

PAOLA BATTILANI*, MARCO CAMARDO LEGGIERI*,
PAOLA GIORNI*, ANTONIO MAURO*

Aspergillus flavus in mais: conoscere per prevenire le contaminazioni

AFLATOSSINE NEL MAIS: I FUNGHI PRODUTTORI

La contaminazione da aflatossine nel mais è un problema a diffusione mondiale che è maggiormente presente nelle aree tropicali ma recentemente, a causa dei cambiamenti climatici in atto, si manifesta sempre più frequentemente anche in Europa. *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* sono ritenuti i principali responsabili della produzione di aflatossine; questi funghi sono xerofili e quindi più adatti a condizioni di alte temperature e piogge limitate o assenti (Payne, 1998).

Aspergillus flavus e *A. parasiticus* sono funghi appartenenti alla medesima sezione di *Asperigilli*, la sezione *Flavi*, che possono contaminare i prodotti agricoli già in campo, al momento della raccolta, durante lo stoccaggio e durante i processi di trasformazione (Diener et al., 1987). Una caratteristica che aiuta a distinguere queste due specie è che *A. parasiticus* sembra essere più adattato all'ambiente terricolo con maggiore incidenza nelle arachidi, mentre *A. flavus* sembra essere più adattato all'ambiente aereo e fogliare risultando dominante nel mais e nel cotone (Diener et al., 1987). Entrambi queste specie possono produrre aflatossine.

I ceppi di *A. flavus* possono essere suddivisi in 2 gruppi sulla base della dimensione degli sclerozi che producono: i ceppi S sono quelli che producono sclerozi molto piccoli (<400 µm) e sono in grado di produrre alte quantità di aflatossine mentre i ceppi L producono meno sclerozi ma più grandi (>400µm) e la capacità di produrre aflatossine è molto variabile (Cotty, 1989).

* Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Le aflatossine sono sostanze tossiche per l'uomo e gli animali superiori classificate dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC, 2002) in classe 1 in quanto cancerogene per l'uomo. Sono considerate come le sostanze naturali più tossiche che si conoscano, in grado di causare tossicità sia acuta sia cronica e contribuiscono in modo significativo alla collocazione delle micotossine al primo posto come sostanze tossiche che giungono all'uomo attraverso il cibo (Amaiike e Keller, 2011). Tra gli effetti di maggiore rilevanza è certamente da ricordare l'immunodepressione, che contribuisce in modo significativo alla manifestazione di diverse patologie quali l'epatite, soprattutto in popolazioni a elevata esposizione (Shephard, 2008). L'alta tossicità di questi composti giustifica l'attenzione che hanno suscitato nell'ultimo ventennio e gli sforzi fatti per ridurre il rischio di esposizione sia dell'uomo sia degli animali, sia con la definizione di limiti di legge che definiscono la massima presenza ammessa in varie materie prime e prodotti derivati, sia negli studi volti ad approfondire le conoscenze al fine di comprendere meglio i fenomeni e come prevenirli.

Le aflatossine, e più in generale le micotossine, sono metaboliti secondari e quindi non si riconosce loro un ruolo nel processo di patogenesi. Pertanto, lo sviluppo dei funghi produttori sull'ospite, e in particolare la comparsa di sintomi visibili, non sono proporzionalmente correlati alla presenza dei metaboliti. Da qui la necessità di individuare e applicare mezzi preventivi che minimizzino le contaminazioni.

ECOLOGIA DI *ASPERGILLUS* SEZIONE *FLAVI*

Sebbene il suolo sia l'habitat primario di *Aspergillus* sezione *Flavi*, poco si conosce riguardo al ciclo vitale di questi funghi nel suolo. *Aspergillus flavus* è in grado di sopravvivere e svernare nei residui colturali come micelio o sclerozi; questi rappresentano la fonte di nuovi conidi che possono iniziare il ciclo d'infezione su nuove piante ospiti. I principali fattori che influenzano la popolazione nel suolo di questi funghi sono la temperatura e l'umidità del terreno.

Le temperature per la crescita di *A. flavus* possono variare da un minimo di 10-12°C, a un massimo di 43-48.8°C con un ottimo di 33-34°C. Il livello di acqua libera (a_w) necessaria per la crescita varia secondo la temperatura (Pitt e Hocking, 2009), ma *A. flavus* può crescere e produrre micotossine fino a una minima a_w di 0.73 e 0.85, rispettivamente (Sanchis e Magan, 2004). Questi livelli corrispondono indicativamente a 8-12% e a 17-19% di contenuto di umidità nel mais (Battilani et al., 2007).

Aspergillus flavus ha un'elevata efficienza nella produzione di aflatossine e *in vitro* su substrato artificiale è stata osservata una produzione media giornaliera fino a 12 µg/kg che può essere molto maggiore su substrato naturale quale la granella di mais (Giorni et al., 2011). Infatti, in mais raccolto e mantenuto a temperatura ambiente per 10 giorni è stato riscontrato un valore di aflatossine superiore a 800 µg/kg a fronte di tracce quantificate in corrispondenza della raccolta.

In presenza di alte temperature e bassa a_w , condizioni associate normalmente alla siccità nelle colture agricole delle zone sub-tropicali, *A. flavus* può diventare molto competitivo e la specie fungina dominante nel terreno (Payne, 1998). L'elevata competitività in queste condizioni è stata confermata anche da Giorni et al. (2009).

Aspergillus flavus può rimanere attivo, o originare nuove infezioni in post-raccolta, e ciò può risultare in un aumento nella contaminazione da aflatossine se le fasi di essiccazione e di stoccaggio non sono state gestite adeguatamente. L'infezione in post-raccolta è strettamente legata alla presenza del fungo in campo, infatti, le cariossidi colonizzate da *Aspergillus* sezione *Flavi* rappresentano l'inoculo per l'infezione durante il periodo di stoccaggio. In questo modo, le infezioni fungine in campo possono essere un'importante fonte per la formazione di micotossine nelle successive fasi della catena di lavorazione e utilizzo. Negli ecosistemi della granella stoccata, le condizioni abiotiche identificate come più importanti per l'influenza che possono esercitare sulla crescita e la produzione di micotossine sono l' a_w , la temperatura e, quando la granella è umida, la composizione dei gas atmosferici (Guynot et al., 2003; Magan et al., 2004; Giorni et al., 2008b).

DIFFUSIONE NEL MONDO DI *ASPERGILLUS* SEZIONE *FLAVI*

I funghi appartenenti ad *Aspergillus* sezione *Flavi* sono ampiamente diffusi in natura. Vengono isolati regolarmente dal suolo, dal foraggio e dalla vegetazione in decomposizione, dai semi, dalla granella in stoccaggio e da diversi tipi di prodotti alimentari. Questi funghi contribuiscono al processo di decomposizione e alcuni di questi sono patogeni per gli insetti e, per esempio, *A. flavus* e *A. parasiticus* per gli animali superiori incluso l'uomo (Raper e Fennell, 1965).

Le contaminazioni da aflatossine sono un fenomeno globale. Generalmente le colture nelle aree tropicali e subtropicali sono più suscettibili alla

contaminazione rispetto a quelle presenti nelle regioni temperate (Widstrom et al., 1996; Fandialan e Ilag, 2003; Hell et al., 2003). Siccome il clima gioca un ruolo cruciale per lo sviluppo di questi funghi e la conseguente produzione di aflatossine, il problema varia molto in termini di incidenza e gravità di anno in anno, e i cambiamenti climatici in atto anche nel nostro Paese favoriscono la presenza e l'attività di questi patogeni.

IL SISTEMA *ASPERGILLUS FLAVUS* - MAIS - AMBIENTE

Il patosistema mais - *A. flavus* - ambiente è molto complesso. Il periodo della fioritura e le fasi immediatamente successive sono gli stadi di crescita dell'ospite cruciali per l'infezione da funghi e per i danni da insetti che incrementano la disseminazione degli *Aspergilli*, la presenza di infezioni e la produzione di aflatossine.

Il ciclo vitale di *A. flavus* può essere diviso in due parti principali: la colonizzazione dei residui colturali nel terreno e l'infezione dei tessuti della coltura. All'inizio della stagione colturale, quando le condizioni ambientali iniziano a essere favorevoli, gli sclerozi, le strutture di svernamento, germinano producendo un micelio che differenzia numerosi conidiofori che rilasciano conidi nell'aria. Il teleomorfo (stadio sessuale) di *A. flavus* non è mai stato osservato in natura; pertanto, i conidi costituiscono l'inoculo primario (Giorni et al., 2008a). Dal suolo, i conidi vengono trasportati dall'aria e depositati sulle sete e sulle cariossidi (Payne, 1998); nei giorni di pioggia la dispersione delle spore non avviene (Battilani et al., 2013). Le colture infettate contribuiscono all'aumento dell'inoculo presente nel terreno durante gli anni aridi (Horn, 2003).

In uno studio sull'effetto della temperatura e del potenziale idrico sullo sviluppo di *A. flavus* è stato provato come la crescita di questi funghi sia massima in condizioni ottimali, 30°C e potenziale idrico di -1.4 e -2.8 MPa (che corrispondono, rispettivamente, a 0.98 e 0.99 a_w), ma possibile fino a situazioni di stress idrico di -18 MPa (0.88 a_w) (Giorni et al., 2008a). Anche la sporulazione di *A. flavus* viene molto influenzata da questi parametri di temperatura e potenziale idrico; i risultati suggeriscono che questi funghi possono colonizzare il terreno e i residui colturali molto rapidamente in condizioni di alto stress idrico e alte temperature (Giorni et al., 2008a; Giorni et al., 2012).

Il tempo necessario alla germinazione delle spore varia in base a quanto le condizioni ecologiche sono idonee alle necessità del fungo. In particolare, in base al ceppo di *A. flavus*, il numero di giorni necessari per avere la germina-

zione delle spore va da 8 a 16 a $0.78 a_w$ e temperature di 33°C , aumentando fino a 95 giorni quando la temperatura aumenta o decresce di 7°C . In condizioni ottimali, la germinazione delle spore si ha dopo 1 giorno (Ayerst, 1969).

I fattori che influenzano l'infezione, indipendentemente dalle condizioni ambientali, sono la concentrazione delle spore presenti in campo e la suscettibilità delle piante (che dipende dalla specie, dalla varietà e dallo stato di stress), dal sistema colturale e dalla popolazione di insetti presente (Northolt, 1979).

Diversi studi hanno determinato che la colonizzazione delle setole e della superficie delle cariossidi avviene subito dopo l'emissione delle setole e può continuare ad aumentare durante la stagione colturale. Sebbene molta crescita del micelio appare sulla superficie delle setole e delle cariossidi, *A. flavus* può penetrare all'interno delle cariossidi direttamente dalle setole o attraverso le rotture o la base del pedicello (Payne, 1998); normalmente anche quando la colonizzazione da *A. flavus* della superficie delle cariossidi è estesa, l'infezione interna è bassa (Marsh e Payne, 1984), e in qualche caso inferiore all'1% (Windham e Williams, 2007).

Anche lo stress della pianta di mais può facilitare l'infezione da questi funghi, la produzione di micotossine e la contaminazione delle cariossidi. Siccità, caldo eccessivo, inadeguata fertilizzazione, presenza di insetti, presenza di erbe infestanti, eccessivo numero di piante e presenza di altre malattie possono comportare stress alla pianta e facilitare l'infezione delle cariossidi (Bruns, 2003).

Nel mais, infezioni significative e produzione di aflatossine non si manifestano fino a che l'umidità delle cariossidi è superiore al 32%; quando l'umidità scende sotto il 28% l'incremento di produzione delle tossine è molto rapido (Payne, 1998). Le aflatossine possono continuare a essere prodotte finché l'umidità della granella non raggiunge il 13% (Anonimo, 2003). A questo riguardo è molto importante la dinamica dell' a_w nella granella durante la fase di maturazione (Battilani et al., 2011). Se il danno da insetti ha luogo dopo che la coltura ha raggiunto un livello di umidità non favorevole alla crescita fungina, ci si aspetta che il livello di aflatossine rimarrà basso finché la pioggia successiva non andrà a incrementare nuovamente l'umidità della granella (Dowd et al., 2005).

Anche il momento in cui la raccolta ha luogo influenza il livello di aflatossine nella granella; con raccolte ritardate si rileva un aumento nel livello di aflatossine. L'effetto delle raccolte ritardate è più grave quando le colture vengono bagnate dalla pioggia appena prima o durante la raccolta (Cotty e Jaime-Garcia, 2007). Comunque, anche in annate in cui non intervengono piogge durante la fase finale di matu-

razione, un ritardo della raccolta di 2 settimane può comportare, a fronte di un calo di umidità di 6-7 punti percentuali (da 26-27% a 19-20%) almeno un raddoppio del contenuto di aflatossine nelle cariossidi (Scudellari et al., dati non pubblicati).

In campo, un importante fattore da considerare è che i funghi sembrano continuare a sintetizzare e degradare aflatossine. Conseguentemente, i cambiamenti ambientali giornalieri possono modificare l'entità delle due vie metaboliche e quindi influenzare il livello finale di tossina (Schroeder e Hein, 1968; Stutz e Kruperman, 1976).

Un interessante studio condotto da Criseo e collaboratori (1990) ha evidenziato che, sebbene si ritenga che la temperatura ottimale per la produzione di aflatossine sia intorno ai 28°C, o intorno ai 25°C come riportato da Giorni et al. (2011), le escursioni termiche sembrano esercitare un ruolo più significativo delle temperature massime raggiunte. Infatti, ceppi di *A. flavus* inoculati su substrato artificiale e incubati per 18 giorni alternativamente a 15°C (8 ore/giorno) e 20°C (16 ore/giorno) oppure a 23°C (8 ore/giorno) e 30°C (16 ore/giorno) hanno prodotto al termine del periodo di incubazione quantitativi molto simili di aflatossina B₁, di gran lunga superiore rispetto al quantitativo prodotto quando incubati a 28°C per l'intero periodo.

Diversi altri fattori possono influenzare la quantità di aflatossine prodotte in campo; per esempio la competizione con altri funghi o la presenza di cariossidi danneggiate può produrre stress e facilitare la crescita fungina e, conseguentemente, favorire la formazione di aflatossine (Diener et al., 1987; Lee e Magan, 2000; Giorni et al., 2009).

Un altro fattore studiato in quanto potenzialmente importante e in grado di influenzare la produzione di aflatossine in campo è l'uso di fungicidi; diversi studi mostrano che l'uso dei fungicidi a concentrazioni sub-letali può favorire la produzione di micotossine a causa dello stress causato al fungo (D'Mello e Macdonald, 1997).

Sono stati presi in considerazione anche agenti di biocontrollo, con risultati incoraggianti, ma le prove sono state svolte solo *in vitro* (Etcheverry et al., 2009; Formenti et al., 2012).

RUOLO DEI PARAMETRI METEOROLOGICI

Diversi fattori possono influenzare lo sviluppo di *A. flavus* su mais, prima di tutto le condizioni meteorologiche registrate nell'area di coltivazione; questo perché sia l'umidità sia la temperatura può influenzare significativamente l'attività fungina.

Lavori pubblicati riportano che alte temperature e bassa umidità nelle aree maidicole stimolano la crescita e la produzione di aflatossine da parte degli *Aspergilli* (Payne, 1998; Abbas et al., 2004; Scheidegger e Payne, 2005). In condizioni di stress idrico e alte temperature, *Aspergillus* sezione *Flavi* è in grado di prendere il sopravvento nella competizione con altri funghi e inoltre, queste condizioni, favoriscono la produzione di aflatossine da parte di questi funghi (Payne, 1998).

Le condizioni minime di temperature e a_w per la crescita di *A. flavus* sono più alte rispetto a quelle necessarie per la germinazione delle spore. In particolare, 0.83 è il valore minimo di a_w necessario per avere crescita in un intervallo di temperature fra 25° e 37°C (Pitt e Miscamble, 1995).

Gli anni in cui le contaminazioni da aflatossine sono state un serio problema erano caratterizzati da temperature sopra la media e piogge sotto la media per la zona considerata (Payne, 1998; Payne e Brown, 1998; Scheidegger e Payne, 2005; Piva et al., 2006). Studi in campo negli USA hanno mostrato che in un anno con temperature di 2-3°C superiori al normale, sono stati trovati alti livelli di aflatossine. Negli studi in campo è difficile separare gli effetti delle alte temperature da quelli della siccità in quando questi si presentano contemporaneamente.

IL RUOLO DELLE TECNICHE COLTURALI

Gli *Aspergilli* coinvolti nella produzione di aflatossine sono fortemente influenzati dalle condizioni meteorologiche delle zone di coltivazione del mais ed è spesso sottolineato come le condizioni di stress producano un aumento della sintesi di questi metaboliti. Con questo non si fa solo riferimento al fungo, ma anche alle condizioni della pianta ospite; in particolare, ogni condizione di stress della pianta ospite, quale lo stress idrico o nutrizionale, è di stimolo all'attività del fungo. Ne consegue che tutte le tecniche colturali adottate, dalla lavorazione del terreno alla scelta dell'ibrido e del momento della semina, dalla concimazione e irrigazione alla decisione di raccogliere il prodotto, a seconda di come vengono gestite possono risultare significative nel determinare il livello di contaminazione della granella.

LA PREVENZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINE

L'ottimizzazione delle tecniche colturali e della gestione della raccolta e del post-raccolta rappresentano certamente la base per ottenere granella con la

minima contaminazione da aflatossine. Questo comporta in genere un aumento dei costi di produzione; ad esempio, la raccolta precoce, con umidità della granella non troppo bassa, comporta un maggior costo per l'essiccazione. Pertanto, soprattutto in un'area geografica come il nord Italia, dove le contaminazioni si presentano con intensità assai variabile tra gli anni e le zone geografiche, risulta particolarmente importante individuare altri mezzi a supporto della razionalizzazione della gestione di filiera. In particolare, sono stati fatti notevoli sforzi per lo sviluppo di un modello previsionale affidabile, in grado di prevedere le condizioni di rischio sia delle aree geografiche, sulla base di dati storici, sia dei singoli appezzamenti durante la stagione colturale, utilizzando come input i dati raccolti in tempo reale, sia in scenari di cambiamenti climatici, utilizzando dati meteorologici simulati in proiezioni future.

I MODELLI PREVISIONALI

I modelli previsionali sono degli strumenti matematici che hanno diversi obiettivi. In biologia uno scopo può essere di descrivere e prevedere il verificarsi di un determinato fenomeno come per esempio la previsione del rischio di comparsa o di sviluppo epidemico di una determinata malattia infettiva, per potere così adattare la strategia di intervento e razionalizzare la difesa di alcune colture.

Nello specifico, per il pato-sistema *A. flavus*-mais grande attenzione è stata posta dalla comunità scientifica internazionale alla previsione di produzione di aflatossina B₁ (AFB₁).

Sviluppare sistemi di previsione per questo fenomeno è molto complesso a causa di tutti i fattori agronomici coinvolti: dalla tecnica di coltivazione all'ibrido coltivato, alle applicazioni di fungicidi, ecc., condizioni difficili da quantificare matematicamente; pertanto i modelli oggi disponibili sono costruiti considerando l'andamento meteorologico il fattore con maggiore influenza sulla crescita del fungo in campo.

Nel 2008 Battilani et al., ha sviluppato e validato un primo modello-prototipo per prevedere la contaminazione da AFB₁ basato sull'indice di aridità calcolato in tre decenni nei mesi tra giugno e agosto. L'output ottenuto dal modello prevede la probabilità di avere contaminazione da AFB₁ nella granella superiore a 2 µg/Kg. Questo sistema è stato utilizzato per diversi anni in Emilia Romagna con buoni risultati ma nel tempo è divenuta crescente l'esigenza di sviluppare un modello dinamico, capace di prevedere il rischio dalla semina alla raccolta del mais.

Attualmente è in corso di pubblicazione un modello meccanicistico (Battilani et al., 2013) che, diversamente dal precedente modello, prende in considerazione l'intero ciclo d'infezione del fungo e ne prevede ogni fase (sporulazione, dispersione, colonizzazione/invasione delle cariossidi e produzione di AFB₁), in relazione alle fasi di crescita del mais; per questo aspetto è stato sviluppato un sub-modello ad-hoc. L'uso combinato di questi modelli consente di prevedere il rischio di contaminazione da *A. flavus*, la produzione di AFB₁ e la probabilità di superare il limite di contaminazione fissato dalla Comunità Europea (EC, 2006) per alimenti destinati al consumo umano, o per quelli a uso alimentare per animali da latte, pari a 5 µg AFB₁ per kg di mais. Il modello è già stato validato su una base-dati di tre anni (2008-2011) di rilievi effettuati nel nord Italia con soddisfacenti risultati, fornendo previsioni corrette circa nel 70% dei casi. Il prossimo passo da compiere sarà quello di migliorare questo risultato, validando il modello in altri Paesi vocati alla coltivazione maidicola, e implementare funzioni che considerino il ruolo delle pratiche agronomiche che influenzano la contaminazione del mais in campo.

Il modello è già stato impiegato anche per simulare l'effetto che potrebbe avere il cambiamento climatico sulla contaminazione da aflatossine in Europa, tenendo conto anche del presumibile effetto che questo avrà sull'area di coltivazione del mais (Battilani et al., 2012).

CONTROLLO BIOLOGICO DI CEPPI PRODUTTORI DI AFLATOSSINE

Il controllo di funghi o batteri patogeni attraverso l'utilizzo di microrganismi non patogeni è frequentemente utilizzato in patologia vegetale (Lorito et al., 2010). Nonostante siano stati testati lieviti, batteri e diverse specie fungine per il controllo della contaminazione da aflatossine, il controllo biologico attraverso l'utilizzo di ceppi di *A. flavus* non produttori è la strategia più promettente (Amaike e Keller, 2011). Questa tecnica si basa sulla capacità dei ceppi non produttori o atossigeni, di escludere i ceppi produttori o tossigeni e di conseguenza ridurre la produzione e l'accumulo di aflatossine nelle colture (Cotty, 2006). I ceppi atossigeni vengono applicati, durante il ciclo vegetativo delle colture, mediante un carrier sul quale il fungo germina e produce conidi prima di disperdersi nell'ambiente. Caratteristica essenziale di un ottimo agente di biocontrollo è che sia selezionato nell'area in cui si intende utilizzarlo in quanto adattato alle condizioni climatiche e di microflora presenti e che non appartenga allo stesso gruppo di compatibilità vegetativa (VCG) dei ceppi tossigeni (Probst et al., 2011). La compatibilità vegetativa è un sistema

che permette il trasferimento di materiale genetico solo tra individui appartenenti alla stessa VCG (Leslie, 1993).

Negli Stati Uniti sono presenti in commercio due formulati a base di ceppi atossigeni di *A. flavus*: AF36 prodotto dall'Arizona Cotton Research e Afla-Guard distribuito da Syngenta, mentre in Africa è stata registrata con il nome di AflaSafe dall'International Institute of Tropical Agriculture (IITA) una miscela di 4 ceppi atossigeni di *A. flavus*. In Italia, a partire dal 2003, primo anno in cui sono stati segnalati seri problemi di contaminazione da aflatossine in mais (Piva et al., 2006), è iniziata la raccolta di isolati da granella di mais al fine di caratterizzare la popolazione presente sul territorio (Giorni et al., 2007). Successivamente, la popolazione fungina è stata caratterizzata per capacità di produrre aflatossine e per distribuzione delle VCG (Mauro et al., 2013); attualmente è in corso uno studio per identificare potenziali agenti di biocontrollo nell'ambito della popolazione di *A. flavus* italiana.

L'efficacia di questa tecnica è stata ampiamente dimostrata su diverse colture con percentuale di riduzione del contenuto di aflatossine anche superiori al 90% (Cotty, 1990; Abbas et al., 2006; Dorner, 2010). La contaminazione da aflatossine su importanti colture quali mais, cotone, pistacchio, arachidi determina ogni anno ingenti perdite economiche in tutto il mondo (Yu et al., 2005) con gravi problemi anche per la salute umana (Probst et al., 2007). Nonostante numerose strategie quali miglioramento genetico, controllo degli insetti, buone pratiche agronomiche sono continuamente studiate e perfezionate per offrire una valida soluzione al problema, l'utilizzo di ceppi atossigeni di *A. flavus* sembra essere la migliore tecnica, che consente di ridurre la contaminazione a valori accettabili anche nelle condizioni maggiormente predisponenti per l'attività del patogeno.

CONCLUSIONI

Gli studi svolti riguardo alla presenza di *A. flavus*, in particolare quelli attuati in Italia dopo l'annata critica per il mais verificatasi nel 2003, hanno avuto come obiettivo principale quello di acquisire conoscenze per prevenire e prevedere le contaminazioni da aflatossine, tutto ciò in un'ottica di *agricoltura sostenibile*. Infatti, i 2 supporti proposti, da una parte l'impiego di un modello previsionale e dall'altra quello di agenti di biocontrollo selezionati dalla popolazione naturalmente presente nelle zone di coltivazione, hanno l'obiettivo di tutelare la salute del consumatore, salvaguardare il reddito degli agricoltori ed enfatizzare la gestione di filiera nel rispetto dell'ambiente. I gravi proble-

mi riscontrati nella campagna 2012, segnalati dalle previsioni del modello, devono costituire un insegnamento per tutti gli operatori della filiera che devono agire in modo sinergico, tenendo presente gli insegnamenti ottenuti dalla ricerca.

RIASSUNTO

Aspergillus flavus è il principale responsabile della produzione di aflatoxina in diversi prodotti agricoli, quali il mais. La contaminazione può avvenire già in campo e aumentare durante lo stoccaggio e i processi di trasformazione se vengono mantenute condizioni idonee per il fungo. Condizioni di alta temperatura e bassa attività dell'acqua, associate a siccità nelle colture sono ottimali per *A. flavus* che diventa molto competitivo e dominante. Inoltre, ogni stress subito della pianta stimola l'attività del fungo. Nel mais, infezioni significative e produzione di aflatoxine non si manifestano con umidità delle cariossidi superiori al 32%; quando l'umidità è compresa tra il 28% e il 13%, la produzione di tossine è molto rapida. L'ottimizzazione delle tecniche colturali e della gestione della raccolta e del post-raccolta sono fondamentali per ottenere granella con la minima contaminazione da aflatoxina. L'impiego di modelli previsionali e di ceppi atossigeni, adeguatamente selezionati e caratterizzati, come agenti di biocontrollo, rappresentano i 2 supporti più innovativi per gli agricoltori.

ABSTRACT

Aspergillus flavus is the main responsible for the production of aflatoxin in various agricultural crops, maize included. The contamination can occur in the field and increase during storage and processing if suitable conditions for the fungus are maintained. High temperature and low water activity, associated with drought in crops are optimal for *A. flavus*, which becomes very competitive and dominant. In addition, each plant stress stimulates the activity of the fungus. In maize, significant infection and aflatoxin production do not occur with kernel humidity higher than 32%; when the humidity is between 28% to 13%, the toxin production is very fast. The optimization of cropping system, harvest and post-harvest management are crucial to minimize aflatoxin contamination. The use of predictive models and atoxigenic strains, carefully selected and characterized, as biocontrol agents are the two most innovative supports for farmers.

BIBLIOGRAFIA

- ABBAS H.K., ZABLOTOWICZ R.M., LOCKE M.A. (2004): *Spatial variability of Aspergillus flavus soil populations under different crops and corn grain colonization and aflatoxins*, «Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique», 82, pp. 1768-1775.
- ABBAS H.K., ZABLOTOWICZ R.M., BRUNS H.A., ABEL C.A. (2006): *Biocontrol of aflatox-*

- in in corn by inoculation with non-aflatoxigenic Aspergillus flavus isolates*, «Biocontrol Science Technology», 16, pp. 437-449.
- AMAIKE S., KELLER N.P. (2011): *Aspergillus flavus*, «Annual Reviewer of Phytopathology», 49, pp. 107-133.
- ANONIMO (2003): *Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems*, Council of Agricultural Science and Technology (CAST) (Ed.), Ames, Iowa, USA, pp. 199.
- AYERST G. (1969): *The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi*, «Journal of Stored Products Research», 5, pp. 127-141.
- BATTILANI P., SCAPIM C.A., FORMENTI S., ROSSI V., PIETRI A., MAROCCO, A., RAMPONI C. (2007): *L'acqua nelle cariossidi facilita l'accumulo di fumonisine*, «Informatore Agrario», 63, pp. 49-52.
- BATTILANI P., PIETRI A., BARBANO C., SCANDOLARA A., BERTUZZI T., MAROCCO A. (2008): *Logistic regression modeling of cropping systems to predict fumonisin contamination in maize*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 56, pp. 10433-10438.
- BATTILANI P., FORMENTI S., ROSSI V., RAMPONI C. (2011): *Dynamic of water activity in maize hybrids is crucial for fumonisin contamination in kernels*, «Journal of Cereal Science», 54, pp. 467-472.
- BATTILANI P., ROSSI V., GIORNI P., PIETRI A., GUALLA A., VAN DER FELS-KLERX H.J., BOOIJ C.J.H., MORETTI A., LOGRIECO A., 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*, Scientific/Technical Report submitted to EFSA, published on line 23 January, pp. 172, <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/223e.htm>
- BATTILANI P., CAMARDO LEGGIERI M., ROSSI V., GIORNI P. (2013): *AFLA-maize, a predictive model for Aspergillus flavus infection and aflatoxin B₁ contamination in maize*, «Computers and Electronics in Agriculture», in stampa
- BRUNS H.A. (2003): *Controlling aflatoxin and fumonisin in maize by crop management*, «Journal of Toxicology, Toxin Reviews», 22, pp. 153-173.
- COTTY P.J. (1989): *Virulence and cultural characteristics of two Aspergillus flavus strains pathogenic on cotton*, «Phytopathology», 79, pp. 808-814.
- COTTY P.J. (1990): *Effect of atoxigenic strains of Aspergillus flavus on aflatoxin contamination of developing cottonseed*, «Plant Disease», 74, pp. 233-235.
- COTTY P.J. (2006): *Biocompetitive exclusion of toxigenic fungi*, in D. Barug, D. Bhatnagar, H.P. van Egmond, J.W. van der Kamp, W.A. van Osenbruggen, A. Visconti (Eds.), *The mycotoxin factbook*, Wageningen Academic Publisher, The Netherlands, pp. 179-197.
- COTTY P.J., JAIME-GARCIA R. (2007): *Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination*, «International Journal of Food Microbiology», 119, pp. 109-115.
- CRISEO G., URZI C., PERNICE I., MEDICI M.A. (1990): *Growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus Link under cycling temperatures*, «Italian Journal of Food Science», 1, pp. 43-51.
- DIENER U.L., COLE R.J., SANDERS T.H., PAYNE G.A., LEE L.S., KLICH M.A. (1987): *Epidemiology of aflatoxin formation by Aspergillus flavus*, «Annual Review of Phytopathology», 25, pp. 249-270.
- D'MELLO J.P.F., MACDONALD A.M.C. (1997): *Mycotoxins*, «Animal Feed Science and Technology», 69, pp. 155-166.
- DORNER J.W. (2010): *Efficacy of a biopesticide for control of aflatoxins in corn*, «Journal of Food Protection», 73, pp. 495-499.

- DOWD P.F., JOHNSON E.T., WILLIAMS W.P. (2005): *Strategies for insect management targeted toward mycotoxin management*, in H.K. Abbas (Ed.), *Aflatoxin and food safety*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London and New York, pp. 517-541.
- EUROPEAN COMMISSION (EC), (2006): *Commission regulation No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*, in Official Journal of European Union (Ed.), pp. 5-24.
- ETCHEVERRY M.G., SCANDOLARA A., NESCI A., RIBEIRO VILAS BOAS M.S., PEREIRA P., BATTILANI P. (2009): *Biological interactions to select biocontrol agents against toxigenic strains of Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides from maize*, «Mycopathologia», 167, pp. 287-295.
- FANDIALAN I.M., ILAG L.L. (2003): *Aflatoxin production of Aspergillus flavus isolates from rough rice, corn, soybean, peanut and copra*, «Philippine Agriculturist», 57, pp. 254-263.
- FORMENTI S., MAGAN N., PIETRI A., BATTILANI P. (2012): *In vitro impact on growth, fumonisins and aflatoxins production by Fusarium verticillioides and Aspergillus flavus using anti-fungal compounds and a biological control agent*, «Phytopatologia Mediterranea», 51, pp. 247-256.
- GIORNI P., MAGAN N., PIETRI A., BERTUZZI T., BATTILANI P. (2007): *Studies on Aspergillus section Flavi isolated from maize in northern Italy*, «International Journal of Food Microbiology», 113, pp. 330-338.
- GIORNI P., BATTILANI P., MAGAN N. (2008a): *Effect of solute and matric potential on in vitro growth and sporulation of strains from a new population of Aspergillus flavus isolated in Italy*, «Fungal Ecology», 1, pp. 102-106.
- GIORNI P., BATTILANI P., PIETRI A., MAGAN N. (2008b): *Effect of a_w and CO_2 level on Aspergillus flavus growth and aflatoxin production in maize post-harvest*, «International Journal of Food Microbiology», 122, pp. 109-113.
- GIORNI P., MAGAN N., BATTILANI P. (2009): *Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides strains from maize*, «International Journal of Food Microbiology», 130, pp. 213-218.
- GIORNI P., MAGAN N., PIETRI A., BATTILANI P. (2011): *Growth and aflatoxin production of an Italian strain of Aspergillus flavus: influence of ecological factors and nutritional substrates*, «World Mycotoxin Journal», 4, pp. 425-432.
- GIORNI P., CAMARDO LEGGIERI M., MAGAN N., BATTILANI P. (2012): *Comparison of ecological needs for sporulation of Aspergillus flavus sclerotia on natural and artificial substrates*, «Fungal Biology», 116, pp. 637-642.
- GUYNOT M.E., MARÍN S., SANCHIS V., RAMOS A.J. (2003): *Modified atmosphere packaging for prevention of mold spoilage of bakery products with different pH and water activity levels*, «Journal of Food Protection», 66, pp. 1864-1872.
- HELL K., FANDOCHAN P., CARDWELL K.F. (2003): *Development of management options for the control of aflatoxin in maize in West Africa*. Advances in stored product protection: Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection, York, UK, 22-26 July 2002.
- HORN B.W. (2003): *Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil*, «Journal of Toxicology, Toxin Reviews», 22, pp. 351-379.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (2002): *Some mycotoxins in World Health Organization (Eds.), IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans/Some Traditional Herbal Medicines, some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*, vol. 82, IARC/Press, Lyon, pp. 169-366.
- LEE H.B., MAGAN N. (2000): *Impact of environment and interspecific interactions between*

- spoilage fungi and Aspergillus ochraceus on growth and ochratoxin production in maize grain*, «International Journal of Food Microbiology», 61, pp. 11-16.
- LESLIE J.F. (1993): *Fungal vegetative compatibility*, «Annual Review of Phytopathology», 31, pp. 127-150.
- LORITO M., WOO S.L., HARMAN G.E., MONTE E. (2010): *Translational research on Trichoderma: from 'omics to the field*, «Annual Review of Phytopathology», 48, pp. 395-417.
- MAGAN N., ALDRED D., SANCHIS V., ARORA D.K. (2004): *The role of spoilage fungi in seed deterioration*, in D.K. Arora (Ed.), *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 311-323.
- MARSH S.F., PAYNE G.A. (1984): *Scanning EM studies on the colonization of dent corn by Aspergillus flavus*, «Phytopathology», 74, pp. 557-561.
- MAURO A., BATTILANI P., CALLICOTT K.A., GIORNI P., PIETRI A., COTTY P.J. (2013): *Structure of an Aspergillus flavus population from maize kernels in northern Italy*, «International Journal of Food Microbiology», 162, pp. 1-7.
- NORTHOLT M.D. (1979): *The effect of water activity and temperature on the production of some mycotoxins*, Wageningen University, the Netherlands, Wageningen, pp. 491.
- PAYNE G.A. (1998): *Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops*, in K.K. Sinha and D. Bhatnagar (Eds.), *Mycotoxins in agriculture and food safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 279-306.
- PAYNE G.A., BROWN, M.P. (1998): *Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis*, «Annual Review of Phytopathology», 36, pp. 329-362.
- PITT J.I., HOCKING A.D. (2009): *Fungi and food spoilage 3rd Ed.*, Springer-Verlag, Inc., New York, pp. 536.
- PITT J.I., MISCAMBLE B.F. (1995): *Water relations of Aspergillus flavus and closely related species*, «Journal of Food Protection», 58, pp. 86-90.
- PIVA G., BATTILANI P., PIETRI A. (2006): *Emerging issues in Southern Europe: aflatoxins in Italy*, in D. Barug, D. Bhatnagar, H.P. van Egmond, J.W. van der Kamp, W.A. van Osenbruggen, A. Visconti (Eds.), *The mycotoxin factbook.*, Wageningen Academic Publisher, The Netherlands, pp. 139-153.
- PROBST C., BANDYOPADHYAY R., PRICE L.E., COTTY P.J. (2011): *Identification of atoxigenic Aspergillus flavus isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya*, «Plant Disease», 95, pp. 212-218.
- PROBST C., NJAPAU H., COTTY P.J. (2007): *Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent*, «Applied and Environmental Microbiology», 73, pp. 2762-2764.
- RAPER K.B., FENNEL D.I. (1965): *The Genus Aspergillus*, Williams & Wilkins, pp. 686.
- SANCHIS V., MAGAN N. (2004): *Environmental conditions affecting mycotoxins*, in N. Magan, and M. Olsen (Eds.), *Mycotoxins in food: Detection and Control*, Woodhead, Oxford, pp. 174-189.
- SCHIEDEGGER K.A., PAYNE G.A. (2005): *Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of Aspergillus flavus from pathogenicity to functional genomics*, in H.K. Abbas (Ed.), *Aflatoxin and food safety*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London and New York, pp. 137-165.
- SCHROEDER H., HEIN J.H. (1968): *Effect of diurnal temperature cycling on the production of aflatoxin*, «Applied Microbiology», 16, pp. 988-990.
- SHEPARD G.S. (2008): *Risk assessment of aflatoxins in food in Africa*, «Food Additives and Contaminants, Part A», 25, pp. 1246-1256.

- STUTZ H., KRUMPERMAN P. (1976): *Effect of temperature cycling on the production of aflatoxin by Aspergillus parasiticus*, «Applied and Environmental Microbiology», 32, pp. 327-332.
- WINDHAM G.L., WILLIAMS W.P. (2007): *Systemic infection of stalks and ears of corn hybrids by Aspergillus parasiticus*, «Mycopathologia», 164, pp. 249-254.
- WIDSTROM N.W., FORSTER M.J., MARTIN W.K., WILSON D.M. (1996): *Agronomic performance in the southeastern United States of maize hybrids containing tropical germplasm*, «Maydica», 41, pp. 59-63.
- YU J., CLEVELAND T.E., NIERMAN, W.C., BENNETT J.W. (2005): *Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases*, «Revista Iberoamericana de Micología», 22, pp. 192-202.

