



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI
ALIMENTI RISORSE NATURALI E AMBIENTE**

***CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E
TECNOLOGIE AGRARIE***

**La problematica delle aflatossine e strategie
di controllo in mais**

**Relatore: Prof. Teofilo Vamerli
Correlatore: Dott.ssa Anna Panozzo**

**Laureando:
Giosuè Povolo**

Matricola n.: 2074899

Anno accademico 2025-26

INDICE

RIASSUNTO	III
ABSTRACT	V
CAPITOLO 1: IL MAIS	1
1.1 Descrizione botanica	3
1.2 Ciclo biologico	4
1.3 Tecnica colturale	6
1.4 Importanza economica	8
1.5 Situazione in Italia.....	10
CAPITOLO 2: ASPERGILLI AFLATOSSIGENI IN MAIS	13
2.1 Effetti del clima odierno.....	13
2.2 Descrizione micologica	14
2.3 Marciume della spiga	17
2.4 Patosistema e ruolo ecologico delle micotossine	20
2.5 Modelli previsionali	23
CAPITOLO 3: LE AFLATOSSINE	25
3.1 Caratteristiche chimico-fisiche e biosintesi.....	25
3.2 Diffusione e ripercussioni economiche	26
3.3 Effetti delle contaminazioni sul settore agroalimentare	28
3.4 Impatto sulla salute dell'uomo e degli animali	30
3.5 Normative in ambito internazionale.....	31
3.6 Metodi analitici.....	32
3.6.1 Metodi cromatografici	33
3.6.2 Metodi immunochimici	34
3.6.3 Metodi spettroscopici	36

CAPITOLO 4: STRATEGIE DI CONTROLLO DELLE AFLATOSSINE IN MAIS.....	39
4.1 Strategie di pre-raccolta e raccolta	39
4.1.1 Lavorazione del suolo, gestione dei residui colturali e rotazione colturale....	39
4.1.2 Scelta dell'ibrido.....	40
4.1.3 Epoca di semina.....	41
4.1.4 Irrigazione, concimazione, gestione delle malerbe	42
4.1.5 Biocontrollo.....	42
4.1.6 Controllo della piralide del mais	43
4.1.7 Raccolta.....	46
4.2 Strategie di post-raccolta.....	47
4.2.1 Separazione delle partite.....	47
4.2.2 Essiccazione.....	48
4.2.3 Pulitura e detossificazione.....	49
4.2.4 Conservazione	50
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI.....	53
BIBLIOGRAFIA	55
SITOGRAFIA.....	61

RIASSUNTO

Il mais è il cereale più prodotto al mondo e questo grazie alle elevate rese e l'ampio utilizzo in innumerevoli settori. Il settore in cui esso svolge un ruolo da protagonista è quello zootecnico, dove viene impiegato come alimento di base per gli animali da reddito, soprattutto nei Paesi sviluppati. Oltre a essere utilizzato come mangime, il mais si presta bene all'uso industriale in diversi ambiti, tra i quali risultano l'estrazione e la trasformazione dell'amido, l'estrazione dell'olio, la raffinazione di dolcificanti, la distillazione e la produzione di biocombustibili, mentre l'utilizzo alimentare diretto è maggiormente diffuso nei Paesi in via di sviluppo. Tuttavia, questa coltura risulta molto soggetta ad avversità biotiche e abiotiche di varia origine; una delle avversità che desta particolare preoccupazione è rappresentata dai funghi aflatossigeni del genere *Aspergillus*, specialmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Questi funghi, appartenenti alla divisione degli Ascomiceti, sono saprofiti del suolo opportunisti che, in condizioni di stress ambientale, prevalgono sugli altri patogeni fungini e infettano colture come il mais, approfittando della vulnerabilità delle piante indotta dallo stress termico e idrico; il clima, quindi, ricopre un ruolo chiave. In tale situazione, questi funghi possono sintetizzare aflatossine, metaboliti secondari noti per la loro elevata pericolosità (cancerogenicità) nei confronti dell'uomo e degli animali. Varie sono le ipotesi riguardo l'utilità ecologica di queste tossine, ma quella più accreditata sostiene che la loro biosintesi sia il mezzo mediante il quale il fungo attenua lo stress ossidativo presente nel suo organismo, che è indotto dalle sostanze di difesa della pianta ospite e da condizioni ambientali avverse. Le ripercussioni economiche della contaminazione da aflatossine sono ingenti e difficilmente quantificabili poiché tali tossine hanno un effetto sui settori agricolo, zootecnico, alimentare e sanitario. Le contaminazioni da aflatossine nelle colture gravano inevitabilmente sul settore agroalimentare, minacciando la salute dell'uomo e degli animali. Il mais, che presenta un'elevata vulnerabilità ai funghi aflatossigeni ed è ampiamente utilizzato come alimento su scala globale, rappresenta una delle principali vie di esposizione umana e animale alle aflatossine. Per tale motivo, risulta urgente l'attuazione di tutte quelle strategie di controllo delle contaminazioni nelle colture e nei prodotti che ne derivano, partendo dalla prevenzione nel pre- e post-raccolta fino ad arrivare alla mitigazione della contaminazione e all'emanazione di normative specifiche.

ABSTRACT

The problem of aflatoxins and control strategies in maize

Corn is the most widely produced cereal in the world thanks to its high yield and remarkable versatility, which means it is widely used in countless sectors. The sector in which it plays a leading role is animal husbandry, where it is used as a staple food for livestock, especially in industrialized Countries. In addition to being used as feed, maize is well suited for industrial use in various areas, including starch extraction and processing, oil extraction, sweetener refining, distillation and biofuel production, while direct food use is more frequent in developing Countries. However, this crop is highly susceptible to biotic and abiotic adversities of various origins; one of particular concern is represented by aflatoxigenic fungi of the genus *Aspergillus*, especially *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. These fungi, belonging to the Ascomycetes division, are opportunistic soil saprophytes which, under conditions of environmental stress, prevail over other fungal pathogens and infect crops such as maize, taking advantage of the vulnerability of plants induced by heat and drought stress; climate, therefore, plays a key role. In such conditions, these fungi can synthesize aflatoxins, that are secondary metabolites known for their high toxicity (carcinogenicity) to humans and animals. There are various hypotheses regarding the ecological role of these toxins, but the most widely accepted one is that their biosynthesis is the means by which the fungus mitigates the oxidative stress present in its organism, which is induced by the host plant's defense substances and adverse environmental conditions. The economic consequences of aflatoxins are very important and difficult to predict, as these toxins have a wide-ranging effect on the agricultural, livestock, food and health sectors. Aflatoxin contamination in crops inevitably weighs heavily on the agri-food sector, threatening human and animal health, especially in the case of maize, whose high vulnerability to aflatoxigenic fungi, combined with its widespread use in food on a global scale, makes it one of the main paths of human and animal exposure to aflatoxins. For this reason, it is urgent to implement all strategies aimed at controlling contaminations in crops and derived products, starting with pre- and post-harvest prevention, through to the mitigation of contamination phenomena and the enactment of specific regulations.

CAPITOLO 1:

IL MAIS

I cereali, fin dall'inizio della civiltà, sono stati gli alimenti di base per l'uomo e per l'allevamento degli animali. Grazie all'elevato apporto di energia derivante dall'amido, all'abbondanza di carboidrati, proteine, vitamine del gruppo B, minerali e fibre e alla loro economicità, disponibilità e conservabilità, i cereali sono considerati la fonte di cibo più importante al mondo, sia nei Paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo (McKevith, 2004). I tre cereali principali sono mais, riso e frumento; il mais è il primo cereale al mondo per quantità prodotta, seguito poi da riso e frumento, mentre vanta il secondo posto per estensione coltivata, dopo il frumento (FAOSTAT, 2024). Questo rende evidente l'elevata resa del mais per unità di superficie. Frumento e riso sono considerati principalmente colture alimentari, mentre il mais viene utilizzato maggiormente nell'industria e, soprattutto, come mangime in ambito zootecnico (Garcia-Lara e Serna-Saldivar, 2019).

Il mais (*Zea mays* dal greco "pane di vita"), ha avuto origine negli altopiani del Messico tra 7.000 e 10.000 anni fa e, nonostante ciò, la sua elevata adattabilità consente una coltivazione che spazia da 58° Nord a 40° Sud di latitudine. Non è ancora stato riconosciuto allo stato spontaneo e tra le varie teorie, quella maggiormente accettata sostiene che il Teosinte (*Euchlaena mexicana*) è il progenitore alla base dell'origine evolutiva del mais, in quanto presenta: lo stesso corredo cromosomico (n=10), frequente e spontanea ibridazione in ambiente naturale e alcune caratteristiche anatomiche simili, come la separazione tra infiorescenze maschili e femminili in parti diverse della pianta (Garcia-Lara e Serna-Saldivar, 2019).

La diffusione di questo cereale è avvenuta grazie a Cristoforo Colombo, che dopo la scoperta delle Americhe lo importò in Spagna; venne introdotto poi in Veneto ad inizio 1.500, dove si diffuse lentamente, per poi arrivare in Lombardia e Piemonte. Dal diciottesimo secolo si diffuse nel resto d'Italia, nel Sud della Francia e in Spagna, mentre in Europa la coltivazione si diffuse molto lentamente, affermandosi in epoca relativamente più recente (Enciclopedia Treccani).

Il mais a livello globale viene coltivato annualmente su una superficie di circa 200 milioni di ettari, con una produzione complessiva di 1,1 miliardi di tonnellate di granella

e una resa media globale di 5,8 t/ha. La superficie globale a mais si concentra principalmente nelle Americhe e in Asia, seguite poi da Africa ed Europa (Erenstein et al., 2022) (Fig. 1.1). Bisogna sottolineare però, che alcune aree come Americhe, Europa, Cina e Oceania, contribuiscono alla produzione globale in modo più che proporzionale rispetto a quella che è la loro superficie coltivata (Fig. 1.1), con rese significativamente superiori rispetto alla media (superiori a 10 t/ha) (Garcia-Lara e Serna-Saldivar, 2019).

In Europa i maggiori produttori di granella di mais sono Ucraina, Francia, Federazione Russa, Polonia e Romania, mentre l'Italia è al nono posto (FAOSTAT, 2024).

In Italia la superficie totale a mais è di circa 917.000 ettari, suddivisi in 541.000 ettari destinati alla produzione di granella e 376.000 ettari destinati ad insilato di mais; la produzione di granella si attesta a 5,5 milioni di tonnellate (ISTAT, 2025), con un grado di autoapprovvigionamento del 42% (ISMEA, 2023). Il Nord Italia concorre per circa il 90% dell'estensione e della produzione nazionale, sia per quanto riguarda la granella, sia per l'insilato.

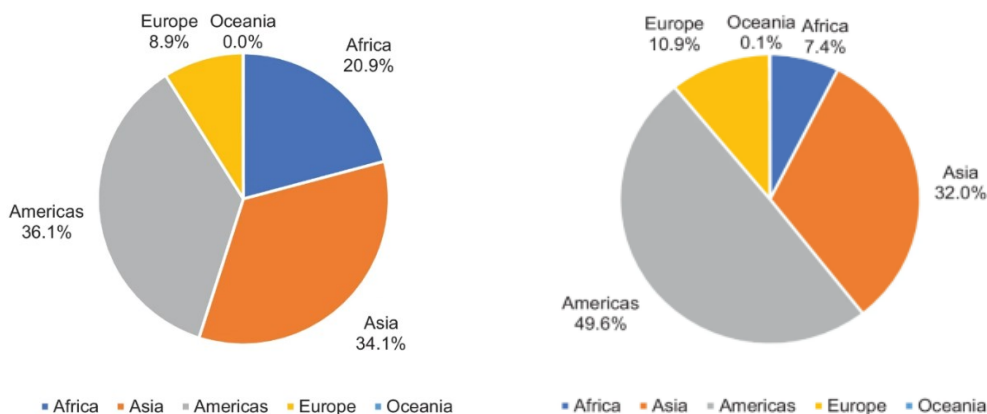


Figura 1.1 Quota di superficie coltivata a mais per regione (sinistra) e quota di produzione di mais per regione (destra) (fonte: Erenstein et al., 2022).

1.1 Descrizione botanica

Classe: *Monocotyledones* (ora *Liliopsida*)

Ordine: *Glumiflorae*

Famiglia: *Graminaceae* (ora *Poaceae*)

Sottofamiglia: *Andropogonoideae*

Tribù: *Maydeae*

Specie: *Zea mays* L.

Il mais in fase di germinazione emette le radici embrionali, che comprendono le radici seminali (solitamente tre o più), derivanti dal nodo scutellare presente nell'embrione, e le radici primarie, che hanno origine dalla radichetta embrionale. Le radici embrionali hanno funzione temporanea e vengono sostituite gradualmente dalle radici post-embriionali, comprendenti le radici a corona che si dipartono dai primi quattro nodi compresi e i successivi due allungati (tutti e sei presenti sotto o sulla superficie del suolo), e le radici di sostegno (aeree), che invece si dipartono dai nodi al di sopra della superficie del suolo; le radici post-embriionali possono arrivare a una profondità di circa 1,5 metri (Assefa et al., 2013).

Per quanto concerne la parte epigea, durante la fase germinativa il cotiledone rimane nel suolo, mentre l'asse epicotile si allunga, portando gli abbozzi di culmo e foglie in superficie. Il culmo è costituito da 8-21 nodi e internodi, raggiungendo un'altezza media tipica degli ibridi di mais di 2,7 metri. Le foglie (circa 12-18), sono alterne e distiche, disposte una per nodo (Buffoli, 2014-2015; Assefa et al., 2013) (Fig. 1.2). Sono in fase di test ibridi a taglia ridotta con semina fitta.

Il mais è una specie monoica diclina con fiori incompleti ed imperfetti (Assefa et al., 2013), quindi coesistono nella pianta: pannocchia (panicolo) apicale, cioè l'infiorescenza maschile che è posta al di sopra della foglia a bandiera, e spiga (spadice), cioè l'infiorescenza femminile, che è posta all'ascella della quinta-sesta foglia ed è rivestita da brattee dalle quali fuoriescono all'apice lunghe setole fiorali. Questa separazione tra strutture fiorali permette il facile incrocio tra linee *inbred* per la produzione di ibridi, in quanto la potenziale autoimpollinazione, anche se di minima entità, viene azzerata attraverso l'emasculazione della linea portaseme o con il ricorso di linee maschiosterili.

Dal punto di vista fisiologico la pianta di mais è brevidiurna e possiede un metabolismo fotosintetico di tipo C4, ciò significa che la fotosintesi è molto efficiente; data l'elevata produttività abbisogna di molta acqua, ma viene utilizzata molto efficientemente (coefficiente idrico: 300 g acqua/g s.s.); ha un punto di saturazione fotosintetica alla radiazione molto elevato (circa $3.000 \mu\text{Mol/m}^2/\text{sec PAR}$; $>100.000 \text{ Lux}$) e le esigenze termiche aumentano all'avanzare del ciclo, passando da una temperatura minima di 10-12°C per la germinazione, a 22-28°C per la fase di accrescimento e fioritura, mentre la temperatura critica superiore è 32-33°C.

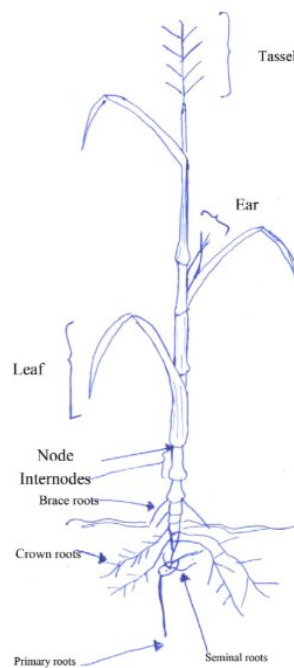


Figura 1.2 Rappresentazione schematica di una pianta matura di mais
(fonte: Assefa et al., 2013).

1.2 Ciclo biologico

In agronomia, sono disponibili numerose tipologie di scale fenologiche; esse sono necessarie alla codifica degli stadi di sviluppo delle piante. Ricorrente negli Stati Uniti è l'utilizzo della scala americana Iowa, il sistema di codifica dello Stato dell'Iowa per quanto riguarda il ciclo biologico del mais. Questa scala suddivide le fasi di sviluppo in stadi vegetativi (V) e stadi riproduttivi (R), ciascuna identificata con l'apposizione di un

numero dopo le lettere soprascritte (Nleya et al., 2016). Il ciclo biologico del mais (Fig. 1.3) si articola nel seguente ordine:

- VE; emergenza.
- Successivamente si susseguono gli stadi V1, V2. V3 fino a Vn; questi indicano ciascuno l'emissione di una nuova foglia vera con collare visibile (zona di transizione tra guaina e lamina).
- V6-V7; con il raggiungimento di un apparato radicale ben formato, avviene un rapido allungamento del culmo e inizia lo sviluppo/differenziazione delle spighe femminili. Le foglie inferiori iniziano a degenerare.
- V8-V11; sono presenti molti abbozzi di spighe ma solo uno o due (quelli superiori) arrivano a completa formazione.
- V12 e più; fase che precede VT, il numero di foglie raggiunto è influenzato da vari fattori (es. tipologia dell'ibrido). In questa fase si determina il numero potenziale di cariossidi per spiga e la dimensione di quest'ultima.
- VT; pannocchia apicale maschile completamente formata (T = tasseling). Il mais è proterandro, quindi questa fioritura precede quella femminile di qualche giorno; infatti, in questa fase la spiga è priva di sete fiorali.
- R1; la comparsa delle sete fiorali determina l'inizio dello stadio riproduttivo in quanto esse sono ricettive e quindi può avvenire impollinazione. Condizioni di siccità ed elevate temperature possono portare al disseccamento delle sete e alla mortalità del polline.
- R2; ha avvio la formazione delle cariossidi e l'accumulo di amido. Esse presentano un aspetto biancastro e simile ad una vescicola, in quanto contenenti liquido trasparente.
- R3; maturazione latte della cariosside, che presenta una colorazione gialla esternamente e un liquido lattiginoso all'interno.
- R4; maturazione cerosa della cariosside, al cui interno si ha la trasformazione da una consistenza lattiginosa ad una consistenza cerea.

- R5; formazione del dente nella cariosside, all'interno della quale è distinguibile la linea lattiginosa, che separa l'area gialla (solido-amidacea) da quella bianca (liquido-lattiginosa), e con l'avanzare della maturazione si sposta verso la punta della cariosside.
- R6; maturazione fisiologica della cariosside, in cui la linea lattiginosa ha raggiunto la punta, mentre alla base compare una linea nera (black layer), che indica il disseccamento e la morte dei tessuti di giunzione con la parte materna e la cessazione della nutrizione della granella.

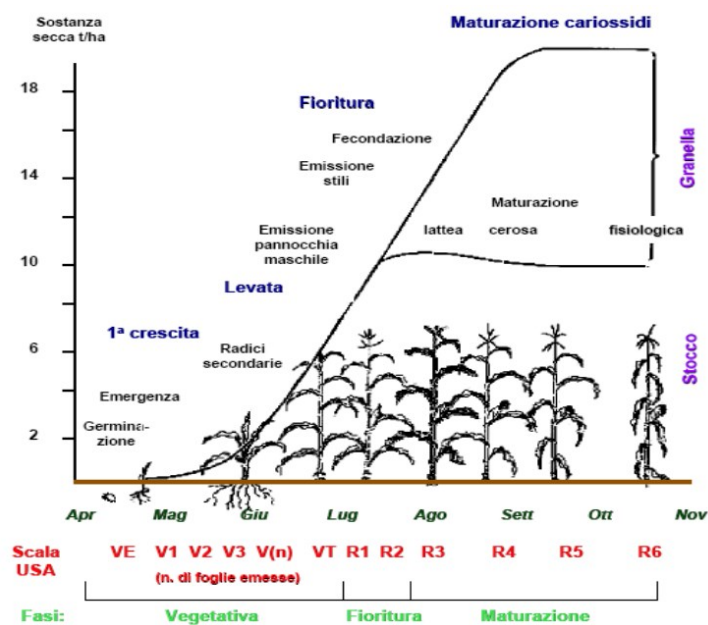


Figura 1.3 Rappresentazione grafica del ciclo biologico del mais (fonte: Acutis).

1.3 Tecnica colturale

Il mais è una coltura miglioratrice e da rinnovo dato che la preparazione del suolo comporta lavorazioni spesso profonde, letamazioni e sarchiature. Non presenta problemi autoallelopatici, quindi tollera la monosuccessione mantenendo una produzione stabile nel tempo; questo tuttavia dovrebbe essere evitato, perché comporta l'affermazione di infestanti, parassiti e patogeni tipici degli appezzamenti di mais. Trae vantaggio dall'avvicendamento in successione a leguminose (es. soia) o prato, dei quali sfrutta rispettiva-

mente azoto e sostanza organica rilasciati nel terreno sottoforma di residui colturali, mentre l'avvicendamento con cereali autunno-vernini (es. frumento) permette di interrompere i cicli di infestanti, parassiti e patogeni (Ruralp – Milano, Italia; Icl Italia – Milano, Italia).

La lavorazione tradizionale del suolo prevede lavorazioni profonde quindi aratura (fino a 40 cm, utile per l'interramento del letame) o ripuntatura, spesso eseguite in autunno dopo la raccolta della coltura precedente; nella primavera successiva, avviene prima una rottura della zollosità tramite erpicatura a dischi, mentre a ridosso della semina seguono una o più erpicature con erpice rotante per l'affinamento del letto (Ruralp).

La semina tradizionale per primo raccolto può avvenire, al Nord Italia, da inizio aprile in poi; più è tardiva più sarà corto il ciclo dell'ibrido da coltivare, quindi la resa inferiore, per questo è importante non superare la prima decade di maggio. Tuttavia, negli ultimi anni, con l'innalzamento delle temperature medie mensili, la tendenza è la semina anticipata a partire da metà marzo, che consente l'allungamento del ciclo, l'asincronia con i cicli di parassiti e patogeni e l'anticipo della fioritura di due o tre settimane (fine giugno), fase cruciale vulnerabile allo stress idrico, che statisticamente coincide con un periodo più piovoso e fresco. Il secondo raccolto viene seminato dopo la raccolta dei cereali autunno-vernini, da inizio giugno a inizio luglio. L'investimento tende solitamente a 7-8 piante/m² con interfila di 75 cm.

Tenendo conto dell'eventuale letamazione, la concimazione fosfo-potassica si esegue in presemina o alla semina, mentre quella azotata (200-300 kg/ha) viene suddivisa in una quota del 30% in presemina e il restante è distribuito in copertura tramite sarchiature.

L'irrigazione nella maiscoltura è quasi sempre indispensabile dato l'elevato fabbisogno idrico (600 mm); permette di mantenere elevata la produzione e di evitare lo stress idrico, che rende anche la pianta vulnerabile ad attacchi da parte di funghi patogeni del genere *Aspergillus*. Gli interventi irrigui eseguiti dalla prefioritura alla fecondazione risultano particolarmente efficaci.

Le malerbe tipiche sono circa una quindicina, ma le più difficili da contenere sono sorghetta (*Sorghum halepense*) e cencio molle (*Abutilon theophrasti*) che vengono controllate principalmente con trattamenti di post-emergenza, in quanto i pre-emergenza sono talora inefficaci.

Anche gli insetti fitofagi dannosi sono molteplici, ma spiccano tra questi la diabrotica (*Diabrotica virgifera*) che si nutre di radici e setole fiorali, e la piralide (*Ostrinia nubilalis*),

i cui danni principali sono le rosure su tutolo e granella, che facilitano l'attacco da parte di patogeni fungini e causano la perdita di raccolto, e le gallerie nel fusto, che causano stroncamenti di piante. I principali patogeni appartengono ai generi *Aspergillus* (muffa verde) e *Fusarium* (muffa rosa); *Aspergillus* è favorito da estati calde e siccitose e può produrre aflatossine, mentre *Fusarium* è favorito al contrario da estati fresche e piovose e può produrre principalmente deossinivalenolo (DON) e fumonisine. Le sostanze appena descritte sono micotossine e nella presente tesi si parlerà più specificatamente delle aflatossine.

La granella viene raccolta a partire da umidità inferiori al 28-30%, alla comparsa del punto nero sulle cariossidi (da metà-fine settembre), e successivamente essiccata fino ad un'umidità del 13-15%. Se la destinazione d'uso è il pastone di mais, l'umidità della granella alla raccolta è del 35% (due settimane prima della granella secca), mentre per l'uso ad insilato, la pianta intera viene trinciata allo stadio di maturazione cerosa (30-35% s.s.) e successivamente insilata (metà-fine agosto).

1.4 Importanza economica

In raffronto a riso e frumento il mais è più versatile e polivalente (Erenstein et al., 2022), e la sua ampia disponibilità a livello globale, dovuta all'aumento delle rese all'inizio degli anni duemila, ha permesso la crescita di nuove filiere (Pasti, 2013). In primo luogo, però, come afferma Frisio (2010) "l'importanza del mais è legata essenzialmente al suo ruolo di attivatore della filiera zootecnica", infatti, in numerosi Paesi sviluppati, più dell'85% del mais prodotto o importato è impiegato per l'alimentazione zootecnica (Garcia-Lara e Serna-Saldivar, 2019) a cui seguono gli usi industriali ed energetici. Per quanto riguarda i Paesi meno sviluppati dell'Africa subsahariana, America Latina e Asia, esso rappresenta invece una coltura alimentare consolidata, coprendo più del 20% delle calorie alimentari (Erenstein et al., 2022). A livello globale la granella di mais è impiegata per il 56% come alimento per animali, il 20% per usi non alimentari e il 18% per uso alimentare umano (diretto o trasformato), ma va sottolineato che il suo contributo come alimento per l'uomo non è da ridurre alla percentuale soprascritta, ma anzi, il consumo indiretto del mais, cioè degli alimenti derivanti da animali con esso alimentati, supera il

consumo diretto; oltretutto gli alimenti di origine animale come latte, carne e uova presentano proteine di alto valore biologico e un elevato contenuto nutrizionale rispetto al cereale in origine (Erenstein et al., 2022).

La polivalenza del mais è da attribuire alle varie subspecie (farinoso, vitreo, amiloso, cereo, dolce, da scoppio) e ad altre tipologie che si differenziano per endosperma, tipo di amido, colore, contenuto in olio e proteine. La macinazione a secco è utilizzata per ottenere farine per uso alimentare mentre la macinazione ad umido permette la separazione delle varie componenti della cariosside come amido, proteine, olio e fibre (Erenstein et al., 2022); tali componenti sono il punto di partenza per ulteriori trasformazioni, ad esempio la trasformazione dell'amido per svariati campi d'applicazione (amidi modificati), la raffinazione di dolcificanti (es. HFCS), la distillazione per ottenere alcolici e la produzione di bioetanolo per autotrazione. Tutti questi processi generano sottoprodotti, i quali possono essere impiegati come mangimi (Erenstein et al., 2022) o essere ulteriormente lavorati: semola glutinata da cui si estraggono peptidi e zeaxantina, brattee da cui si estraggono xilo-oligosaccaridi e fibre alimentari (Jiao et al., 2022), residui colturali cioè tutolo, stocco e foglie da cui si estraggono cere, xilitolo e furfurolo (Fu et al., 2023), e granella di distillazione essiccata (DDGS) derivante dalla produzione del bioetanolo, da cui si estrae olio per la sintesi di biodiesel (Veljković et al., 2018).

A fronte di ciò, si può affermare che questa preziosa coltura deve essere salvaguardata, per consentire produzioni in quantità e qualità che soddisfino tutti i settori produttivi; risulta quindi fondamentale ridurre le perdite di pre- e post-raccolta, studiando nuove soluzioni per la prevenzione e la difesa. Gadag et al. (2021) sostengono che la produzione globale di mais sia a rischio a causa della vulnerabilità ad innumerevoli parassiti e malattie, che implicano una perdita di resa globale annua del 20-41%. I modelli di Deutsch et al. (2018) prevedono per i tre cereali più coltivati al mondo (mais, riso e frumento) che le perdite di resa dovute ai soli insetti aumenteranno del 10-25% per ogni grado Celsius di riscaldamento del clima. Per quanto attiene ai patogeni, essi comprendono tra i vari, anche i funghi, agenti di malattia delle piante ma forse ancor più importante, produttori di micotossine. La stima precisa dell'impatto economico delle contaminazioni da micotossine non è cosa facile poiché le implicazioni negative sono innumerevoli; costi relativi a perdite di produzione, campionamenti/analisi, programmi di ricerca e detossificazione delle

partite, senza contare le conseguenze sulla salute dell'uomo e degli animali (Goda et al., 2025).

1.5 Situazione in Italia

La maiscoltura italiana ha subito dagli anni del secondo dopoguerra fino ai giorni nostri, un'ascesa ed un declino (Pasti, 2023); dal secondo dopoguerra le rese subirono un forte aumento grazie al miglioramento genetico, con l'introduzione degli ibridi, e agronomico, alla politica agricola comunitaria (PAC), che sosteneva i prezzi interni all'Unione Europea, e agli investimenti per le infrastrutture (Pasti, 2013) (Fig. 1.4). Negli anni '90 la produzione nazionale arrivò a superare le 10 milioni di tonnellate, momento fino al quale a partire dagli anni '50 l'incremento annuale delle rese era di circa 180 kg/ha, portando sempre più al rafforzamento del rapporto tra maiscoltura e allevamento e allo sviluppo del suo uso nell'industria (Pasti, 2013; Pasti, 2023). Tuttavia, dalla metà degli anni '90/inizio 2000 la situazione cambiò: il sostegno dei prezzi tramutò in contributo disaccoppiato, il miglioramento genetico rallentò con il divieto di coltivazione del mais transgenico e gli investimenti in infrastrutture diminuirono (Pasti, 2013) comportando prima la stagnazione e poi la riduzione della produzione nazionale (Fig. 1.4). Dunque, da un'autosufficienza produttiva nella metà degli anni '90/inizio 2000, si è arrivati ora ad un'importazione del 55% (Reyneri, 2024). Ad oggi, come confermato alla Giornata del mais del CREA (2025), i problemi sono accentuati da condizioni meteorologiche disomogenee, spesso caratterizzate da alternanza tra siccità e piogge intense, sfavorevoli per le varie fasi del ciclo di sviluppo. A questo si aggiungono la volatilità dei prezzi mondiali delle commodity con il contemporaneo aumento dei costi di produzione, e il sempre maggiore rischio sanitario delle micotossine, aggravato dalle peggiorate condizioni climatiche (ISMEA, 2023). Nonostante ciò, le filiere e i consumatori richiedono il rispetto di specifici aspetti qualitativi, sanitari e ambientali (Reyneri, 2024); come evidenziato nel Piano di settore del mais del 2019, i maiscoltori devono essere sostenuti nel processo di valorizzazione qualitativa del prodotto, in un'ottica di trasformazione da commodity a *specialty*, permettendogli quindi di rispondere alle esigenze di industrie mangimistiche e produzioni zootecniche specifiche (es. Grana Padano) (ISMEA, 2023), e recuperare valori di prezzo più elevati.

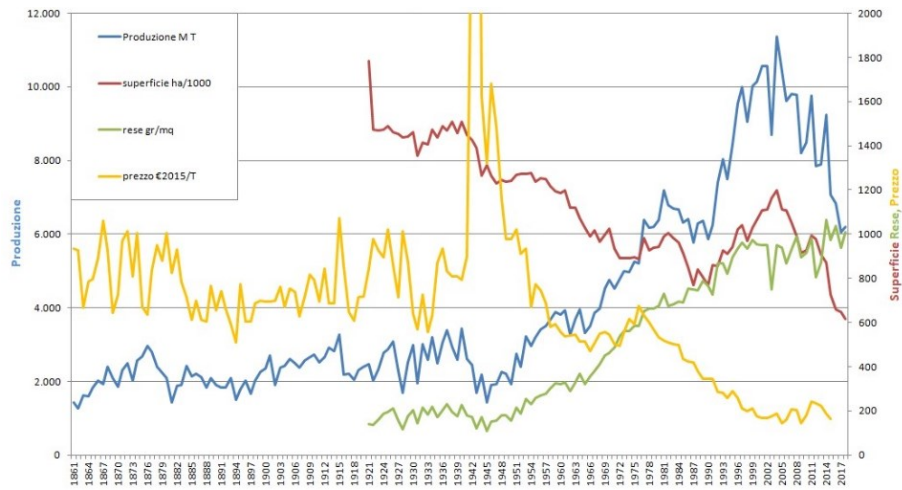


Figura 1.4 Andamento di produzioni, superfici, rese e prezzi in Italia (fonte: Edagricole).

CAPITOLO 2:

ASPERGILLI AFLATOSSIGENI IN MAIS

2.1 Effetti del clima odierno

L'atmosfera è un sottile strato gassoso la cui fondamentale importanza risiede nel permettere la vita sulla Terra, fornendo ossigeno e assicurando una temperatura adeguata. I gas di cui essa è composta, ad esempio vapore acqueo, anidride carbonica, ozono, protossido di azoto e metano, sono in grado di assorbire la radiazione termica emessa dal suolo e di riemetterla a loro volta, anche se ciascuno con capacità climalterante diversa; tale fenomeno viene definito "effetto serra" (Lacis et al., 2010). Dunque, il clima, direttamente influenzato dalla chimica e dalla fisica dell'atmosfera (Battilani et al., 2012), risulta dipendente dalla variazione delle proporzioni dei gas atmosferici indotta dalle attività antropiche e naturali, che ne causa il riscaldamento.

L'alterazione del clima comporta una serie di problematiche interconnesse, prima di tutto anche se implicite, la diversa composizione dell'aria e la variazione delle temperature, riassumibili però in un unico problema finale: il disequilibrio degli ecosistemi. Tuttavia, mentre gli ecosistemi naturali presentano una certa stabilità, gli agroecosistemi essendo frutto della manipolazione da parte dell'uomo, sono maggiormente suscettibili. Più in specifico, per quanto riguarda la coltivazione del mais, Erenstein et al. (2022) sottolineano che gli areali di coltivazione del mais muteranno gradualmente a causa del cambiamento climatico, rendendo sempre più ricorrenti e/o impattanti gli stress di tipo biotico e abiotico.

Il cambiamento del clima è causa dell'aumento di incidenza delle malattie fungine (Goda et al., 2025) poiché può soddisfare le esigenze di sviluppo degli agenti di malattia, date le ricorrenti condizioni meteorologiche estreme, al contempo indebolire le difese delle piante ospiti, che subiscono stress di tipo ambientale, e favorire i danni da insetti, facilitando l'entrata dei patogeni nei tessuti dell'ospite (Battilani et al., 2012).

I funghi filamentosi sono onnipresenti, possono infettare le piante coltivate e le derivate; è stato stimato che ad essi è dovuto il 15% delle perdite dei raccolti ogni anno (Goda et al., 2025). Motivo di particolare preoccupazione per quanto riguarda i patogeni fungini, oltre che alle perdite in termini produttivi, è la presenza di specie in grado di produrre

alcuni metaboliti noti con il nome di “micotossine”, la cui pericolosità risiede nell’entrare nelle catene alimentari (Goda et al., 2025), direttamente o tramite le produzioni zootecniche, ponendo un rischio per la salute dell’uomo e degli animali per effetto della loro tossicità o cancerogenicità. Nel caso specifico del mais tale problematica è dovuta a specie fungine del genere *Aspergillus* e *Fusarium*. Le specie di *Aspergillus* prevalgono nei cereali; in uno studio basato sull’analisi dei principali cereali commercializzati, *Aspergillus* spp. è stato identificato con tassi di isolamento del 100% in mais, 88% in frumento, 78% in riso e 14% in avena (Alkuwari et al., 2022).

2.2 Descrizione micologica

Gli aspergilli sono tra i funghi economicamente più impattanti, infatti, sono patogeni dell’uomo, di piante e animali e agenti di marciumi delle derrate (Klich, 2007).

Colture e prodotti agricoli sono comuni substrati degli aspergilli (Zakaria, 2024) e pochi sono quelli da cui non sia possibile isolarli (Pitt e Hocking, 2022). Il genere *Aspergillus* si divide in diverse sezioni, tra le quali, la sezione *Flavi*, comprendente varie specie alcune delle quali micotossigene e comuni nel mais. Le due specie ricorrenti nel mais sono *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, molto conosciute in quanto produttrici di una specifica micotossina: l’aflatossina, una delle sostanze naturali più pericolose. Oltre ad essa vengono prodotti altri metaboliti come aflatrem, acido ciclopiazonico e acido cogico. L’aflatossina è sintetizzata anche da altre specie, sia della sezione *Flavi* ad esempio *A. niger* e *A. tamarii*, che non, come *A. aflatosiformans*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii* e *A. sergii* (Katati et al., 2024).

Aspergillus flavus e *A. parasiticus* sono morfologicamente e fisiologicamente molto simili tra loro, tali che Kurtzman et al. (1986) classificarono il secondo sottospecie del primo, anche se ci sono differenze convincenti per classificarli come specie separate (Pitt e Hocking, 2022). Sono ascomiceti molto diffusi in natura, vivono come saprofiti liberi nel suolo, contribuendo alla decomposizione della materia organica, e sono xerofili, quindi adatti ad ambienti molto caldi e siccitosi (Battilani et al., 2013; Chalivendra et al., 2017); il suolo, quindi, risulta essere il principale inoculo per l’infezione delle colture (Katati et al., 2024). Nel caso in cui le condizioni si rendano favorevoli, ad esempio la presenza di una pianta ospite ricca di sostanze nutritive, *A. flavus* può comportarsi da

opportunista trasformandosi temporaneamente in un patogeno necrotrofo epifita, maccando i tessuti vegetali, di cui si nutre successivamente (Chalivendra et al., 2017). Mentre *A. flavus* predilige l'opportunismo, e di conseguenza l'ambiente epigeo e fogliare delle piante che esso infetta, *A. parasiticus* manifesta una prevalente attitudine al saprofitismo, con un maggiore adattamento all'ambiente terricolo (Battilani et al., 2013; Chalivendra et al., 2017).

Premesso che l'aflatossina presenta numerose varianti tra cui B1, B2, G1 e G2, oltre alle differenti nicchie ecologiche, queste due specie sintetizzano ciascuna solo determinati tipi di aflatossine; *A. flavus* prevale nella sintesi del tipo B1 ma non sintetizza né G1 né G2, invece, *A. parasiticus* possiede un apparato di sintesi più complesso e può sintetizzare sia i tipi B che G. Ne deriva che nelle colture e nei prodotti agricoli siano più frequenti aflatossine B, dato l'habitus di *A. flavus* (Chalivendra et al., 2017).

Aspergillus flavus in coltura, mostra una rapida crescita e colonie di colore giallo-verde brillante di circa 65-70 millimetri di diametro, in seguito ad una crescita al buio di 7 giorni a 25°C su substrato CYA (Fig. 2.1). Il conidioforo (Fig. 2.2), la struttura portante i conidi (spore asessuate), ha un gambo con pareti ruvide ed è lungo 400-800 µm, mentre le vescicole all'apice del gambo possono essere globose o allungate, con un diametro di 20-45 µm. I conidiofori possono presentare metule e fialidi insieme, e i conidi prodotti da quest'ultime possono essere globosi o ellissoidali, lisci o finemente ruvidi e con un diametro di 3-6 µm (Klich, 2007). Alcuni ceppi (anche di *A. parasiticus*) producono gli sclerozi, strutture nere e rigide, globose o allungate, che fungono da propaguli di resistenza e vengono prodotti dal micelio in condizioni ambientali avverse, come lo svernamento. Questi ceppi vengono suddivisi in: ceppi S, che producono sclerozi di diametro inferiore a 400 µm ed elevate quantità di aflatossine, e ceppi L, i cui sclerozi sono superiori a 400 µm e i quantitativi di aflatossine che producono sono molto variabili (Klich, 2007; Ruiz Posse et al., 2024; Battilani et al., 2013). *Aspergillus flavus* cresce in un range di temperature che varia da minime di 10-12°C a massime di 43-48,8°C, con un optimum di 33-34°C. L'acqua libera (aw), utile alla crescita, varia con la temperatura e *A. flavus* può svilupparsi e sintetizzare tossine nell'intervallo compreso tra 0,73 e 0,85 aw, corrispondenti a valori di umidità del mais che variano dall'8% al 19% (Battilani et al., 2013). La crescita risulta ottimale in un range di pH tra 3,4 e 10 (Pitt e Hocking, 2022).

Le differenze morfologiche e fisiologiche tra *A. flavus* e *A. parasiticus* non sono così significative; *A. parasiticus* presenta colonie di un verde più scuro (Fig. 2.1), produce conidi sferici con pareti più spesse e ruvide, e le vescicole sono più piccole, con diametri generalmente inferiori ai 30 μm e presentano di rado le metule (Pitt e Hocking, 2022).

Aspergillus è un genere prevalentemente anamorfico (fase asessuata, imperfetta) che raggruppa circa 330 specie, anche se alcune presentano lo stato teleomorfo (fase sessuata, perfetta) (Klich, 2007; Asgarivessal et al., 2023). Sebbene questo genere sia di estrema rilevanza, anche solo nel settore agricolo, molti aspetti biologici sono tuttora sconosciuti. *A. flavus* e *A. parasiticus* sono considerate due specie anamorfiche e ad oggi la riproduzione sessuata in natura non è mai stata identificata; ciononostante, l'elevata diversità morfologica, tossigenica, e quindi genetica, entro specie, suggeriscono che avviene ricombinazione sessuale (Asgarivessal et al., 2023; Horn et al., 2009; Ruiz Posse et al., 2024). In egual modo, in quasi tutte le specie anamorfiche di *Aspergillus* (e non solo), sono state trovate prove di ricombinazione (Horn et al., 2009).

La compatibilità sessuale negli ascomiceti è regolata dagli alleli MAT1-1 e MAT1-2 del locus MAT, che discriminano i due idiomorfi; si parla quindi di eterotallismo, cioè la necessità di due ceppi con polarità (sessualità) opposta perché possa avvenire riproduzione sessuata, che fino ad ora per *A. flavus* e *A. parasiticus* è avvenuta solo in condizioni di laboratorio. In entrambi, la riproduzione sessuata ha portato alla formazione di ascocarpi portanti le ascospore, immersi nello stroma (Horn et al., 2009; Ruiz Posse et al., 2024; Asgarivessal et al., 2023).



Figura 2.1 Colonie di *A. flavus* (sinistra) e *A. parasiticus* (destra)
(fonte: Pitt e Hocking, 2022).

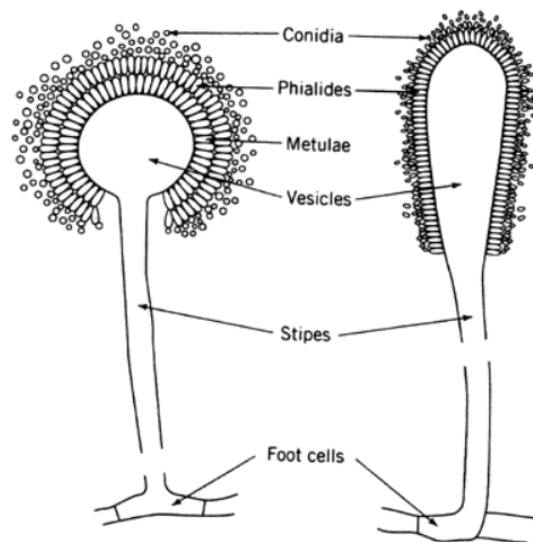


Figura 2.2 Conidiofori caratteristici di *Aspergillus* (fonte: Klich, 2007).

2.3 Marciume della spiga

Aspergillus flavus è l'agente eziologico principale del “marciume della spiga” (“*Aspergillus ear rot*”) in mais, seguito poi da *A. parasiticus* e *A. niger* (Zakaria, 2024); tralasciando la rilevanza in quanto produttore di aflatossine, è considerato un patogeno

minore del mais e di altre colture, e nessuno dei singoli ceppi è specializzato su una determinata pianta ospite (Klich, 2007). Oltre ad esso, il marciume della spiga può essere causato da patogeni fungini appartenenti ad altri generi, come *Fusarium verticillioides* e altre specie correlate (“*Fusarium ear rot*”) che producono fumonisine, e *Fusarium graminearum* (“*Gibberella ear rot*”) che produce le micotossine deossinivalenolo e zearalenone (Wise et al., 2024).

Il ciclo di malattia di *A. flavus* si articola in due fasi: la colonizzazione dei residui colturali nel suolo e l’infezione del mais. Esso sverna nei residui colturali sottoforma di micelio e sclerozi, che al ristabilirsi di condizioni ambientali favorevoli, germinano (nel caso degli sclerozi) e si differenziano emettendo i conidiofori (aspersori) portanti i conidi, cioè le spore asessuate che fungono da inoculo primario. La popolazione del suolo è influenzata prevalentemente da temperatura e potenziale idrico di quest’ultimo; in particolare, la colonizzazione del suolo e dei residui colturali, e la sporulazione, sono molto favorite da elevate temperature ed elevato stress da carenza idrica (Battilani et al., 2013).

I conidi si diffondono per mezzo dell’aria depositandosi su sete fiorali e cariossidi, anche se le giornate piovose ostacolano la diffusione. Fioritura e fasi immediatamente seguenti, soprattutto l’imbrunimento delle sete, sono i momenti in cui il mais risulta maggiormente vulnerabile all’infezione da parte del fungo e agli insetti fitofagi; questi ultimi aggravano la situazione aprendo facili vie d’entrata nei tessuti della spiga e agevolando la diffusione dei conidi tra le piante (Battilani et al., 2013; Battilani et al., 2012).

Il processo di infezione della spiga avviene durante la fase di impollinazione e di riempimento delle cariossidi, e alcuni studi hanno osservato che la colonizzazione può avvenire anche subito dopo l’emissione delle sete; l’infezione ha inizio con la germinazione dei conidi depositati sulle sete, che nel caso di *A. flavus*, avviene in 8-16 giorni con parametri prossimi a 33°C di temperatura e 0,78 di attività dell’acqua, avvenendo però in solo un giorno in condizioni ottimali. Con la germinazione, il conidio si sviluppa e penetra all’interno della seta fiorale, scendendo fino all’interno della spiga, che viene colonizzata, anche se l’infezione vera e propria delle cariossidi avviene alla maturazione delle stesse. L’intensità di colonizzazione della spiga aumenta con l’avanzare della stagione colturale, e a livello delle cariossidi è prevalentemente epifitica, in quanto il micelio si sviluppa in

superficie; la penetrazione all'interno delle cariossidi può avvenire tramite le setole, il pedicello o le lesioni (ad esempio dovute ad insetti), sebbene in *A. flavus* la colonizzazione endofitica sia molto bassa (Battilani et al., 2013; Zakaria, 2024).

I due fattori fondamentali che influenzano *A. flavus* nella crescita e nella sintesi di aflatossine sono temperatura e umidità; la crescita risulta massima attorno ai 33°C e 0,98-0,99 aw, ma continua, compresa la sintesi delle tossine, anche in situazioni di elevato stress idrico (0,73-0,85 aw). È emerso che, come accade nel suolo, ad elevate temperature e bassa umidità ambientali registrate nelle aree maidicole, *A. flavus* come anche altri flavi, mostra un intenso sviluppo e soprattutto una notevole capacità nella competizione e prevalenza sugli altri funghi (Battilani et al., 2013).

Per quanto riguarda la relazione tra temperatura e sintesi di aflatossine, uno studio ha dimostrato che l'escursione termica è un parametro che risulta maggiormente influente sul quantitativo finale di micotossine prodotte, piuttosto che determinati valori di temperatura; comunque, indicativamente 25°C e 28°C sono considerate le temperature ottimali. Infezioni intense e relativa presenza di aflatossine possono manifestarsi da valori inferiori al 32% di umidità della granella e, più in specifico, con valori inferiori al 28% si verifica un veloce incremento nella sintesi di aflatossine, fino ad arrivare ad un minimo del 13%, quando la sintesi si blocca. In condizioni favorevoli la produzione di aflatossine può avvenire entro 24 ore dalla colonizzazione. In campo è stato osservato che i funghi sembrano continuamente a produrre e degradare aflatossine mediante due rispettivi pathway metabolici il cui funzionamento dipende dalle condizioni ambientali, che rendono quindi variabile il quantitativo finale di aflatossine. Annate in cui si sono verificate temperature e piovosità rispettivamente sopra e sotto le medie della zona considerata, hanno mostrato contaminazioni rilevanti da aflatossine, come avvenuto nel 2003 e nel 2012 in Italia (Battilani et al., 2013; Zakaria, 2024).

Visivamente, il marciume della spiga da *Aspergillus* (Fig. 2.3) si manifesta come una muffa verde oliva polverulenta (a causa delle spore) sulle cariossidi, che si concentra maggiormente sulla punta della spiga e attorno alle lesioni causate dagli insetti (piralide essenzialmente), anche se può essere sparsa su tutta la spiga (Wise et al., 2024; Zakaria, 2024).



Figura 2.3 Spighe di mais infettate epifiticamente da *A. flavus*
(fonti: Agronotizie; Edagricole).

2.4 Patosistema e ruolo ecologico delle micotossine

Per patosistema si intende l'insieme delle complesse interazioni presenti tra i fattori "patogeno", "ospite" e "ambiente"; questi tre fattori comprendono ciascuno innumerevoli variabili e affinché avvenga malattia devono sussistere: suscettibilità dell'ospite, virulenza del patogeno e condizioni ambientali favorevoli.

Il processo infettivo da *A. flavus* è dovuto principalmente a variabili come temperatura e umidità, concentrazione dei conidi in campo, caratteristiche/sensibilità varietali, livello di stress, specie di insetti presenti e sistema colturale (Battilani et al., 2013).

Tra le molte variabili, numerose fonti sottolineano la notevole influenza dei parametri di temperatura e umidità sullo stato di stress che, come evidenziano Battilani et al. (2013), riguarda sia il patogeno sia la pianta ospite. Sebbene venga frequentemente affermato che *A. flavus* (e specie correlate) trae un particolare vantaggio nella crescita in condizioni di stress idrico, Zakaria (2024) e Battilani et al. (2013) affermano anche che esso sia favorito da un'elevata attività dell'acqua (0,98-0,99 aw) nelle cariossidi. Inoltre, la produzione di aflatossine, ritenuta in qualche modo associata allo stress del fungo, viene sempre correlata alla siccità. Interpretando queste apparenti discordanze si può desumere che, come per molti altri funghi, l'acqua è fondamentale, ma *A. flavus* è un organismo xerofilo, il

che indica la capacità di adattamento e di tolleranza alla siccità. Quindi in situazioni di siccità, per propria natura esso si ritrova a prevalere nella competizione con gli altri funghi e, risentendo dello stress, la produzione di aflatossine potrebbe essere attuata proprio come meccanismo di difesa dallo stress o persino essere una delle ragioni che conferiscono la capacità di tolleranza.

Allo stesso tempo, la pianta ospite di mais risente della carenza idrica e questo la conduce ad uno stato di stress da siccità, uno tra i più gravi per la coltura del mais. La prima risposta di difesa alla carenza idrica consiste nella produzione di acido abscissico, un fitormone che provoca la chiusura stomatica, che viene recepito come segnale di stress da specifici recettori. Alla ricezione di questi segnali vengono attivati ulteriori pathway per la produzione di metaboliti protettivi (es. accumulo di prolina) e di composti antiossidanti (Rafique, 2023). Lo stato di stress può essere causato anche da alte temperature, carenze nutrizionali, attacco di insetti e presenza di altri patogeni e di infestanti (Battilani et al., 2013). Questi stati di stress rendono vulnerabile l'ospite, cosa che stimola l'infezione da parte del patogeno (Zakaria, 2024); ad esempio, alcune fitoalessine (sostanze di difesa della pianta) vengono inibite dallo stress da siccità (Klich, 2007). Come le fitoalessine, nella pianta l'infezione induce l'attuazione di numerosi meccanismi di difesa, tra cui anche le specie reattive dell'ossigeno (ROS), sintetizzate tempestivamente, che oltre ad avere azione ossidativa diretta sul patogeno, inducono ulteriori difese anche agendo direttamente a livello di regolazione genica.

Le condizioni climatiche svolgono quindi un ruolo cruciale nell'interazione tra pianta e patogeno, inducendo in entrambi una situazione di stress, favorendo la patogenesi e la sintesi di tossine.

Il ruolo ecologico e i meccanismi regolatori alla base della sintesi delle micotossine sono sempre stati dibattuti, e tuttora rimangono un campo di ricerca attivo in ragione delle forti ripercussioni che queste tossine hanno in ambito agricolo, zootecnico, alimentare e sanitario. Di rilevante importanza sarebbe capire quali siano i loro ruoli nei rapporti con gli altri organismi, soprattutto ospiti, altri patogeni e insetti con i quali il fungo è a contatto, e anche come influiscano i fattori abiotici sulla sintesi. Questo servirebbe a comprendere la patogenesi nel suo insieme, per attuare di conseguenza misure di controllo atte a limitare la sintesi di tossine (Sweany et al., 2022; Battilani et al., 2012).

La sintesi delle aflatossine non è ancora stata compresa, ma molte sono le ipotesi riguardo la sua utilità dal punto di vista del patogeno. Sebbene siano prodotte da molti ceppi di *A. flavus* e *A. parasiticus*, non sono né fattori di patogenicità né fitotossine, quindi sono ininfluenti nella colonizzazione delle piante. Anzi, ceppi con scarsa o nulla produzione di aflatossine sono patogeni migliori in quanto mostrano una maggiore vigoria e capacità di infezione nel mais; questo potrebbe indicare che la minore fitness dei ceppi tossigeni sia da imputare alla produzione di tossine, forse a causa del costo energetico sostenuto. Infatti, anche nel suolo, i ceppi tossigeni, che peraltro producono maggiori quantitativi di aflatossine, da alcuni studi ritenute utili per l'adattamento alla nicchia del suolo, mostrano una minore fitness (Sweany et al., 2022; Chalivendra et al., 2017).

Tuttavia, nonostante la perdita di fitness rinvenuta nella colonizzazione del mais e del suolo, si presume che la sintesi di tossine sia legata a numerosi aspetti relativi alla fisiologia stessa del patogeno e a motivi di competizione e di difesa. Un'ipotesi verosimile riguardo le aflatossine sostiene che esse vengano sintetizzate dal fungo per attenuare lo stress ossidativo presente nel suo organismo. Questo stress ossidativo è indotto dalle condizioni meteorologiche e dalle sostanze di difesa prodotte dalla pianta ospite, come i ROS, in risposta alla presenza stessa del fungo, a quella di altre avversità e agli stress ambientali come quello da siccità (Sweany et al., 2022; Battilani et al., 2013); la prolina prodotta dalle piante durante lo stress idrico, causa l'aumento della sintesi di aflatossine (Klich, 2007). È stato osservato che la sintesi di aflatossine può indurre ulteriori condizioni ossidative che stimolano a loro volta l'espressione di geni alla base della sintesi di enzimi antiossidanti. Si ritiene invece che, durante l'infezione nelle piante ospiti, i ceppi che non producono aflatossine resistano allo stress ossidativo mediante il ricorso a composti antiossidanti alternativi (Sweany et al., 2022).

Altre ipotesi sostengono che le aflatossine siano sottoprodotti del metabolismo primario o che possano essere utilizzate dal fungo per attenuare lo stress causato dai fungicidi, per competere contro altri organismi come funghi e insetti, per la difesa delle strutture riproduttive dai predatori, prevenendo quindi la micofagia, e per prevenire i danni da raggi ultravioletti (Battilani et al., 2012; Battilani et al., 2013; Sweany et al., 2022).

2.5 Modelli previsionali

Date le numerose variabili implicate nel patosistema, l'intensificazione dei fenomeni atmosferici, l'importanza economica della coltura del mais e la sua vulnerabilità ai funghi aflatossigeni, le ripercussioni sul settore primario e la tossicità con i rischi ad essa correlati, si rendono necessari la previsione e il monitoraggio delle infezioni per intervenire e attuare, se necessario, le strategie di controllo più consone.

I modelli previsionali sono strumenti matematici che utilizzano algoritmi complessi per simulare e di conseguenza prevedere l'andamento di determinati fenomeni. Nel caso delle aflatossine, il fenomeno di base da considerare è il patosistema aspergilli-mais-ambiente, quindi le variabili coinvolte rappresentano i dati in input, mentre l'output è rappresentato dalla probabilità di contaminazione da aflatossine, ad esempio, in un quantitativo superiore ai limiti imposti dalla normativa vigente in materia. Creare sistemi di previsione in questo ambito risulta non facile, in quanto le variabili coinvolte sono numerose e difficili da tradurre in termini matematici (es. tipo di ibrido di mais, uso di fungicidi), perciò solitamente si considera solo l'andamento meteorologico che è la variabile più influente (Battilani et al., 2013).

Data la complessità del tema, può risultare utile l'uso combinato di più modelli relativi ai cicli di sviluppo del fungo e del mais, che permettono la previsione, oltre che della contaminazione da aflatossine, anche del rischio di infezione da aspergilli; un esempio è il modello "AFLA-mais" che combina i modelli soprascritti e utilizza come input parametri meteorologici rilevati ogni ora come temperatura, umidità relativa, precipitazioni e bagnatura fogliare (Battilani et al., 2013; Balková et al., 2026).

CAPITOLO 3:

LE AFLATOSSINE

Le micotossine sono sostanze tossiche naturali prodotte dal metabolismo secondario dei funghi, principalmente nei generi *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Penicillium*. Le micotossine più note prodotte da *Aspergillus* sono le aflatossine; *A. flavus* e *A. parasiticus* sono le principali specie produttrici, ma sono coinvolte molte altre specie nelle sezioni *Flavi*, *Ochraceorosei* e *Nidulatans* (Shabeer et al., 2022). Le aflatossine vennero scoperte e studiate per la prima volta negli anni '60 in Inghilterra, quando causarono la morte di 100.000 tacchini da allevamento (Klich, 2007), ma rimangono tuttora una problematica di rilevante importanza a causa della pericolosità e della presenza in alimenti e mangimi.

3.1 Caratteristiche chimico-fisiche e biosintesi

Dal punto di vista chimico le aflatossine (Fig. 3.1) hanno uno scheletro difuranocumarinico, ma si differenziano a causa di variazioni strutturali che conferiscono a ciascuna tipologia caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche diverse. Attualmente sono stati identificati 18 tipi di aflatossine, ma i più rilevanti sono B1, B2, G1, G2, M1 e M2 che appartengono a tre gruppi discriminati secondo il colore della fluorescenza emessa quando sottoposte a luce UV: blu (B), verde (G) e blu-violetto (M, presenti nel latte). Le differenze nella fluorescenza sono dovute al fatto che i tipi B contengono un anello ciclopentatone, mentre i tipi G contengono un anello lattonico a sei elementi. I pedici 1 e 2 indicano il livello di diffusione e di tossicità, quindi la rilevanza della tossina, con 1 che indica la forma più importante (Yohannis et al., 2025; Shabeer et al., 2022).

Le aflatossine sono cristalli incolori o lievemente gialli, insolubili in solventi apolari ma molto solubili in solventi moderatamente polari, mentre in acqua la solubilità è di 10-20 mg/L. Resistono a temperature molto elevate (punti di fusione a 240-300°C) e tale stabilità termica rende inefficaci trattamenti termici come la pastorizzazione, mentre l'ammoniaca alcalina è in grado di degradare irreversibilmente l'anello lattonico. Manifestano instabilità alla luce UV in presenza di ossigeno, in presenza di sostanze ossidanti e a pH estremi (<3, >10) (Yohannis et al., 2025; EFSA, 2020).

I geni che regolano la biosintesi sono 25 e sono riuniti in un unico cluster genico (Klich, 2007). La biosintesi è regolata da complesse cascate di processi trascrizionali e post-trascrizionali ed implica numerose reazioni enzimatiche e di bioconversione. Il pathway ha inizio dall'acetil-CoA e dal malonil-CoA, segue la loro conversione in esanoil-CoA, convertito a sua volta in acido norsolorinico. Quest'ultimo, prima della sintesi delle aflatossine, subisce numerose trasformazioni catalizzate da enzimi, che comportano altrettanti composti intermedi, tra i quali la versicolorin A, di particolare importanza dato che risulta essere il precursore delle aflatossine B e G (Okechukwu et al., 2024). I fattori abiotici, quali temperatura, attività dell'acqua, pH, carbonio e azoto sono molto influenti sulla biosintesi, ma in particolare, temperatura e attività dell'acqua hanno un forte effetto sull'attivazione del cluster genico e sulla trascrizione degli importanti geni regolatori aflR e aflS (Shabeer et al., 2022).

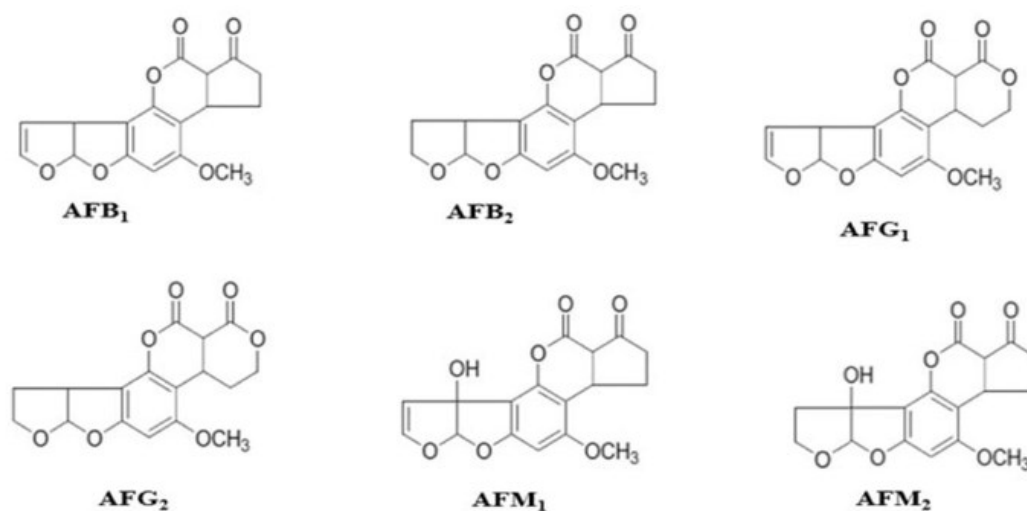


Figura 3.1 Strutture molecolari delle principali aflatossine.

3.2 Diffusione e ripercussioni economiche

I funghi aflatossigeni sono stati isolati dai suoli di tutte le fasce climatiche (Klich, 2007), ma la maggiore ricorrenza è nei climi tropicali e sub-tropicali dove sono favoriti da temperature e umidità elevate. In questi ultimi decenni però, gli effetti del riscaldamento climatico hanno causato l'espansione dell'areale geografico di *Aspergillus* spp., facendo insorgere fenomeni di contaminazione anche in zone temperate mai interessate prima (Yohannis et al., 2025); oggi in Europa meridionale in stati come Serbia,

Croazia e Italia le contaminazioni sono sempre più frequenti e intense. Alcuni modelli predittivi hanno stimato che entro il 2040 più dell'89% delle contee maidicole della Corn Belt, negli Stati Uniti, subirà rischi maggiori riguardanti le aflatossine dovuti all'aumento delle temperature e dell'anidride carbonica in atmosfera (Yohannis et al., 2025; Jallow et al., 2021).

L'Africa subsahariana è considerata l'hotspot globale delle contaminazioni da aflatossine, seguita da America Latina e Asia. Nei Paesi di queste aree la diffusione, frequenza e gravità delle contaminazioni rimangono una costante e sono da attribuire soprattutto alle condizioni climatiche e a pratiche agricole e di post-raccolta errate, spesso risultato delle disparità socioeconomiche; nelle aree più povere, supervisione normativa e consapevolezza pubblica in materia sono inoltre estremamente carenti (Yohannis et al., 2025).

Le ripercussioni economiche della contaminazione delle derrate da aflatossine nei Paesi sviluppati e, a maggior ragione, in quelli in via di sviluppo, sono ingenti; la stima dei costi totali derivanti dall'impatto di queste tossine risulta difficile, e ciò è dovuto al loro effetto multidimensionale su più settori economici, primi tra tutti quello agricolo e quello zootecnico, dove i costi da sostenere derivano dai cali delle rese e dei prezzi di mercato, dalle perdite di raccolti e derrate contaminati, da costi per campionamenti e analisi, dalla detossificazione delle partite e dalle perdite di produzione degli animali da reddito, oltre che dalle relative cure veterinarie o dalla loro eventuale morte. Vanno considerati poi i settori dell'indotto, soprattutto quello alimentare, dove le contaminazioni rappresentano un rischio per quanto concerne l'approvvigionamento alimentare (food security) e la sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti (food safety), comportando una seria minaccia per la salute dell'uomo e conseguenti costi relativi alle spese sanitarie (Yohannis et al., 2025; Klich, 2007; Goda et al., 2025). Si stima che il costo economico globale determinato dalle aflatossine sia compreso tra 6 e 18 miliardi di dollari ogni anno (Yohannis et al., 2025), di cui, solo le perdite agricole negli Stati Uniti e nell'Africa subsahariana ammontano rispettivamente a 160 milioni e 450 milioni di dollari (Jallow et al., 2021).

Le soprascritte criticità evidenziano l'urgenza di mettere in atto opportune strategie di controllo per prevenire e ridurre le contaminazioni delle materie prime alimentari, al

fine di tutelare la salute dell'uomo e degli animali. Queste strategie includono l'emana-
zione di normative specifiche in materia, la prevenzione delle infezioni e contaminazioni
nel pre- e post-raccolta e la riduzione dei quantitativi di aflatossine mediante trattamenti
di detossificazione, nei prodotti già contaminati (Jallow et al., 2021).

3.3 Effetti delle contaminazioni sul settore agroalimentare

Uno studio ha dimostrato che a livello mondiale il 60-80% delle piante alimentari
viene contaminato da micotossine; le aflatossine si trovano in un elevato numero di queste
colture tanto da essere considerate onnipresenti (Jallow et al., 2021). Queste contamina-
zioni si ripercuotono di conseguenza sugli alimenti e sui mangimi, creando insicurezza
alimentare (Pócsi et al., 2020) e mettendo a repentaglio la salute dell'uomo e degli animali
da reddito.

Le aflatossine di tipo B e G vengono rilevate comunemente in colture cerealicole
come mais, sorgo, miglio, riso e grano e in quelle oleaginose come arachidi, soia, girasole
e cotone (Okechukwu et al., 2024), ma sono segnalate prevalentemente nelle coltivazioni
di mais, cotone e arachidi; si presume che ciò possa essere legato al fatto che queste col-
ture vengono coltivate negli areali in cui i funghi aflatossigeni sono isolati con maggiore
frequenza. Un'altra spiegazione potrebbe essere il modo di utilizzo del carbonio da parte
di tali funghi; in semi di cotone e mais si è visto che *A. flavus*, prima di utilizzare l'amido,
utilizza gli zuccheri liberi e l'olio. In cotone è stato documentato che la rimozione dei
lipidi dai semi ha ridotto di 800 volte la sintesi di aflatossine (Klich, 2007).

Le colture rappresentano la fonte di materie prime vegetali che possono essere im-
piegate sia come alimenti destinati all'uso umano, sia come mangimi; tra queste colture,
il mais assume un ruolo cruciale. Il mais è il cereale più abbondante al mondo, la sua
polivalenza lo vede coinvolto in innumerevoli settori, ma allo stesso tempo è una coltura
che desta preoccupazione; l'elevata vulnerabilità che manifesta all'infezione da aspergilli
aflatossigeni in situazioni di stress ambientale, unita al suo ampio utilizzo alimentare su
scala globale, lo rendono una delle principali vie di esposizione umana e animale alle
aflatossine. Contaminazioni di mais e derivati sono state rinvenute in quasi ogni parte del
mondo (Jallow et al., 2021).

Il mais e i suoi derivati, infatti, vengono impiegati largamente nell'alimentazione
zootecnica, direttamente o all'interno di mangimi composti, nei quali possono raggiungere

anche quote del 60%. Queste quote possono aumentare nel caso in cui vengano preparate delle razioni, come per i bovini, dove oltre ai mangimi si può avere l'implementazione diretta del mais sottoforma di granella intera o trattata fisicamente, di silomais o di pastone. Il mais rientra tra le materie prime ad alto rischio di contaminazione, soprattutto se di importazione, ma sono presenti alcune differenze tra i suoi derivati; ad esempio, il pastone che presenta una parte preponderante in granella, mostra ovviamente livelli di contaminazione più alti rispetto al silomais, che invece è costituito dall'intera pianta, dove quindi la granella ricopre una quota inferiore. Va tenuto presente, comunque, che silomais e pastone derivano dal processo di insilamento, durante il quale la biomassa in anaerobiosi acidifica per mezzo della fermentazione, determinando condizioni poco favorevoli ai funghi aflatossigeni; infatti, negli insilati, la presenza di aflatossine è dovuta principalmente a contaminazioni avvenute in campo, prima dell'insilamento (Bailoni et al., 2013; Brera e Guarino, 2013).

Le contaminazioni dei mangimi non possono che ripercuotersi sull'alimentazione umana, in quanto nell'organismo degli animali da reddito alimentati con mangimi contaminati avviene il bioaccumulo delle aflatossine, determinando la loro presenza in carne, latte e uova come tali o sottoforma dei relativi metaboliti, ad esempio, l'aflatossicolo nella carne e le aflatossine M1 ed M2 nel latte. L'aflatossicolo deriva dalla riduzione del tipo B1, mentre i tipi M1 e M2 derivano dall'idrossilazione rispettivamente dei tipi B1 e B2 (Brera e Guarino, 2013; Okechukwu et al., 2024; EFSA, 2020). L'idrossilazione delle aflatossine B avviene per mezzo del citocromo P450, un sistema ossidativo presente in vari tessuti dell'organismo, ma soprattutto nel fegato (Bailoni et al., 2013).

Nelle bovine da latte, l'escrezione complessiva delle aflatossine e dei relativi metaboliti avviene principalmente per via fecale e urinaria e l'escrezione nel latte dell'aflatossina B1, sottoforma del metabolita M1, ne rappresenta una piccola parte, con un carry-over variabile tra lo 0,1% e il 6%. Per quanto riguarda gli animali da carne, il carry-over dell'aflatossina B1 nel fegato, organo in cui si verifica il maggiore accumulo, si attesta a 0,007% nei bovini da carne, 0,083% nei polli e 0,125% nei suini, mentre nell'uovo di galline ovaiole è variabile tra lo 0% e lo 0,05% (Bailoni et al., 2013).

Una panoramica di EFSA (2020), riguardo l'esposizione alimentare dell'uomo alle aflatossine, riporta che i valori più elevati di aflatossina B1 e aflatossine totali vengono riscontrati nella categoria alimentare "legumi, frutta a guscio e semi oleosi", ma viene

sottolineata anche la notevole influenza della categoria “cereali e prodotti a base di cereali” sull’esposizione alimentare, in cui prevalgono le sottocategorie “cereali per il consumo umano” (soprattutto il mais), “pane e panini” e “prodotti da forno raffinati”. I valori più alti dell’aflatossina M1 vengono riscontrati invece nella categoria “latte e prodotti caseari”.

3.4 Impatto sulla salute dell’uomo e degli animali

Il particolare riguardo dedicato in materia di contaminazioni da aflatossine negli ultimi decenni è dovuto essenzialmente agli effetti deleteri che queste sostanze hanno sulla salute umana e animale. L’aflatossicosi indica l’avvelenamento da aflatossine in seguito all’ingestione di alimenti contaminati, e può comportare diverse reazioni patologiche che si manifestano con sintomatologia acuta o cronica (Cereser et al., 2004; Brera e Guarino, 2013). Nell’uomo le aflatossicosi primarie sono dovute al consumo diretto di alimenti di origine vegetale contaminati, mentre le aflatossicosi secondarie sono dovute al consumo di alimenti di origine animale derivanti da animali alimentati con mangimi contaminati. L’aflatossina B1 è la più frequente negli alimenti e generalmente i tipi B2, G1, G2 vengono riscontrati solo se la B1 è presente, mentre le aflatossine M, soprattutto la M1, si trovano in latte e derivati (EFSA, 2020).

Per quanto riguarda l’uomo, la tossicità acuta da aflatossine causa immunosoppressione, reazioni allergiche, epatite e addirittura morte. Negli anni si sono riscontrati vari eventi di tossicità acuta che hanno portato alla morte di molte persone, come avvenuto in Kenya nel 2004, dove si sono verificati 125 decessi in seguito al consumo di mais altamente contaminato (Yohannis et al., 2025). Tuttavia, eventi di aflatossicosi acuta risultano abbastanza rari e si verificano nei Paesi più poveri, mentre in quelli sviluppati le contaminazioni non arrivano quasi mai a livelli tali da causare morte (Yohannis et al., 2025; Cereser et al., 2004), soprattutto grazie alle sempre più rigide normative in materia di contaminanti alimentari. Pertanto, è più plausibile che l’uomo sia soggetto maggiormente ad esposizione cronica, piuttosto che acuta.

Le aflatossine hanno proprietà genotossiche, mutagene, cancerogene, teratogene, nefrotossiche e causano anche squilibri ormonali, infertilità e inducono stress ossidativo (Yohannis et al., 2025; EFSA, 2020). Esse vengono assorbite nell’intestino tenue e indi-

rizzate al fegato, dove ad esempio, i tipi B1, G1 e M1 vengono convertiti dalle monossigenasi del citocromo P450 in 8,9-epossido, che reagisce facilmente con il DNA al quale si lega covalentemente formando addotti e inducendo danni permanenti; l'attività delle monossigenasi ha quindi azione genotossica. Si ritiene che la cancerogenicità sia dovuta a tale azione genotossica, con un conseguente effetto specialmente a livello epatico, dove viene indotto il carcinoma epatocellulare. L'aflatossina B1 è considerata la più genotossica e la più cancerogena ed è classificata nel gruppo 1 dallo IARC, mentre l'aflatossina M1 è meno cancerogena e appartiene al gruppo 2B (EFSA, 2020).

Negli animali i sintomi sono simili a quelli che si riscontrano nell'uomo e l'incidenza di tali sintomi dipende dall'età, dalla specie e dalla suscettibilità del singolo animale. Essi possono riguardare: depressione, anemia, perdita di peso, ittero, danni al fegato, influenza sull'efficienza riproduttiva, emorragia gastrointestinale e morte. L'impatto sulla salute degli animali causa perdite di produzione, dovute alla riduzione dei tassi di accrescimento e della quantità e qualità di latte e uova (Okechukwu et al., 2024; Brera e Guarino, 2013).

3.5 Normative in ambito internazionale

In molti Paesi sono state emanate specifiche normative in materia di contaminanti alimentari, in quanto risulta d'obbligo imporre restrizioni e quantitativi massimi ammissibili, soprattutto per quelle sostanze che, come le aflatossine, sono caratterizzate da un'elevata pericolosità e da una costante presenza in alimenti di ampio consumo nella dieta umana ed animale. Per quanto riguarda le aflatossine, la loro rilevante presenza in derrate che, come il mais, sono protagoniste degli scambi commerciali globali, rende necessaria l'uniformità delle normative tra i vari Paesi. Ogni Paese è a sé stante e si differenzia dagli altri in termini di conoscenza scientifica in materia, capacità analitica, accuratezza dei dati tossicologici e, da non sottovalutare, aspetti socioeconomici, che comportano una diversa percezione del rischio. L'insieme di questi fattori influisce sull'entità dei limiti normativi imposti nei vari Paesi, il che può provocare controversie commerciali tra importatori ed esportatori. Per la risoluzione di tali controversie, l'Organizzazione Mondiale del Commercio ha riconosciuto come base di partenza i limiti stabiliti dalla Commissione del Codex Alimentarius, oltre al fatto che alcuni Paesi come l'Unione Europea adottano apposite misure per armonizzare la propria normativa con quelle internazionali (Jallow et al., 2021).

Le aflatossine, a causa della loro tossicità, presentano limiti normativi molto più bassi rispetto alle altre micotossine, e vengono stabiliti sia in alimentazione umana che animale (Pasti, 2013). I limiti normativi globali riguardanti il contenuto di aflatossine totali negli alimenti variano generalmente da 0,5 a 20 ppb, e quelli imposti dall'UE sono tra i più severi (Yohannis et al., 2025); le normative di riferimento in UE sono il Regolamento 2023/915, relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti, e la Direttiva 2002/32/CE (modificata dalla Direttiva 2003/100/CE), relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali.

Il Regolamento EU 2023/915 prevede che gli alimenti con una contaminazione superiore ai limiti massimi non vengano immessi nel mercato, utilizzati per produrre alimenti e miscelati con partite di alimenti conformi per abbassarne il contenuto in aflatossine. Inoltre, sono permessi la cernita e i trattamenti di detossificazione fisici, ma non quelli di tipo chimico. Per l'alimentazione umana, i limiti nei cereali e derivati da immettere sul mercato sono di 2 ppb per l'aflatossina B1 e 4 ppb per le aflatossine totali, mentre in mais e riso da sottoporre a cernita o trattamenti fisici prima dell'immissione sul mercato sono di 5 ppb per l'aflatossina B1 e 10 ppb per quelle totali. Questi limiti vengono ulteriormente ridotti se i cereali sono inclusi in alimenti per bambini.

La Direttiva 2003/100/CE prevede per l'aflatossina B1 un limite di 20 ppb in materie prime per mangimi e in mangimi per bovini, ovini, caprini, suini e pollame, ad eccezione di mangimi per animali da latte, in cui il limite è di 5 ppb, o per animali giovani come vitelli e agnelli, in cui il limite è di 10 ppb.

3.6 Metodi analitici

L'elevata tossicità delle aflatossine, che rende pericolose anche le concentrazioni più basse, e l'imposizione dei limiti normativi negli alimenti, hanno favorito la ricerca e lo sviluppo di tecniche analitiche capaci di identificare e quantificare efficacemente queste tossine (Pócsi et al., 2020).

Il campionamento deve essere svolto con accuratezza in quanto la distribuzione disomogenea delle aflatossine nei prodotti agricoli lo rende la principale fonte di variabilità dei risultati analitici (Klich, 2007). Alcuni metodi analitici necessitano preventivamente dell'estrazione dell'analita (aflatossina) dal campione e della successiva purificazione, poiché la matrice (alimento) può influenzare i risultati. I metodi analitici si suddividono

principalmente in tre tipologie: cromatografici, immunochimici e spettroscopici (Jallow et al., 2021).

3.6.1 Metodi cromatografici

Questi metodi utilizzano due fasi, una stazionaria, che può essere liquida o solida, e una mobile, generalmente liquida; gli analiti, che vengono trasportati dalla fase mobile attraverso la fase stazionaria, possono interagire con entrambe le fasi in base a proprietà chimiche come polarità, carica e affinità. Queste proprietà implicano diverse velocità di migrazione dei vari analiti sulla fase stazionaria, consentendone la separazione differenziale (Okechukwu et al., 2024). I principali metodi si basano sulla cromatografia liquida e sono: cromatografia su strato sottile (TLC), cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS). Nonostante la TLC sia il metodo più comune, HPLC e LC-MS sono più sensibili e accurate (Shabeer et al., 2022).

La tecnica HPLC viene utilizzata per l'analisi di composti organici, inclusi quelli a corta catena (Okechukwu et al., 2024). Il sistema (Fig. 3.2) è costituito da una colonna cromatografica contenente particelle di fase stazionaria, che viene attraversata dalla fase mobile a pressioni variabili tra 100 e 400 bar (Antec Scientific – Hoorn, Alphen a/d Rijn, Paesi Bassi). La fase mobile, costituita da solventi acquosi od organici, trasporta il campione facendolo scorrere lungo la fase stazionaria dove, a seconda dell'affinità, gli analiti possono essere più o meno adsorbiti. Gli analiti, perciò, percorrono la colonna cromatografica a velocità diverse, separandosi, e man mano che eluiscono dalla colonna vengono identificati e quantificati dal rivelatore. Il tempo trascorso nella colonna prima di eluire permette l'identificazione vera e propria degli analiti. Le aflatossine, grazie alla loro proprietà di fluorescenza, vengono solitamente identificate e quantificate efficacemente associando il sistema HPLC ad un rivelatore a fluorescenza (FLD) nel blu o nel verde (tipi B e G). L'HPLC consente di ottenere risultati rapidi e precisi ma la strumentazione è molto costosa e necessita di personale specializzato. Inoltre, è necessaria la preventiva purificazione e, talvolta, per alcune matrici, può servire la derivatizzazione post-colonna per potenziare la fluorescenza delle aflatossine (Okechukwu et al., 2024; Antec Scientific; Shabeer et al., 2022; Jallow et al., 2021).

Similmente, anche la LC-MS sfrutta la cromatografia liquida per la separazione fisica degli analiti presenti nel campione, ma a differenza dell'HPLC, che identifica i singoli

analiti mediante i diversi tempi di ritenzione in colonna, l'uso della spettrometria di massa consente di analizzare il rapporto massa/carica degli analiti, identificandoli inequivocabilmente. Questa tecnica permette un'analisi sensibile e selettiva di campioni che presentano più micotossine contemporaneamente e, non utilizzando la FLD, non necessita di derivatizzazione. Tuttavia, la strumentazione è costosa e complessa nell'utilizzo e i risultati analitici possono essere influenzati dalla matrice (Jallow et al., 2021; Okechukwu et al., 2024).

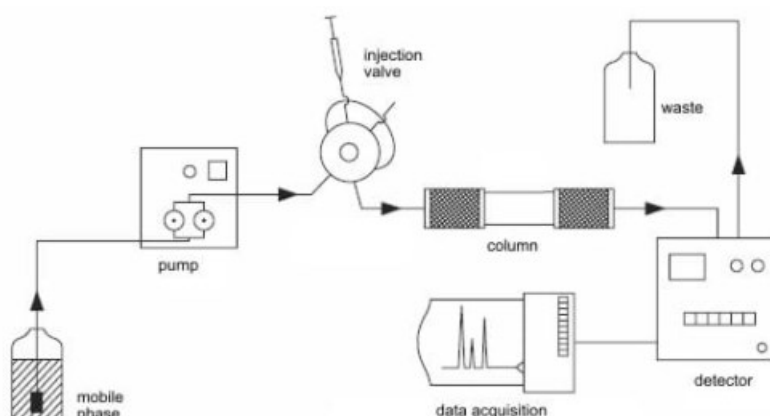


Figura 3.2 Schema del sistema HPLC (fonte: Antec Scientific).

3.6.2 Metodi immunochimici

Questi metodi si basano sul legame che avviene tra un anticorpo specifico (Ab) e un antigene (Ag), che in questo caso corrisponde all'analita, cioè l'aflatossina, consentendo sensibilità e selettività elevate. Tuttavia, le aflatossine sono molecole piccole e non possiedono proprietà immunogeniche, per questo devono essere modificate chimicamente. La reazione Ab-Ag viene rivelata da marcatori appositi, coniugati con uno dei due reagenti, che consentono l'emissione di un colore o di una luce la cui intensità indicano la concentrazione dell'analita (Matabaro et al., 2017). I principali metodi sono: test ELISA, saggi a flusso laterale o *lateral flow* (LFIA) e immuno-sensori.

Il test ELISA (saggio immunoassorbente legato a un enzima) viene impiegato per l'analisi quantitativa delle aflatossine e utilizza piastre per microtitolazione in cui i pozzi vengono rivestiti con uno specifico anticorpo. In questo caso il marcatore è un enzima, coniugato all'analita o all'anticorpo che, alla reazione Ab-Ag, agisce su un substrato cromogenico generando un composto colorato. La quantificazione dell'analita

viene eseguita tramite lettori di micropiastre che misurano l'assorbanza ottica, la chemiluminescenza o la fluorescenza. I vantaggi di questa tecnica sono il basso limite di rilevanza e l'elevata produttività. Tuttavia, la strumentazione di lettura delle piastre è costosa e necessita di competenze per l'utilizzo, la procedura può richiedere molto tempo e, talvolta, è possibile riscontrare una bassa selettività nei campioni più complessi, a causa dell'influenza della matrice, e una scarsa variazione di colore (Okechukwu et al., 2024; Matabaro et al., 2017).

Il test LFIA è un saggio immunocromatografico che sfrutta lo stesso principio del test ELISA, ma è strutturato in modo diverso (Fig. 3.3). Esso si compone di una striscia cartacea che presenta una membrana di carico del campione, una di rilascio dell'anticorpo mobile coniugato, una di nitrocellulosa e una assorbente. Sulla membrana di nitrocellulosa sono posizionate la linea di test, che presenta lo stesso anticorpo immobilizzato e non coniugato, e la linea di controllo, che presenta un secondo anticorpo capace di legare quello primario. Dopo l'applicazione, il campione fluisce lungo la striscia e l'analita si lega all'anticorpo formando un complesso; quest'ultimo si lega poi all'anticorpo immobilizzato sulla linea di test, generando un segnale colorato (Matabaro et al., 2017). La linea di controllo, quando si colora, indica la validità del test, e ciò avviene a seguito del legame tra anticorpo primario mobile e quello secondario. Questo tipo di test non richiede reagenti o strumentazione, è semplice, rapido, economico, si presta all'utilizzo in campo e al rilevamento di più micotossine in un singolo test (Matabaro et al., 2017; Jallow et al., 2021).

Gli immuno-sensori rappresentano il metodo immunochimico più avanzato; un trasduttore di segnale rileva il legame tra un biosensore (anticorpo) e l'analita a seguito di cambiamenti chimico-fisici indotti dalla reazione stessa. Questi cambiamenti vengono trasdotti in un segnale misurabile che viene successivamente amplificato, elaborato e reso visibile da un sistema elettronico; l'intensità del segnale è correlata alla concentrazione. Questa tecnica consente un'analisi altamente sensibile, selettiva e rapida, ma può subire l'interferenza della matrice nei campioni complessi e necessita di competenze specifiche (Matabaro et al., 2017; Okechukwu et al., 2024).

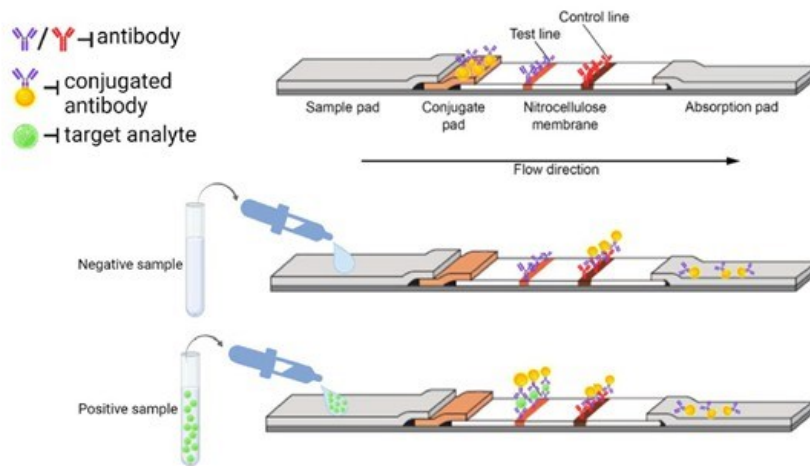


Figura 3.3 Principio di funzionamento del metodo LFIA (fonte: Creative Diagnostics – Shirley, New York, USA).

3.6.3 Metodi spettroscopici

I metodi spettroscopici si basano sul comportamento della luce quando interagisce con il campione da analizzare; la luce può essere assorbita, emessa e diffusa. Ogni sostanza assorbe o emette specifiche lunghezze d'onda e questo viene sfruttato per identificare e quantificare gli analiti nei campioni. Questi metodi consentono un'analisi non distruttiva di prodotti agricoli e alimenti su larga scala, necessitano di una minima o nulla preparazione del campione, ma sono molto influenzati dalla matrice e non sono adatti al rilevamento di più micotossine (Jallow et al., 2021). Ad esempio, per l'identificazione e la quantificazione delle aflatossine viene utilizzata la spettrofotometria a fluorescenza, che sfrutta la fluorescenza naturale (Fig. 3.4) emessa dalle aflatossine quando vengono sottoposte alla luce ultravioletta (Shabeer et al., 2022).

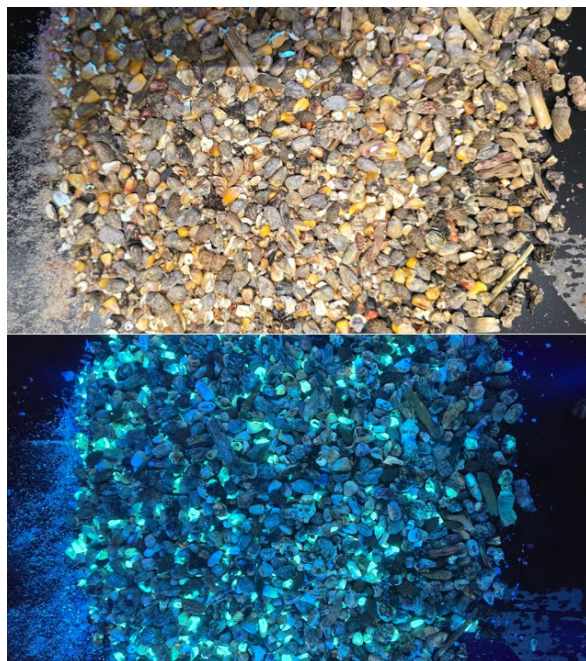


Figura 3.4 Fluorescenza di un campione di granella di mais contaminato
(fonte: Cimbria – Thisted, Danimarca).

CAPITOLO 4:

STRATEGIE DI CONTROLLO DELLE AFLATOSSINE IN MAIS

Le strategie di controllo delle aflatossine in mais consistono in una serie di pratiche agronomiche che vengono attuate a partire dalla coltivazione in campo, passando poi alla raccolta e infine allo stoccaggio, il cui scopo è quello di prevenire l'instaurarsi di tutte quelle condizioni che in qualche modo possono favorire i funghi aflatossigeni nell'infezione, nella crescita e nella sintesi di aflatossine. Queste pratiche sono fondamentali soprattutto con la coltura in atto, dalla fioritura alla fase di maturazione precoce, dove, a differenza dei cereali autunno-vernini, la lotta diretta tramite fungicidi non è possibile; nel mais, infatti, la posizione della spiga sulla pianta e la presenza delle brattee ostacolano l'adeguata bagnatura della stessa con i fungicidi, rendendo difficoltoso l'utilizzo di questi ultimi. La prevenzione, tuttavia, perché risulti efficace, si può ottenere soltanto adottando e combinando tutte le pratiche, in quanto ciascuna di esse, singolarmente, non ha la capacità di limitare in modo significativo le contaminazioni (Reyneri et al., 2013).

4.1 Strategie di pre-raccolta e raccolta

In campo le pratiche applicate mirano soprattutto, più o meno direttamente, alla mitigazione degli stress a cui è sottoposta la pianta, poiché, come già descritto nei capitoli precedenti, sono uno dei fattori di vulnerabilità agli aspergilli, che risultano particolarmente favoriti dall'indebolimento delle difese vegetali.

4.1.1 Lavorazione del suolo, gestione dei residui colturali e rotazione colturale

I residui colturali rappresentano il sito di svernamento e la principale fonte di inoculo degli aspergilli in campo; se i residui colturali vengono lasciati alla superficie del suolo, la sopravvivenza e la diffusione delle spore di questi funghi risulta facilitata, pertanto, lavorazioni del suolo che permettono l'interramento dei residui possono contribuire alla riduzione dell'inoculo, soprattutto se attuate in modo esteso negli areali di coltivazione.

A tal proposito può risultare utile anche la rotazione colturale, infatti, alternare più colture, specialmente se rilasciano pochi residui (soia e girasole), evita il continuo ed abbondante rilascio di residui nel suolo da parte del solo mais (Munkvold, 2014; Reyneri et al., 2013). La rotazione è quindi una buona alternativa alla monosuccessione, anche perché implica altri benefici come il contenimento di insetti fitofagi, patogeni e malerbe tipici del mais. Le lavorazioni, oltre alla gestione dei residui colturali, consentono una buona strutturazione del suolo, favorendo lo sviluppo radicale e quindi riducendo gli stress idrici e nutrizionali; per tali motivi, la semina su sodo è sconsigliata (Consorzio Fitosanitario di Modena).

4.1.2 Scelta dell'ibrido

La scelta dell'ibrido è la più importante decisione da affrontare prima della semina; gli ibridi commerciali di mais possono presentare diversi livelli di resistenza ai funghi aflatossigeni, come anche agli altri patogeni, pertanto, risulta necessario valutare quali di questi ibridi siano i più adatti, sulla base dei patogeni più comuni presenti nella zona di coltivazione interessata e informandosi sull'effettiva resistenza di questi ibridi in tale zona. In mancanza di queste informazioni, risulta solitamente vantaggiosa la scelta e la coltivazione di più ibridi, in quanto può fungere da ostacolo alla diffusione estesa delle contaminazioni, grazie alle diverse caratteristiche di ciascun ibrido (Munkvold, 2014).

La resistenza ai patogeni fungini può manifestarsi come capacità della pianta di ridurre l'infezione o di limitare la sintesi di tossine (Munkvold, 2014); comprendere i meccanismi di difesa a livello genico, trascrizionale e molecolare indotti dall'infezione e che stanno alla base della resistenza della pianta, può offrire suggerimenti utili per un miglioramento genetico mirato degli ibridi. Al momento, alcuni studi hanno scoperto in mais molti geni e vari QTL correlati alla resistenza ad *A. flavus*, ma i meccanismi molecolari non sono ancora conosciuti (Palumbo et al., 2020). La resistenza alle aflatossine è stata identificata in varie fonti, come le razze autoctone di mais provenienti dal Messico, e nonostante siano già state ottenute linee di mais resistenti attraverso il miglioramento genetico, queste ultime presentano in genere caratteri indesiderati; per tale motivo in commercio non sono ancora disponibili ibridi resistenti (Ojiambo et al., 2018).

Oltre alla resistenza genetica, gli ibridi presentano altre caratteristiche che indirettamente possono influenzare la capacità di resistenza; ad esempio, la scelta deve ricadere necessariamente sugli ibridi più adatti alle caratteristiche pedoclimatiche della zona di

coltivazione interessata, dato che, maggiore è la compatibilità della pianta con l'ambiente, minori saranno gli stress (Munkvold, 2014). È stato osservato, inoltre, che le contaminazioni da aflatossine sono maggiori negli ibridi tardivi; questo è dovuto alla coincidenza della fioritura con un periodo in cui si verificano alte temperature e siccità, e alla fase di maturazione più lunga, che lascia al fungo maggior tempo per lo sviluppo e la sintesi di tossine (Reyneri et al., 2013). Negli ibridi precoci, al contrario, le contaminazioni sono generalmente minori poiché la fioritura avviene in momenti relativamente meno caldi e siccitosi e la maturazione è più rapida. Altre caratteristiche possono riguardare la chiusura del cartoccio costituito dalle brattee, che protegge la spiga dalla piralide, e la composizione delle cariossidi, ad esempio, il maggiore spessore del pericarpo e la presenza di carotenoidi ne aumentano la resistenza (Munkvold, 2014; Reyneri et al., 2013).

4.1.3 Epoca di semina

La fioritura è una fase critica nel mais sia per quanto riguarda l'aspetto produttivo in carenza idrica, sia perché rappresenta la fase in cui gli aspergilli aflatossigeni sono facilitati nel penetrare le sete fiorali. La concomitanza della fioritura con le alte temperature e la siccità, tipici della seconda decade di luglio, ha effetti deleteri; mentre da un lato si verificano perdite di resa, dall'altro le infezioni sono ulteriormente favorite dall'indebolimento della pianta ospite e dalla prevalenza degli aspergilli nella competizione con gli altri funghi. Per scongiurare tali situazioni è opportuno anticipare la fioritura a fine giugno, periodo in cui le condizioni ambientali sono solitamente migliori (ma non sempre) in termini di temperature e piovosità, evitando quindi che la pianta subisca stress; questo si può ottenere anticipando, se possibile, la semina del mais tra marzo e inizio aprile e utilizzando ibridi medio-precoci. Dato che la coltura seminata anticipatamente risente delle basse temperature e risulta rallentata nella crescita, sono consigliate pratiche agronomiche che favoriscono il vigore delle piante dopo l'emergenza (*early vigor*); in tal senso sono vantaggiose le concimazioni a base di azoto e fosforo alla semina e le concimazioni azotate in copertura associate a sarchiature precoci (Reyneri et al., 2013). Altri effetti favorevoli della semina anticipata sono l'arrivo di piante meglio sviluppate nel periodo estivo, quindi meno suscettibili agli stress, l'asincronia con il ciclo della piralide e la raccolta precoce, che lascia meno tempo ai funghi per svilupparsi e sintetizzare tossine (Consorzio Fitosanitario di Modena).

Alcuni studi hanno dimostrato che anche le semine molto tardive, eseguite dopo la raccolta dei cereali autunno-vernini, contribuiscono a ridurre le contaminazioni in quanto la fioritura ricade nel periodo di fine estate, momento in cui le condizioni sono meno favorevoli per il fungo (Reyneri et al., 2013; Munkvold, 2014).

4.1.4 Irrigazione, concimazione, gestione delle malerbe

Il mais presenta una bassa tolleranza alla carenza idrica e questo comporta stress idrico, considerato il fattore più influente sulle contaminazioni da aflatossine (Palumbo et al., 2020). Questo stress innesca nella pianta la sovraregolazione dei geni legati alla siccità e la sottoregolazione dei geni inerenti all'assorbimento dei nutrienti e alla resistenza alle malattie, predisponendola quindi all'infezione (Damianidis et al., 2018). La pratica dell'irrigazione è perciò indispensabile dalla levata alla fioritura, e va eseguita attenendosi al fabbisogno idrico, considerando l'evapotraspirazione e le eventuali precipitazioni, dal momento che, al contrario, un eccessivo adacquamento può causare l'insorgenza di funghi produttori di fumonisine (*Fusarium* spp.). Va inoltre sottolineato che un altro momento in cui la carenza idrica comporta un elevato rischio di contaminazioni da aflatossine è quello successivo alla maturazione cerosa. Un ulteriore accorgimento è la scelta di ibridi tolleranti allo stress idrico (Palumbo et al., 2020; Consorzio Fitosanitario di Modena).

Per quanto riguarda la concimazione, in alcune prove, contaminazioni elevate sono state riscontrate solo in presenza di forti carenze di azoto (Reyneri et al., 2013). In generale, per evitare lo stress nutrizionale, è consigliata una concimazione equilibrata e senza eccessi (Munkvold, 2014; Consorzio Fitosanitario di Modena). Le malerbe, in competizione con la coltura per l'approvvigionamento idrico e nutrizionale, causano o esacerbano i suddetti stress, per tale motivo è opportuno il loro controllo.

4.1.5 Biocontrollo

Sebbene siano stati identificati e testati molti agenti di biocontrollo per contrastare gli aspergilli aflatossigeni in campo, ad ora, l'uso di isolati atossigeni di *A. flavus* risulta l'unica pratica efficace in campo su larga scala (Ojiambo et al., 2018; Palumbo et al., 2020). Questa pratica consiste nella distribuzione in campo, a coltura in atto, di isolati di *A. flavus* che non producono aflatossine, con l'obiettivo che questi ultimi sostituiscano

quelli tossigeni mediante esclusione competitiva, occupandone la nicchia ecologica (Palumbo et al., 2020).

Questi isolati, considerati a tutti gli effetti un principio attivo, vengono distribuiti sottoforma di cereali devitalizzati (semi di frumento, sorgo o orzo) inoculati alla loro superficie con le relative spore, che rappresentano una fonte di nutrienti per il fungo, garantendone il sostentamento, lo sviluppo e la sporulazione; grazie alla sporulazione, il fungo si disperde in campo e colonizza vari substrati organici, tra cui anche la coltura (Mauro et al., 2018). La distribuzione avviene a spaglio per mezzo di spandiconcime, dopo la sarchiatura ed entro due settimane prima dalla fioritura, allo stadio di quarta e quinta foglia. Il fatto che la distribuzione debba avvenire dopo la sarchiatura è fondamentale, poiché l'interramento dei semi inoculati impedirebbe la diffusione delle spore per mezzo dell'aria. Risulta fondamentale anche che avvenga prima della fioritura, in modo da precedere la diffusione dei funghi tossigeni (Corteva Agriscienze Italia – Cremona, Italia).

Nel mais, questa pratica di biocontrollo ha permesso di raggiungere riduzioni delle contaminazioni da aflatoossine variabili tra il 65% e il 95%, la sua efficacia è stata documentata in tutto il mondo anche in altre colture (Mauro et al., 2018), ma Palumbo et al. (2020) sottolineano che per massimizzare l'efficacia, gli isolati devono essere adattati alla coltura e all'ambiente di destinazione. Alcuni aspetti vantaggiosi da evidenziare sono la prolungata sporulazione sul cereale inoculato, che consente un'ampia finestra di attività, la diffusione anche nelle aree non trattate, e la permanenza in campo nei residui delle colture trattate o in altri substrati colonizzati, che estende l'effetto anche successivamente alla stagione colturale in cui è avvenuto il trattamento (Mauro et al., 2018). Va però detto che, come nel caso del prodotto commerciale “AF-X1” in Italia, l'utilizzo è autorizzato solo nel mais ad uso zootecnico e non alimentare umano (Corteva Agriscienze).

Oltre agli isolati atossigeni di *A. flavus*, anche altri microrganismi presentano buone potenzialità di biocontrollo, ma per la maggior parte sono stati testati solo in condizioni controllate e non sono ancora disponibili come prodotti commerciali; essi includono batteri, e funghi come lieviti, *Trichoderma* spp. e *Penicillium* (Shabeer et al., 2022).

4.1.6 Controllo della piralide del mais

È stato dimostrato che le contaminazioni da micotossine nel mais sono correlabili a molte specie di insetti; essi, infatti, diffondono direttamente i funghi a causa dei loro movimenti sulla pianta quando si trovano allo stadio larvale, e inoltre causano danni alla

pianta, soprattutto alla spiga, favorendo indirettamente le infezioni fungine. L'influenza degli insetti sulle contaminazioni da micotossine varia in base all'effetto che hanno le condizioni ambientali su loro stessi, sulle piante ospiti e sui funghi, e anche in base alla fase fenologica in cui la pianta viene attaccata; danni da insetti procurati alla spiga dall'allelagione all'inizio della maturazione cerosa favoriscono le contaminazioni, mentre se tali danni si verificano quando la spiga ha raggiunto un livello di umidità che non permette l'attività del fungo, l'entità delle contaminazioni non viene influenzata (Mazzoni e Cravedi, 2013).

Negli areali maidicoli europei, le principali specie di insetti dannose in tal senso appartengono all'ordine dei Lepidotteri, tra le quali, la più importante e diffusa è la piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*). La piralide (Fig. 4.1; Fig. 4.2) è una specie polifaga ma predilige principalmente le graminacee coltivate, come il mais; svolge 2-3 generazioni all'anno e sverna come larva matura negli stocchi. A maggio in seguito all'accoppiamento, le femmine depongono le uova sulla pagina inferiore delle foglie, dando origine quindi alle larve di prima generazione, che si nutrono delle giovani foglie, perforandole, e penetrano nel culmo. Raggiunta la fase adulta seguono l'accoppiamento, tra giugno e luglio, e la deposizione delle uova su foglie e spighe che dà origine alle larve di seconda generazione; questa generazione larvale risulta la più dannosa nel mais in quanto erode le cariossidi e scava gallerie in tutoli (Fig. 4.2), peduncoli e culmo. Prossime alla maturità le larve scavano ulteriori gallerie nel culmo per spostarsi nella parte inferiore della pianta, dove avverrà lo svernamento (Associazione Nazionale Bieticoltori; Mazzoni e Cravedi, 2013).

Nel loro insieme i danni comportano perdite di produzione dovute alla distruzione del sistema vascolare, alla caduta delle spighe durante la raccolta, causata dall'indebolimento del peduncolo, e al danneggiamento delle cariossidi. Inoltre, i danni alla spiga favoriscono l'infezione da parte dei funghi aflatossigeni, che viene ulteriormente facilitata dalla diffusione delle spore fungine dovuta alle larve stesse (Mazzoni e Cravedi, 2013).

Le ripercussioni che questo insetto ha in termini produttivi e di contaminazione da aflatossine rendono necessario il suo controllo, che ha mostrato riduzioni delle contaminazioni variabili tra il 15% e l'80%. Il monitoraggio delle popolazioni in campo rappresenta il primo passo e permette di identificare il picco di sfarfallamento degli adulti di prima generazione, per mezzo di trappole a feromoni o luminose, in modo da pianificare

e attuare tempestivamente il trattamento insetticida contro la seconda generazione; solitamente il picco di sfarfallamento e l'ovodeposizione si verificano durante la fase di invecchiamento/disseccamento delle sete, che per giunta è il momento più favorevole per l'infezione fungina. Va tenuto presente che in generale i trattamenti devono essere eseguiti prima che le larve di seconda generazione penetrino definitivamente nel culmo, ricordando che gli insetticidi solitamente usati, spesso, non sono né citotropici né sistemici (Mazzoni e Cravedi, 2013).

Per i trattamenti chimici si impiegano generalmente insetticidi ovo-larvicidi appartenenti ai piretroidi oppure basati su chlorantraniliprole, principio attivo che a differenza dei primi è selettivo nei confronti degli insetti utili, mentre per quanto riguarda quelli biologici, vengono impiegati l'entomopatogeno *Bacillus thuringiensis* e gli ooparassitoidi del genere *Trichogramma*; i prodotti insetticidi o a base di *B. thuringiensis* vengono irrorati sulla coltura tramite irroratrici scavallanti, mentre il *Trichogramma* viene distribuito solitamente con i droni, sottoforma di capsule di cellulosa contenenti uova parassitizzate (Magagnoli et al., 2021; Mazzoni e Cravedi, 2013). Uno studio biennale condotto in Nord Italia da Magagnoli et al. (2021), ha dimostrato che il controllo chimico a base di chlorantraniliprole è risultato più efficace nel ridurre l'infestazione rispetto a quello biologico, che invece ha combinato l'uso di *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *Trichogramma brassicae*; il controllo biologico, però, viene comunque considerato un approccio fattibile, con un'efficacia che dipende molto dalla sincronizzazione dei lanci del parassitoide con l'ovodeposizione della piralide.

Altre tecniche di controllo sono la rotazione colturale, la semina anticipata, la distruzione e l'interramento degli stocchi, la confusione sessuale e la coltivazione di mais BT, ibridi transgenici contenenti geni di *B. thuringiensis* che esprimono proteine insetticide, tossiche soprattutto nei confronti delle larve dei Lepidotteri (Mazzoni e Cravedi, 2013).



Figura 4.1 Femmina (sinistra) e maschio (destra) adulti di piralide (fonte: Associazione Nazionale Bieticoltori).



Figura 4.2 Larva di piralide e relativo danno su spiga di mais.

4.1.7 Raccolta

La raccolta anticipata del mais rappresenta un'altra pratica fondamentale per ridurre le contaminazioni; la fase di maturazione avanzata delle cariossidi presenta le condizioni ideali per lo sviluppo dei funghi aflatossigeni (Reyneri et al., 2013), pertanto, maggiore è il periodo di maturazione in campo, maggiore sarà la crescita fungina e la sintesi di aflatossine (Consorzio Fitosanitario di Modena). Inoltre, dato che la sintesi incrementa rapidamente a temperature superiori a 25°C e quando l'umidità delle cariossidi scende al di sotto del 28%, l'anticipo della raccolta permette anche di evitare il raggiungimento di valori di umidità molto bassi, soprattutto nelle annate calde e siccitose. Valori di umidità alla raccolta variabili tra il 22% e il 24% sono considerati un buon compromesso, ma comunque non devono essere inferiori al 20% (Palumbo et al., 2020). Un ritardo di due

settimane nella raccolta, con un calo di 6-7 punti percentuali di umidità della granella, causa un aumento della contaminazione di almeno due volte (Battilani et al., 2013).

La regolazione della mietitrebbia è un aspetto da non sottovalutare; una raccolta eseguita correttamente, oltre che ad una giusta umidità, consente di ottenere una granella con meno rotture e impurità (Munkvold, 2014), le quali rappresentano un ottimo substrato per funghi e insetti e/o una fonte di inoculo fungino nel post-raccolta (Channaiah e Maier, 2014). Va precisato infatti che le infezioni da aspergilli oltre che in campo, su cariossidi in maturazione o mature, possono insorgere anche durante la raccolta, lo stoccaggio e la lavorazione (Zakaria, 2024).

4.2 Strategie di post-raccolta

I funghi sono la principale causa di deterioramento del mais nel post-raccolta, comportando perdite e influenzando negativamente sui parametri qualitativi e sanitari, data la sintesi di micotossine da parte di alcune specie (Channaiah e Maier, 2014). L'infezione fungina nel post-raccolta è fortemente correlata alla presenza dei funghi in campo (Battilani et al., 2012), in quanto questi ultimi vengono trasferiti ai centri di stoccaggio principalmente attraverso impurità e materiali indesiderati già colonizzati, ad esempio la granella ammuffita, o che comunque possono presentare spore o favorire l'infezione fungina. Nonostante la prevenzione in campo, funghi aflatossigeni e relative tossine possono comunque arrivare alle fasi successive alla raccolta, pertanto, è fondamentale che queste fasi siano gestite accuratamente, attuando le pratiche più opportune (Battilani et al., 2012).

4.2.1 Separazione delle partite

Dopo la raccolta, la prima operazione da effettuare nei centri di stoccaggio consiste nella classificazione delle partite di granella sulla base del contenuto in aflatossine; questo è necessario sia per l'imposizione normativa di limiti massimi differenziati per destinazione d'uso, quindi alimentare e mangimistico, sia per valorizzare le produzioni che presentano una ridotta contaminazione. Perché questo sia possibile, nei centri di stoccaggio devono essere presenti strutture adeguatamente ampie che consentano di mantenere separate le diverse partite, e inoltre, si rendono necessari metodi di analisi specifici. Un

metodo utilizzato in passato sfrutta la fluorescenza emessa dall'acido cogico, un metabolita sintetizzato dagli aspergilli, per identificare la presenza di questi ultimi nelle cariossidi; la previsione del contenuto in aflatossine si basa sulla conta delle cariossidi fluorescenti, ma nonostante avvenga l'identificazione della presenza dei funghi, questo metodo non permette né la quantificazione precisa delle aflatossine, né soprattutto l'effettiva certezza che esse siano presenti. La presenza di acido cogico indica la presenza del fungo, ma non implica necessariamente la contaminazione da aflatossine. Gli altri metodi utilizzati sono i saggi immunochimici, già descritti nel precedente capitolo (Reyneri et al., 2013).

4.2.2 Essiccazione

L'essiccazione del mais è una pratica fondamentale, in quanto tipicamente l'umidità alla raccolta, specialmente nel caso delle raccolte anticipate, non è sufficientemente bassa da consentire un'adeguata conservazione. Il mais, in genere, viene conservato a un'umidità del 13-14%, anche se in presenza di funghi aflatossigeni è consigliato venga portata ad un valore inferiore al 13%. Per ridurre l'attività fungina il tempo che intercorre tra raccolta e il termine dell'essiccazione deve essere per quanto possibile minimizzato, quindi, è consigliata un'essiccazione tempestiva, entro 24-48 ore dalla ricezione della granella nei centri di stoccaggio. Essiccazioni a 70°C per 24 ore hanno mostrato una più elevata efficacia nel contenimento dei funghi, rispetto a quanto avviene utilizzando temperature maggiori e tempi inferiori (Palumbo et al., 2020; Consorzio Fitosanitario di Modena). L'essiccazione e il raffreddamento rapidi comportano un danneggiamento della granella di mais, in quanto molto suscettibile alle microfessurazioni dell'endosperma (*cracking*), esponendola quindi maggiormente al rischio di rottura, alle infezioni fungine e agli attacchi di insetti durante la conservazione; la gravità di questo danno viene misurata attraverso l'indice di fessurazione da stress (*stress crack index*) (Hawkins et al., 2005). Hawkins et al. (2005) affermano che nonostante le temperature di essiccazione tra 60°C e 70°C consentano un buon contenimento dei funghi, esse causano l'aumento delle fessurazioni nella granella, perciò, viene raccomandata una temperatura di essiccazione inferiore a 60°C.

4.2.3 Pulitura e detossificazione

Nei centri di stoccaggio prima e dopo l'essiccazione viene eseguita, in più fasi, la pulizia della granella, che consiste nell'eliminazione di impurità e materiali indesiderati in essa presenti, quali possono essere polveri, farine, granella rotta e ammuffita, parti di spiga, parti di piante, altri cereali, semi di infestanti e terra, che nel loro insieme possono favorire le contaminazioni da funghi e tossine, come anche le infestazioni da insetti (Reyneri et al., 2013; Channaiah e Maier, 2014; Munkvold, 2014). Frazioni fini e granella rotta derivano in genere da tutte quelle operazioni che comportano la manipolazione della granella stessa, quindi, è opportuno ridurre al minimo i passaggi e le movimentazioni, non solo per una questione qualitativa e sanitaria, ma anche perché, soprattutto le frazioni fini, trattengono maggiormente l'umidità e impediscono un corretto flusso d'aria all'interno della massa durante l'essiccazione e l'aereazione (Channaiah e Maier, 2014).

Le fasi di pulitura dalle impurità più leggere o di piccole dimensioni avvengono per mezzo di appositi macchinari che eseguono operazioni di setacciatura e aspirazione, mentre per un'azione più efficace vengono utilizzate le selezionatrici ottiche, che individuano e scartano le cariossidi nere e ammuffite; nel caso di contaminazioni non troppo elevate (<60 ppb) e in presenza di alti quantitativi di impurità (20-40%), tali operazioni permettono di riportare il contenuto di aflatossine al di sotto dei limiti massimi ammessi per l'uso mangimistico (Reyneri et al., 2013).

La limitata azione della pulitura nel ridurre le contaminazioni è fonte di stimolo per la ricerca e lo sviluppo di metodi di detossificazione più efficaci; numerosi nuovi metodi sono in fase di sperimentazione, ma attualmente nessuno di essi viene impiegato nella pratica. Uno studio ha riportato la completa degradazione delle aflatossine B1, B2 e G1 in seguito ad un trattamento termico a 217°C per 35 minuti; tuttavia, bisogna considerare che nonostante l'efficacia e la relativa economicità di questo trattamento, l'utilizzo di temperature e tempi così elevati, per sopperire alla stabilità termica di queste micotossine, comporta lo scadimento qualitativo della granella. Altri studi hanno verificato gli effetti sull'aflatoxina B1 nel mais in seguito all'utilizzo di raggi UV e raggi gamma, ottenendo riduzioni variabili tra il 60% e il 90%, e in seguito all'ozonizzazione una riduzione dell'88%. In vari studi, sono state ottenute riduzioni delle micotossine variabili tra il 60% e il 100%, in seguito a trattamenti biologici basati su *Bacillus*, lieviti, estratti botanici ed

enzimi (Palumbo et al., 2020). Ulteriori studi hanno utilizzato in modo innovativo il plasma freddo, con cui sono state ottenute riduzioni delle aflatossine fino al 95% in vari cereali (Shabeer et al., 2022). Il plasma freddo è un gas parzialmente ionizzato generato sottoponendo uno specifico gas a pressione atmosferica ad una elevata tensione elettrica, provocandone la ionizzazione; la ionizzazione rilascia varie specie chimiche reattive in grado di degradare i contaminanti alimentari. Questo metodo è relativamente economico e agendo a più basse temperature può preservare le caratteristiche qualitative degli alimenti (Spadaro et al., 2019).

4.2.4 Conservazione

La conservazione del mais è condizionata dalla temperatura e dall'umidità di granella e aria interstiziale, e dalla composizione dei gas, in quanto questi parametri influenzano la crescita dei funghi e la sintesi di micotossine, quindi, se gestiti male possono aggravare le contaminazioni (Battilani et al., 2012; Channaiah e Maier, 2014). Per una corretta conservazione è necessario considerare che i funghi più comuni in questa fase, come *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., proliferano a umidità della granella fino al 13% e umidità relative in equilibrio comprese tra il 65% e il 90% (Channaiah e Maier, 2014); per tale motivo si deve tendere a un'umidità di conservazione del 12-13% (Reyneri et al., 2013).

La formazione di condensa, oltre all'errata essiccazione della granella, rappresenta un grave problema. Durante la conservazione, all'interno della massa di granella, il movimento di correnti d'aria nei silos può causare la formazione di condensa nella parte superiore e lungo le pareti, creando zone più umide nella massa stessa in cui possono svilupparsi i funghi; questo può essere evitato con l'aerazione. L'aerazione consiste nel forzare bassi volumi di aria attraverso la massa, consentendone il raffreddamento ed evitando la condensazione, in quanto viene limitato lo sbalzo termico con l'ambiente esterno; l'aerazione deve essere attivata quando la temperatura dell'aria esterna è inferiore di 5°C rispetto a quella interna ai silos. Inoltre, il mantenimento di basse temperature rallenta o arresta l'attività dei funghi e riduce la popolazione di insetti (Channaiah e Maier, 2014).

Un'altra pratica di contenimento dell'attività fungina, durante la conservazione, consiste nell'impiego di atmosfera controllata basata su alte concentrazioni di anidride carbonica o azoto. L'anidride carbonica ha un effetto diretto di inibizione in quanto tossica per i funghi, mentre l'azoto ad alte concentrazioni agisce per privazione dell'ossigeno (Moncini et al., 2020). L'uso di anidride carbonica al 25% mostra una buona efficacia nel

contenere lo sviluppo degli aspergilli, e a concentrazioni superiori al 50% riduce significativamente la sintesi di aflatossine (Battilani et al., 2012). In uno studio condotto da Moncini et al. (2020), l'uso di azoto al 98,5% ha portato ad una forte riduzione della sporulazione di *A. flavus* e della relativa sintesi di tossine su granella di mais.

Il costante controllo dell'andamento della conservazione è fondamentale per rilevare tempestivamente la presenza dei fenomeni di deterioramento, ed è attuato attraverso il regolare campionamento della granella e il monitoraggio dei livelli di temperatura e anidride carbonica. Il monitoraggio della temperatura è un sistema che può essere utilizzato per rilevare i "punti caldi", cioè zone della massa di granella in cui avviene un riscaldamento a causa dell'attività fungina, oltre che degli insetti, ma se tali zone sono distanti dai sensori, il rilevamento della variazione di temperatura non è immediato. Il monitoraggio dell'anidride carbonica, invece, rileva l'aumento di concentrazione dell'anidride carbonica derivante dalla respirazione fungina; questo sistema risulta più efficace del precedente poiché l'anidride carbonica, in quanto gas, si sposta attraverso la massa di granella e raggiunge velocemente i sensori posti sulla sommità dei silos, che possono quindi rilevare l'aumento di questo gas e segnalare la presenza di deterioramento più rapidamente rispetto alle variazioni di temperatura. Non appena viene rilevata la presenza di alterazione, è indispensabile provvedere all'immediata aerazione in modo da consentire il raffreddamento e l'asciugatura della massa e, se necessario, può essere previsto lo scarico della struttura di stoccaggio (Channaiah e Maier, 2014).

CAPITOLO 5:

CONCLUSIONI

Da questa trattazione è possibile desumere quanto le aflatossine rappresentino da decenni, e tuttora, una seria problematica a livello mondiale; la notevole tossicità per l'uomo e gli animali, e la costante presenza in colture di fondamentale importanza alimentare, con tutte le implicazioni del caso, comportano incertezza e ingenti costi in più settori economici.

Il tema delle aflatossine offre un campo di ricerca aperto e pone importanti sfide alla comunità scientifica su più aspetti, che si estendono dalla gestione preventiva in campo e durante lo stoccaggio, alla mitigazione dei fenomeni di contaminazione, specialmente nel contesto climatico odierno, caratterizzato sempre più frequentemente da eventi atmosferici estremi che inducono le colture a stati di stress e al contempo favoriscono le avversità.

Importante quanto la ricerca è la messa in pratica delle conoscenze derivanti dai progressi scientifici; le attuali strategie conosciute per la prevenzione in campo, seppur nella loro relativa semplicità, rappresentano un buon approccio nella lotta preventiva alle contaminazioni da aflatossine, soprattutto se vengono attuate in modo esteso negli areali di coltivazione. Urge pertanto l'informazione e la formazione degli agricoltori in merito, dal momento che essi sono oltretutto i primi operatori della filiera e in quanto tali risentono direttamente e maggiormente di questa problematica.

Tra le pratiche agronomiche preventive, la scelta dell'ibrido è sicuramente importante, poiché da essa dipende il livello di vulnerabilità della coltura all'infezione fungina; sebbene le caratteristiche dell'ibrido come l'adattamento all'ambiente, la precocità e la tolleranza allo stress idrico siano importanti, la resistenza genetica potrebbe essere la chiave risolutiva nel ridurre l'entità delle contaminazioni, tuttavia, si riscontra ancora la mancanza di ibridi commerciali resistenti.

Una prevenzione efficace è possibile se attuata in campo sin dall'inizio e se protratta anche nelle fasi di stoccaggio, ma in annate particolarmente favorevoli le contaminazioni sono inevitabili e nasce quindi l'esigenza di risanare le partite contaminate. A tal proposito si evidenzia la scarsa disponibilità di metodi di detossificazione, probabilmente aggravata dalle stringenti normative, come il Regolamento EU 2023/915, che impone limiti

severi e vieta il ricorso ai trattamenti chimici. La ricerca da questo punto di vista è attiva e varie sono le tecnologie che hanno dimostrato elevata efficacia nella degradazione delle aflatossine, tuttavia, non sono ancora state sviluppate in modo tale da essere impiegate nella gestione pratica.

BIBLIOGRAFIA

- Alkuwari, A., Hassan, Z. U., Zeidan, R., Al-Thani, R., & Jaoua, S. (2022). Occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in cereals and application of yeast volatiles for their biological control. *Toxins*, 14(6), 404.
- Asgarivessal, M., Zafari, D., & Soltani, J. (2023). Heterothallism and sexual reproduction in the Iranian isolates of *Aspergillus flavus*. *Mycologia Iranica*, 10(2), 33-44.
- Assefa, Y., Roozeboom, K. L., Thompson, C., Schlegel, A., Stone, L., & Lingenfelter, J. (2013). Corn and grain sorghum morphology, physiology, and phenology. *Corn and Grain Sorghum Comparison: All Things Considered*, 3-14.
- Bailoni, L., Pietri, A., Gallo, A., Masoero, F., & Piva, G. (2013). Le aflatossine nelle filiere agro-alimentari: dal feed al food. *Georgofili: quaderni: I, 2013*, 57-82.
- Balková, D., Raj, R., Rieder, H. E., Camardo Leggieri, M., & Battilani, P. (2026). Predicting aflatoxin risk with seasonal meteorological forecast. *Environmental Research Letters*, 21(2), 024016.
- Battilani, P., Camardo Leggieri, M., Giorni, P., & Mauro, A. (2013). *Aspergillus flavus* in mais: conoscere per prevenire le contaminazioni. *Georgofili: quaderni: I, 2013*, 17-31.
- Battilani, P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., Van der Fels-Klerx, H. J., Booi, C. J. H., Moretti, A., Logrieco, A., Miglietta, F., Toscano, P., Miraglia, M., De Santis, B., & Brera, C. (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *EFSA Supporting Publications*, 9(1), 223E.
- Brera, C., & Guarino, C. (2013). Aflatossina B1 nel mais: aspetti normativi e valutazione dei residui nelle specie animali. *Georgofili: quaderni: I, 2013*, 83-99.
- Buffoli, M. (2014-2015). Caratterizzazione e valorizzazione di un'antica varietà di mais della Valle Camonica: il mais Nero Spinoso. Tesi di Laurea. Relatore Giorgi, A. Correlatori Pilu, S. R., & Giupponi, L. Corso di Laurea in Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio Montano, Facoltà di Scienze Agrarie e Alimentari, Università degli Studi di Milano.
- Cereser, A., Favero, L., Pulze, S., & Barberio, A. (2004). Aflatossine e aflatoxicosi. *Large Animal Review*, 1, 3-7.

- Chalivendra, S. C., DeRobertis, C., Chang, P. K., & Damann, K. E. (2017). Cyclopiazonic acid is a pathogenicity factor for *Aspergillus flavus* and a promising target for screening germplasm for ear rot resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(5), 361-373.
- Channaiah, L. H., & Maier, D. E. (2014). Best stored maize management practices for the prevention of mycotoxin contamination. *In: Mycotoxin Reduction in Grain Chains*, Wiley Blackwell: 78-88.
- Damianidis, D., Ortiz, B. V., Bowen, K. L., Windham, G. L., Hoogenboom, G., Hagan, A., Knappenberger, T., Abbas, H. K., Scully, B. T., & Mourtzinis, S. (2018). Minimum temperature, rainfall, and agronomic management impacts on corn grain aflatoxin contamination. *Agronomy Journal*, 110(5), 1697-1708.
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Tigchelaar, M., Battisti, D. S., Merrill, S. C., Huey, R. B., & Naylor, R. L. (2018). Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science*, 361(6405), 916-919.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. R., Leblanc, J. C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Marko, D., Oswald, I. P., Piersma, A., Routledge, M., Schlatter, J., Baert, K., Gergelova, P., & Wallace, H. (2020). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal*, 18(3), e06040.
- Erenstein, O., Jaleta, M., Sonder, K., Mottaleb, K., & Prasanna, B. M. (2022). Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. *Food Security*, 14(5), 1295-1319.
- Frisio, D.G. (2010). Impatto economico sulla filiera mais-zootecnia. (Intervento presentato al convegno Giornata del mais 2010, Bergamo 2010).
- Fu, Y., Zhang, J., & Guan, T. (2023). High-value utilization of corn straw: from waste to wealth. *Sustainability*, 15(19), 14618.
- Gadag, R. N., Bhat, J. S., Mukri, G., Gogoi, R., Suby, S. B., Das, A. K., Yadav, S., Yadava, P., Nithyashree, M. L., Naidu, G. K., Yadav, S. K., & Shilpa, K. (2021). Resistance to biotic stress: theory and applications in maize breeding. *In: Genomic Designing for Biotic Stress Resistant Cereal Crops*. Cham: Springer International Publishing: 129-175.
- García-Lara, S., & Serna-Saldivar, S. O. (2019). Corn history and culture. *Corn*, 1-18.
- Goda, A. A., Shi, J., Xu, J., Liu, X., Zhou, Y., Xiao, L., Abdel-Galil, M., Salem, S. H., Ayad, E. G., Deabes, M., Poee, O., Abou Donia, M. A., Abou-Arab, A. A. K., &

- Ramzy, S. (2025). Global health and economic impacts of mycotoxins: a comprehensive review. *Environmental Sciences Europe*, 37(1), 122.
- Hawkins, L. K., Windham, G. L., & Williams, W. P. (2005). Effect of different postharvest drying temperatures on *Aspergillus flavus* survival and aflatoxin content in five maize hybrids. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1521-1524.
- Horn, B. W., Ramirez-Prado, J. H., & Carbone, I. (2009). Sexual reproduction and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2), 169-175.
- Jallow, A., Xie, H., Tang, X., Qi, Z., & Li, P. (2021). Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 2332-2381.
- Jiao, Y., Chen, H. D., Han, H., & Chang, Y. (2022). Development and utilization of corn processing by-products: A review. *Foods*, 11(22), 3709.
- Katati, B., Kovács, S., Njapau, H., Kachapulula, P. W., Zwaan, B. J., van Diepeningen, A. D., & Schoustra, S. E. (2024). Maize *Aspergillus* section *Flavi* isolate diversity may be distinct from that of soil and subsequently the source of aflatoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 40(3), 351-367.
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 713-722.
- Lacis, A. A., Schmidt, G. A., Rind, D., & Ruedy, R. A. (2010). Atmospheric CO₂: Principal control knob governing Earth's temperature. *Science*, 330(6002), 356-359.
- Magagnoli, S., Lanzoni, A., Masetti, A., Depalo, L., Albertini, M., Ferrari, R., Spadola, G., Degola, F., Restivo, F. M., & Burgio, G. (2021). Sustainability of strategies for *Ostrinia nubilalis* management in Northern Italy: potential impact on beneficial arthropods and aflatoxin contamination in years with different meteorological conditions. *Crop Protection*, 142, 105529.
- Matabaro, E., Ishimwe, N., Uwimbabazi, E., & Lee, B. H. (2017). Current immunoassay methods for the rapid detection of aflatoxin in milk and dairy products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 808-820.
- Mauro, A., Garcia-Cela, E., Pietri, A., Cotty, P. J., & Battilani, P. (2018). Biological control products for aflatoxin prevention in Italy: commercial field evaluation of atoxigenic *Aspergillus flavus* active ingredients. *Toxins*, 10(1), 30.
- Mazzoni, E., & Cravedi, P. (2013). Prevenire le aflatossine attraverso il controllo degli insetti. *Georgofili: quaderni: I*, 2013, 49-56.

- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29(2), 111-142.
- Moncini, L., Sarrocco, S., Pachetti, G., Moretti, A., Haidukowski, M., & Vannacci, G. (2020). N₂ controlled atmosphere reduces postharvest mycotoxins risk and pests attack on cereal grains. *Phytoparasitica*, 48(4), 555-565.
- Munkvold, G. (2014). Crop management practices to minimize the risk of mycotoxins contamination in temperate-zone maize. In: *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*, Wiley Blackwell: 59-77.
- Nleya, T., Chungu, C., & Kleinjan, J. (2016). Corn growth and development. *Grow Corn Best Manag. Pract*, 722, 2019-09.
- Ojiambo, P. S., Battilani, P., Cary, J. W., Blum, B. H., & Carbone, I. (2018). Cultural and genetic approaches to manage aflatoxin contamination: recent insights provide opportunities for improved control. *Phytopathology*, 108(9), 1024-1037.
- Okechukwu, V. O., Adelusi, O. A., Kappo, A. P., Njobeh, P. B., & Mamo, M. A. (2024). Aflatoxins: occurrence, biosynthesis, mechanism of action and effects, conventional/emerging detection techniques. *Food Chemistry*, 436, 137775.
- Palumbo, R., Goncalves, A., Gkrillas, A., Logrieco, A., Dorne, J. L., Dall'Asta, C., Venancio, A., & Battilani, P. (2020). Mycotoxins in maize. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(1), 5-28.
- Pasti, M. (2013). La produzione di mais in Italia. *Georgofili: quaderni: I, 2013*, 7-16.
- Pasti, M. (2023). Ascesa e declino della maiscoltura in Italia. *Rivista di Storia dell'agricoltura», LXIII, 2*, 125-138.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2022). *Aspergillus* and related teleomorphs. In: *Fungi and Food Spoilage*. Cham: Springer International Publishing: 351-439.
- Pócsi, I., Giacometti, F., Ambrus, Á., & Logrieco, A. F. (2020). *Aspergillus*-derived mycotoxins in the feed and food chain. *Front. Microbiol.*, 11: 606108.
- Rafique, S. (2023). Physiological and biochemical responses in maize under drought stress. In: *Maize Improvement: Current Advances in Yield, Quality, and Stress Tolerance Under Changing Climatic Scenarios*. Cham: Springer International Publishing: 117-136.
- Reyneri, A., Blandino, M., & Vanara, F. (2013). L'agrotecnica per la prevenzione della contaminazione da aflatoxina in campo e nel post raccolta. *Georgofili: quaderni: I, 2013*, 33-47.

- Ruiz Posse, A. M., Torrico Ramallo, A. K., Barontini, J. M., & Camiletti, B. X. (2024). Mating type of native *Aspergillus flavus* strains causing corn ear rot in Argentina. *Agronomy*, *14*(12), 2962.
- Shabeer, S., Asad, S., Jamal, A., & Ali, A. (2022). Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review. *Toxins*, *14*(5), 307.
- Spadaro, D., Prencipe, S., Valente, S., Piombo, E., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2019). Presenza di funghi micotossigeni e gestione del rischio di contaminazione da micotossine nella frutta secca. *Protezione delle Colture*, *12*, 17-25.
- Sweany, R. R., Breunig, M., Opoku, J., Clay, K., Spatafora, J. W., Drott, M. T., Baldwin, T. T., & Fountain, J. C. (2022). Why do plant-pathogenic fungi produce mycotoxins? Potential roles for mycotoxins in the plant ecosystem. *Phytopathology*, *112*(10), 2044-2051.
- Veljković, V. B., Biberdžić, M. O., Banković-Ilić, I. B., Djalović, I. G., Tasić, M. B., Nježić, Z. B., & Stamenković, O. S. (2018). Biodiesel production from corn oil: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *91*, 531-548.
- Wise, K., Allen, T., Chilvers, M., Faske, T., Isakeit, T., Mueller, D., Price, T., Sisson, A., Smith, D., Tenuta, A. (2024). An Overview of Ear Rots. 2024. Crop Protection Network.
- Yohannis, E., Urugo, M. M., Teka, T. A., Getachew, P., Tola, Y. B., Forsido, S. F., Kebede, Y. S., & Teferra, T. F. (2025). Aflatoxin contamination in agri-food systems: a comprehensive review of toxicity, food security, economic impacts, and sustainable mitigation across the value chain. *Food Science & Nutrition*, *13*(10), e71104.
- Zakaria, L. (2024). An overview of *Aspergillus* species associated with plant diseases. *Pathogens*, *13*(9), 813.

SITOGRAFIA

<https://www.fao.org/faostat/en/#home>

[https://www.treccani.it/enciclopedia/mais_\(Dizionario-di-Storia\)/](https://www.treccani.it/enciclopedia/mais_(Dizionario-di-Storia)/)

<https://esploradati.istat.it/databrowser/>

<https://www.ismeamercati.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/12522>

http://www.acutis.it/Materiale_Agronomia/MAIS_2.pdf

https://www.ruralp.it/wp-content/uploads/2024/02/24_modello_culturale.pdf

<https://icl-growingsolutions.com/it-it/agriculture/crops/maize/>

https://www.fidaf.it/wp-content/uploads/2024/11/Amedeo-REYNERI_La-produzione-delle-granelle-per-l'alimentazione-animale.pdf

<https://italiaeconomy.it/giornata-del-mais-2025-2/>

<https://agricommerciogardencenter.edagricole.it/news/micotossine-nel-mais-i-principali-indirizzi-di-ricerca/>

<https://terraevita.edagricole.it/agrofarmaci-difesa/unannata-da-aflatossine/#>

<https://agronotizie.imaginenetwork.com/difesa-e-diserbo/2018/07/23/aflatossine-i-nuovi-risultati-del-progetto-gira/59613>

<http://data.europa.eu/eli/reg/2023/915/2025-10-08>

<http://data.europa.eu/eli/dir/2002/32/2019-11-28>

<http://data.europa.eu/eli/dir/2003/100/oj>

<https://antescientific.com/it/prodotti/tecniche/che-cose-lhplc/>

<https://www.creative-diagnostics.com/lateral-flow-immunoassay-lfia-platform.htm>

<https://www.cimbria.com/it/informazioni-su/notizie-e-casi/innovazione-nella-selezione-ottica-del-mais-con-aflatossine/>

https://www.fitosanitario.mo.it/index.php/download_file/view/1528/1107/

<https://www.corteva.it/content/dam/dpagco/corteva/eu/it/it/files/cp/brochures/DF-AF-X1-volantino.pdf>

<https://www.anb.it/tecniche-di-contenimento-della-piralide-del-mais/>

<https://www.anb.it/wp-content/uploads/2021/06/MAIS-CONTENIMENTO-PIRALIDE-2021.pdf>