J., & Erb, M. (2021). Plant volatiles as regulators of plant defense and herbivore immunity: molecular mechanisms and unanswered questions. *Current Opinion in Insect Science*, 44, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.03.010>
- Huang, H., Liu, B., Liu, L., & Song, S. (2017). Jasmonate action in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1349–1359. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw495>
- Iametti, S., Abbasi Parizad, P. A., Bonomi, F., & Marengo, M. (2019). Pigmented Grains as a Source of Bioactives. In *Encyclopedia of Food Security and Sustainability* (pp. 261–270). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22385-8>
- Infantino, A., Belocchi, A., Quaranta, F., Reverberi, M., Beccaccioli, M., Lombardi, D., & Vitale, M. (2023). Effects of climate change on the distribution of Fusarium spp. in Italy. *Science of The Total Environment*, 882, 163640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163640>
- Iqbal, N., & Poór, P. (2025). Plant Protection by Tannins Depends on Defence-Related Phytohormones. *Journal of Plant Growth Regulation*, 44(1), 22–39. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11291-1>
- Irankhah, S., Chitarra, W., Nerva, L., Antoniou, C., Lumini, E., Volpe, V., Ganjeali, A., Cheniany, M., Mashreghi, M., Fotopoulos, V., & Balestrini, R. (2020). Impact of an arbuscular mycorrhizal fungal inoculum and exogenous MeJA on fenugreek secondary metabolite production under water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104096.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104096>
- Janardhan A, S. D. P. K. A. R. P. M. N. G. (2011). Aflatoxin Impacts on Germinating Seeds. *Scholars Research Library*, 2(2), 180–188.
- Janni, M., Maestri, E., Gulli, M., Marmioli, M., & Marmioli, N. (2024). Plant responses to climate change, how global warming may impact on food security: a critical review. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1297569>
- John, D. A., & Babu, G. R. (2021). Lessons From the Aftermaths of Green Revolution on Food System and Health. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.644559>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
<https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Ju, C., Dong, S., Zhang, H., Yao, S., Wang, F., Cao, D., Xu, S., Fang, H., & Yu, Y. (2020). Subcellular distribution governing accumulation and translocation of pesticides in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*, 248, 126024. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126024>
- Juraschek, L. M., Kappenberg, A., & Amelung, W. (2022). Mycotoxins in soil and environment. *Science of The Total Environment*, 814, 152425. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152425>

- Kachroo, A., & Kachroo, P. (2007). Salicylic Acid-, Jasmonic Acid- and Ethylenemediated Regulation of Plant Defense Signaling. In *Genetic Engineering* (pp. 55–83). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-34504-8_4
- Karban, R. (2011). The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Functional Ecology*, 25(2), 339–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01789.x>
- Kawahigashi, H. (2009). Transgenic plants for phytoremediation of herbicides. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.01.010>
- Khan, P., Tong, L., Khan, S. U., Zhang, C., & Wang, W. (2022). Lignin: a defensive shield halting the environmental stresses – a review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 20(3), 1991–2015. https://doi.org/10.15666/aeer/2003_19912015
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., Kang, S., & Valent, B. (2010). Translocation of *Magnaporthe oryzae* Effectors into Rice Cells and Their Subsequent Cell-to-Cell Movement. *The Plant Cell*, 22(4), 1388–1403. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069666>
- Kim, T.-J., & Lim, G.-H. (2023). Salicylic Acid and Mobile Regulators of Systemic Immunity in Plants: Transport and Metabolism. *Plants*, 12(5), 1013. <https://doi.org/10.3390/plants12051013>
- Kumar N, S. K. (1999). Effect of zearaleonone on some physiological and biochemical processes of gram and mustard seeds. In *Recent advances in phytopathological reserchers* (1st ed., pp. 141–149). M D Publications PVT LTD.
- Kumar, R., Kumar, A., Sharma, N. K., Kaur, N., Chunduri, V., Chawla, M., Sharma, S., Singh, K., & Garg, M. (2016). Soft and Hard Textured Wheat Differ in Starch Properties as Indicated by Trimodal Distribution, Morphology, Thermal and Crystalline Properties. *PLOS ONE*, 11(1), e0147622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147622>
- Kumar, S., Abedin, Md. M., Singh, A. K., & Das, S. (2020). Role of Phenolic Compounds in Plant-Defensive Mechanisms. In *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture* (pp. 517–532). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22
- le Henanff, G., Heitz, T., Mestre, P., Mutterer, J., Walter, B., & Chong, J. (2009). Characterization of Vitis vinifera NPR1 homologs involved in the regulation of Pathogenesis-Related gene expression. *BMC Plant Biology*, 9(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-54>
- Lebel, S., Schellenbaum, P., Walter, B., & Maillot, P. (2010). Characterisation of the Vitis vinifera PR10 multigene family. *BMC Plant Biology*, 10(1), 184. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-184>
- Lee, A., Trinh, C. S., Lee, W. J., Kim, M., Lee, H., Pathiraja, D., Choi, I.-G., Chung, N., Choi, C., Lee, B. C., & Lee, H. (2020). Characterization of two leaf rust-resistant Aegilops tauschii accessions for the synthetic wheat development. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00496-z>
- Lemoine, R., Camera, S. I., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.-L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J., & Durand, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00272>

- Leontovychová, H., Trdá, L., Dobrev, P. I., Šašek, V., Gay, E., Balesdent, M.-H., & Burketová, L. (2020). Auxin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* is associated with enhanced transcription of indole-3-pyruvate decarboxylase LmIPDC2 and tryptophan aminotransferase LmTAM1. *Research in Microbiology*, 171(5–6), 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.05.001>
- Levinson, H., & Levinson, A. (1998). Control of stored food pests in the ancient Orient and classical antiquity. *Journal of Applied Entomology*, 122(1–5), 137–144. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1998.tb01475.x>
- Liu, X., Guan, X., Xing, F., Lv, C., Dai, X., & Liu, Y. (2017). Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. *Food Control*, 82, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.012>
- Liu, Y., Sun, T., Sun, Y., Zhang, Y., Radojčić, A., Ding, Y., Tian, H., Huang, X., Lan, J., Chen, S., Orduna, A. R., Zhang, K., Jetter, R., Li, X., & Zhang, Y. (2020). Diverse Roles of the Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Plant Immunity. *The Plant Cell*, 32(12), 4002–4016. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00499>
- Lopes, N. dos S., Santos, A. S., de Novais, D. P. S., Pirovani, C. P., & Micheli, F. (2023). Pathogenesis-related protein 10 in resistance to biotic stress: progress in elucidating functions, regulation and modes of action. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1193873>
- Macklin, M. G., & Lewin, J. (2015). The rivers of civilization. *Quaternary Science Reviews*, 114, 228–244. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2015.02.004>
- Mamun, M. al, Lee, B.-R., Park, S.-H., Muchlas, M., Bae, D.-W., & Kim, T.-H. (2024). Interactive regulation of immune-related resistance genes with salicylic acid and jasmonic acid signaling in systemic acquired resistance in the *Xanthomonas*–*Brassica* pathosystem. *Journal of Plant Physiology*, 302, 154323. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.154323>
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K., & Amrhein, N. (1993). ATP-dependent glutathione S-conjugate “export” pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, 364(6434), 247–249. <https://doi.org/10.1038/364247a0>
- Martins, V., Soares, C., Spormann, S., Fidalgo, F., & Gerós, H. (2021). Vineyard calcium sprays reduce the damage of postharvest grape berries by stimulating enzymatic antioxidant activity and pathogen defense genes, despite inhibiting phenolic synthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.025>
- Martins, V., Unlubayir, M., Teixeira, A., Lanoue, A., & Gerós, H. (2021). Exogenous Calcium Delays Grape Berry Maturation in the White cv. Loureiro While Increasing Fruit Firmness and Flavonol Content. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.742887>
- Masuda, D., Ishida, M., Yamaguchi, K., Yamaguchi, I., Kimura, M., & Nishiuchi, T. (2007). Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1617–1626. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl298>
- Matossian, M. K. (1981). Mold poisoning: an unrecognized English health problem, 1550–1800. *Medical History*, 25(1), 73–84. <https://doi.org/10.1017/S0025727300034116>

- McLean, M., Berjak, P., Watt, M. P., & Dutton, M. F. (1992). The effects of aflatoxin B1 on immature germinating maize (*Zea mays*) embryos. *Mycopathologia*, 119(3), 181–190. <https://doi.org/10.1007/BF00448817>
- Miller, J. D. (1995). Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. *Journal of Stored Products Research*, 31(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(94\)00039-V](https://doi.org/10.1016/0022-474X(94)00039-V)
- Mitchell, N. J., Bowers, E., Hurburgh, C., & Wu, F. (2016). Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(3), 540–550. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1138545>
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 431–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>
- Monfreda, C., Ramankutty, N., & Foley, J. A. (2008). Farming the planet: 2. Geographic distribution of crop areas, yields, physiological types, and net primary production in the year 2000. *Global Biogeochemical Cycles*, 22(1). <https://doi.org/10.1029/2007GB002947>
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Nathanail, A. v., Varga, E., Meng-Reiterer, J., Bueschl, C., Michlmayr, H., Malachova, A., Fruhmann, P., Jestoi, M., Peltonen, K., Adam, G., Lemmens, M., Schuhmacher, R., & Berthiller, F. (2015). Metabolism of the Fusarium Mycotoxins T-2 Toxin and HT-2 Toxin in Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7862–7872. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02697>
- Navya HM, P. N. S. (2020). Aflatoxin Contamination in Agricultural Crops and Their Eco-Friendly Management- A Review. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, 9(6), 607–619.
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00139>
- Ngou, B. P. M., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2022). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *The Plant Cell*, 34(5), 1447–1478. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>
- Ni, Y., Guo, Y. -J., Wang, J., Xia, R. -E., Wang, X. -Q., Ash, G., & Li, J. -N. (2014). Responses of physiological indexes and leaf epicuticular waxes of *B. rapa* to *S. clerotinia sclerotiorum* infection. *Plant Pathology*, 63(1), 174–184. <https://doi.org/10.1111/ppa.12060>
- OBrian, G. R., Georgianna, D. R., Wilkinson, J. R., Yu, J., Abbas, H. K., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Nierman, W., & Payne, G. A. (2007). The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*, 99(2), 232–239. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832583>
- Orsoni, N., Degola, F., Nerva, L., Bisceglie, F., Spadola, G., Chitarra, W., Terzi, V., Delbono, S., Ghizzoni, R., Morcia, C., Jamiołkowska, A., Mielniczuk, E., Restivo, F. M., & Pelosi, G. (2020). Double Gamers—Can Modified Natural Regulators of Higher Plants Act as Antagonists against Phytopathogens? The Case of Jasmonic Acid Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8681. <https://doi.org/10.3390/ijms21228681>

- Ovando-Martínez, M., Ozsisli, B., Anderson, J., Whitney, K., Ohm, J.-B., & Simsek, S. (2013). Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in Hard Red Spring Wheat Inoculated with *Fusarium Graminearum*. *Toxins*, 5(12), 2522–2532. <https://doi.org/10.3390/toxins5122522>
- Pankin, A., & von Korff, M. (2017). Co-evolution of methods and thoughts in cereal domestication studies: a tale of barley (*Hordeum vulgare*). *Current Opinion in Plant Biology*, 36, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.12.001>
- Parikka, P., Hakala, K., & Tiilikkala, K. (2012). Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(10), 1543–1555. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.680613>
- Pasquet, J.-C., Changenet, V., Macadré, C., Boex-Fontvieille, E., Soulhat, C., Bouchabké-Coussa, O., Dalmais, M., Atanasova-Pénichon, V., Bendahmane, A., Saindrenan, P., & Dufresne, M. (2016). A *Brachypodium* UDP-Glycosyltransferase Confers Root Tolerance to Deoxynivalenol and Resistance to *Fusarium* Infection. *Plant Physiology*, 172(1), 559–574. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00371>
- Peng, X.-L., Xu, W.-T., Wang, Y., Huang, K.-L., Liang, Z., Zhao, W., & Luo, Y.-B. (2010). Mycotoxin Ochratoxin A-induced cell death and changes in oxidative metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 29(2), 153–161. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0808-x>
- Peraica, M., Radić, B., Lucić, A., & Pavlović, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), 754–766.
- Perincherry, L., Ajmi, C., Oueslati, S., Waśkiewicz, A., & Stępień, Ł. (2020). Induction of *Fusarium* lytic Enzymes by Extracts from Resistant and Susceptible Cultivars of Pea (*Pisum sativum* L.). *Pathogens*, 9(11), 976. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110976>
- Pieterse, C. M., & van Loon, L. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.006>
- Pitt, J. I., & Miller, J. D. (2017). A Concise History of Mycotoxin Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7021–7033. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04494>
- Pogorelko, G., Lionetti, V., Bellincampi, D., & Zabolina, O. (2013). Cell wall integrity. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9), e25435. <https://doi.org/10.4161/psb.25435>
- Prezelj, N., Covington, E., Roitsch, T., Gruden, K., Fagner, L., Weckwerth, W., Chersicola, M., Vodopivec, M., & Dermastia, M. (2016). Metabolic Consequences of Infection of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. “Modra frankinja” with Flavescence Dorée Phytoplasma. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00711>
- Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., & Lund, S. T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-27>
- Richard JL, Payne GA, Desjardins AE, Maragos C, Norred, WP III, Pestka JJ, Phillips TD, van Egmond HP, Vardon PJ, Whitaker TB, Wood, G (2003). *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems* (CAST).
- Righetti, L., Bhandari, D. R., Rolli, E., Tortorella, S., Bruni, R., Dall'Asta, C., & Spengler, B. (2021). Unveiling the spatial distribution of aflatoxin B1 and plant defense metabolites in maize using AP-

SMALDI mass spectrometry imaging. *The Plant Journal*, 106(1), 185–199.
<https://doi.org/10.1111/tpj.15158>

Righetti, L., Damiani, T., Rolli, E., Galaverna, G., Suman, M., Bruni, R., & Dall'Asta, C. (2020). Exploiting the potential of micropropagated durum wheat organs as modified mycotoxin biofactories: The case of deoxynivalenol. *Phytochemistry*, 170, 112194. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112194>

Righetti, L., Dellaflora, L., Cavanna, D., Rolli, E., Galaverna, G., Bruni, R., Suman, M., & Dall'Asta, C. (2018). Identification of acetylated derivatives of zearalenone as novel plant metabolites by high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5583–5592.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1066-y>

Righetti, L., Körber, T., Rolli, E., Galaverna, G., Suman, M., Bruni, R., & Dall'Asta, C. (2019). Plant biotransformation of T2 and HT2 toxin in cultured organs of *Triticum durum* Desf. *Scientific Reports*, 9(1), 14320. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50786-w>

Righetti, L., Rolli, E., Dellaflora, L., Galaverna, G., Suman, M., Bruni, R., & Dall'Asta, C. (2021). Thinking Out of the Box: On the Ability of *Zea mays* L. to Biotransform Aflatoxin B1 Into Its Modified Forms. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.599158>

Righetti, L., Rolli, E., Galaverna, G., Suman, M., Bruni, R., & Dall'Asta, C. (2017). Plant organ cultures as masked mycotoxin biofactories: Deciphering the fate of zearalenone in micropropagated durum wheat roots and leaves. *PLOS ONE*, 12(11), e0187247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187247>

Risk, J. M., Selter, L. L., Chauhan, H., Krattinger, S. G., Kumlehn, J., Hensel, G., Viccars, L. A., Richardson, T. M., Buesing, G., Troller, A., Lagudah, E. S., & Keller, B. (2013). The wheat *scp>L</scp> r34* gene provides resistance against multiple fungal pathogens in barley. *Plant Biotechnology Journal*, 11(7), 847–854. <https://doi.org/10.1111/pbi.12077>

Rolli, E., Righetti, L., Galaverna, G., Suman, M., Dall'Asta, C., & Bruni, R. (2018). Zearalenone Uptake and Biotransformation in Micropropagated *Triticum durum* Desf. Plants: A Xenobolomic Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(6), 1523–1532. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04717>

Romero Donato, C. J., Cendoya, E., Demonte, L. D., Repetti, M. R., Chulze, S. N., & Ramirez, M. L. (2022). Influence of abiotic factors (water activity and temperature) on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in a chickpea-based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 379, 109841. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109841>

Roychowdhury, R., Hada, A., Biswas, S., Mishra, S., Prusty, M. R., Das, S. P., Ray, S., Kumar, A., & Sarker, U. (2025). Jasmonic Acid (JA) in Plant Immune Response: Unravelling Complex Molecular Mechanisms and Networking of Defence Signalling Against Pathogens. *Journal of Plant Growth Regulation*, 44(1), 89–114. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11264-4>

Salguero-Linares, J., & Coll, N. S. (2023). Cell death as a defense strategy against pathogens in plants and animals. *PLOS Pathogens*, 19(4), e1011253. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011253>

Sardella, C., Burešová, B., Kotíková, Z., Martinek, P., Meloni, R., Paznocht, L., Vanara, F., & Blandino, M. (2023). Influence of Agronomic Practices on the Antioxidant Compounds of Pigmented Wheat (*Triticum aestivum* spp. *aestivum* L.) and Tritordeum (*× Tritordeum martinii* A. Pujadas, nothosp. nov.) Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(36), 13220–13233.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c02592>

- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., & Carnaghan, R. B. A. (1961). Toxicity associated with Certain Samples of Groundnuts. *Nature*, 192(4807), 1096–1097. <https://doi.org/10.1038/1921096a0>
- Schmeitzl, C., Warth, B., Fruhmann, P., Michlmayr, H., Malachová, A., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Krska, R., & Adam, G. (2015). The Metabolic Fate of Deoxynivalenol and Its Acetylated Derivatives in a Wheat Suspension Culture: Identification and Detection of DON-15-O-Glucoside, 15-Acetyl-DON-3-O-Glucoside and 15-Acetyl-DON-3-Sulfate. *Toxins*, 7(8), 3112–3126. <https://doi.org/10.3390/toxins7083112>
- Schoental, R. (1984). Mycotoxins and the Bible. *Perspectives in Biology and Medicine*, 28(1), 117–120. <https://doi.org/10.1353/pbm.1984.0002>
- Sinha, K. K., & Sinha, A. K. (1993). Effect of aflatoxin B1 on germination index and seedling growth in wheat varieties. *Mycopathologia*, 123(3), 165–169. <https://doi.org/10.1007/BF01111268>
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>
- Stukenbrock, E., & Gurr, S. (2023). Address the growing urgency of fungal disease in crops. *Nature*, 617(7959), 31–34. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-01465-4>
- Taheri, P., Soweizy, M., & Tarighi, S. (2023). Application of essential oils to control some important fungi and bacteria pathogenic on cereals. *Journal of Natural Pesticide Research*, 6, 100052. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100052>
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). <scp>PAMP</scp> s and <scp>DAMP</scp> s: signal Os that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, 249(1), 158–175. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>
- Teetes, G. L. (2009). *Integrated Pest Management* (Edward B. Radcliffe, Rafael E. Cancelado, & William D. Hutchison, Eds.).
- Toffolatti, S. L., Maddalena, G., Passera, A., Casati, P., Bianco, P. A., & Quaglino, F. (2021). Role of terpenes in plant defense to biotic stress. In *Biocontrol Agents and Secondary Metabolites* (pp. 401–417). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822919-4.00016-8>
- Trigiano RN, G. D. (2003). *La coltura dei tessuti vegetali. Nozioni teoriche e pratiche di laboratorio*. Il Sole 24 Ore Edagricole.
- Turlings, T. C., & Tumlinson, J. H. (1992). Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(17), 8399–8402. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8399>
- Turner, J. G., Ellis, C., & Devoto, A. (2002). The Jasmonate Signal Pathway. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S153–S164. <https://doi.org/10.1105/tpc.000679>
- Uhl Karsten. (2022). *Technology in Modern German History* (Bloomsbury Publishing, Ed.; Vol. 1).
- Veluthakkal, R., Sundari, B. K. R., & Dasgupta, M. G. (2012). Tree chitinases – stress- and developmental-driven gene regulation. *Forest Pathology*, 42(4), 271–278. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00759.x>

- Vicré, M., & Lionetti, V. (2023). Editorial: Plant cell wall in pathogenesis, parasitism and symbiosis, Volume II. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1230438>
- Visioli, G., D'Egidio, S., & Sanangelantoni, A. M. (2015). The bacterial rhizobiome of hyperaccumulators: future perspectives based on omics analysis and advanced microscopy. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00752>
- Walczak, H. A., & Dean, J. v. (2000). Vacuolar transport of the glutathione conjugate of trans-cinnamic acid. *Phytochemistry*, 53(4), 441–446. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00563-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00563-4)
- Walter, S., Nicholson, P., & Doohan, F. M. (2010). Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist*, 185(1), 54–66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x>
- Wang, T., Li, Q., Zhang, H., & Chen, J. (2024). Flavonoids from *Citrus reticulata*: Inhibitory activity against pathogenic fungi and biocontrol potential. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 131, 102250. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102250>
- Wang, Y., Li, X., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2021). Regulation and Function of Defense-Related Callose Deposition in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2393. <https://doi.org/10.3390/ijms22052393>
- Wang, Y., Peng, X., Xu, W., Luo, Y., Zhao, W., Hao, J., Liang, Z., Zhang, Y., & Huang, K. (2012). Transcript and protein profiling analysis of OTA-induced cell death reveals the regulation of the toxicity response process in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 63(5), 2171–2187. <https://doi.org/10.1093/jxb/err447>
- Ward, H. M. (1902, June). On the Relations between Host and Parasite in the Bromes and their Brown Rust, *Puccinia dispersa* (Erikss). *Oxford University Press*, 233–315.
- Watts, S., & Kariyat, R. (2023). Are epicuticular waxes a surface defense comparable to trichomes? A test using two *Solanum* species and a specialist herbivore. *Botany*, 101(1), 15–23. <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0206>
- Wormit, A., & Usadel, B. (2018). The Multifaceted Role of Pectin Methylesterase Inhibitors (PMEIs). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2878. <https://doi.org/10.3390/ijms19102878>
- Xie, M., Zhang, J., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Chen, J.-G., & Muchero, W. (2018). Regulation of Lignin Biosynthesis and Its Role in Growth-Defense Tradeoffs. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01427>
- Ye, M., Glauser, G., Lou, Y., Erb, M., & Hu, L. (2019). Molecular Dissection of Early Defense Signaling Underlying Volatile-Mediated Defense Regulation and Herbivore Resistance in Rice. *The Plant Cell*, 31(3), 687–698. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00569>
- Zandt, P. A. van. (2007). Plant defense, growth, and habitat: a comparative assessment of constitutive and induced resistance. *Ecology*, 88(8), 1984–1993. <https://doi.org/10.1890/06-1329.1>
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, E. V., Tsui, C. K.-M., & Nayak, S. C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 182–207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>

- Zhang, J., Coaker, G., Zhou, J.-M., & Dong, X. (2020). Plant Immune Mechanisms: From Reductionistic to Holistic Points of View. *Molecular Plant*, 13(10), 1358–1378. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.09.007>
- Zhong, L., Xu, S., Song, C., Zhao, N., Yang, Z., Liu, Y., Cui, X., Zhang, J., Li, Z., Wang, X., & Gao, M. (2024a). Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression Profile of SWEETs Gene Family in Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Horticulturae*, 10(5), 428. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10050428>
- Zhou, X., Zhong, X., Roter, J., Li, X., Yao, Q., Yan, J., Yang, S., Guo, Q., Distelfeld, A., Sela, H., & Kang, Z. (2021). Genome-Wide Mapping of Loci for Adult-Plant Resistance to Stripe Rust in Durum Wheat Svevo Using the 90K SNP Array. *Plant Disease*, 105(4), 879–888. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1933-RE>
- Zonno, M. C., & Vurro, M. (2002). Inhibition of germination of *Orobanche ramosa* seeds by *Fusarium* toxins. *Phytoparasitica*, 30(5), 519–524. <https://doi.org/10.1007/BF02979757>