

UN NUOVO PRODOTTO A BASE DI *ASPERGILLUS FLAVUS* ATOSSIGENO PER IL BIOCONTROLLO DELLE AFLATOSSINE NEL MAIS

P. BATTILANI¹, M. PIOMBINO², G. CACCIALANZA², A. ALIX³, V. BOSCO²,
E. MASCANZONI²

¹ Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali Sostenibili- Università Cattolica del Sacro Cuore – Via Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza

² Corteva Agriscienze Italia - Via dei Comizi Agrari 10 26100 Cremona

³ Corteva Agriscienze - 3B Park Square Milton Park Abingdon Oxfordshire OX14 4RN, UK
elisa.mascanzoni@corveva.com

RIASSUNTO

AF-X1 è un nuovo agrofarmaco, sviluppato dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza in cooperazione con Corteva Agriscienze per il biocontrollo di *Aspergillus flavus* ed il conseguente contenimento della produzione di aflatoSSine nel mais. Il principio attivo in esso contenuto è un ceppo di *Aspergillus flavus* (MUCL54911) naturalmente presente nell'ambiente, isolato e selezionato per la sua incapacità di produrre aflatoSSine (AFs) e acido ciclopiazonico (CPA) e per la sua efficienza competitiva nei confronti di altri ceppi di *A. flavus* potenzialmente tossigeni. Distribuito sulla coltura, questo ceppo atossigeno esclude per competizione altri ceppi, compresi quelli tossigeni, andando quindi a prevenire la contaminazione da AFs nella granella di mais. In questo lavoro sono riassunte le attività sperimentali condotte in Italia fra il 2013 e il 2019: le prove sono state effettuate nelle principali aree maidicole italiane di Veneto, Emilia Romagna e Friuli Venezia Giulia. I risultati ottenuti dimostrano l'efficacia di *A. flavus* ceppo MUCL54911 come agente di biocontrollo, riducendone significativamente la contaminazione da aflatoSSine in mais e dimostrando quindi di essere un valido strumento per la produzione sostenibile di granella sana.

Parole chiave: tossine, AF-X1, protezione, contaminazione, sostenibilità

SUMMARY

A NEW PRODUCT BASED ON *ASPERGILLUS FLAVUS* FOR THE BIOCONTROL OF AFLATOXINS IN CORN IN ITALY

AF-X1 is a new plant protection product, developed by Università Cattolica del Sacro Cuore in Piacenza in collaboration with Corteva Agriscienze for the biocontrol of aflatoxin (AF) contamination in maize. The product is based on an atoxigenic *Aspergillus flavus* (MUCL54911) strain naturally occurring in Italian soils and extremely competitive with other *A. flavus* strains that produce AFs and cyclopiazonic acid. In the treated crop, the applied *A. flavus* strain displaces the spores of other strains of this fungus, including the toxigenic ones, which results into a reduction of AF contamination in maize grains. This paper presents the results of efficacy trials conducted in Italy from 2013 to 2019 in Veneto, Emilia Romagna and Friuli Venezia Giulia regions. The results confirm the efficacy of *A. flavus* strain MUCL54911 to control the level of AFs in harvested grains, to levels below the trigger values proposed in the regulation, hence demonstrating the availability of a new tool to produce healthy grains.

Keywords: toxins, AF-X1, protection, contamination, sustainability

INTRODUZIONE

Le aflatossine sono un gruppo di metaboliti secondari altamente tossici, prodotti principalmente da alcune specie saprofiti di *Aspergillus*, che spesso contaminano la granella di mais ed altre colture destinate al consumo umano ed animale (Mauro et al., 2014 e 2018): *A. flavus* è il primo agente eziologico e di conseguenza la specie più importante per il mais in tutto il mondo.

Il composto più tossico, aflatossina B1 (AFB1), è stato confermato essere altamente cancerogeno per l'uomo dall'Agenzia Internazionale di Ricerca sul Cancro (International Agency for Research on Cancer, IARC, 2002) che lo ha inserito nel gruppo 1.

Vi sono altri problemi per la salute umana che possono derivare dall'esposizione alle aflatossine: ritardi nella crescita ed immunosoppressione nel caso di esposizione cronica a basse dosi, necrosi del fegato e morte nel caso di ingestione di alte dosi (≥ 1 ppm) (Cardwell e Henry, 2006): casi di malattie da aflatossine sono stati documentati a partire dagli anni '70 nei paesi in via di sviluppo di Asia ed Africa, come Kenia, India, Tanzania e Malaesia (Ojambo et al., 2018). Per questo motivo la concentrazione di aflatossine nelle derrate destinate al consumo umano ed animale è strettamente normata sia a livello nazionale che internazionale (Payne e Yu 2010; Wu e Khlangwiset 2010): in Europa il limite è posto a 4 ppb.

Anche in Italia (Giorni et al., 2007) sono state riscontrate problematiche di contaminazione da aflatossine nelle derrate alimentari: ad esempio nel 2012 su mais, mentre nel 2003 sono state trovate alcune partite di latte contaminato a causa dell'utilizzo di mais autoprodotta e contenente aflatossine per l'alimentazione degli animali (Mauro et al., 2014; Ojiambo et al., 2018).

Il controllo della presenza di aflatossine nel mais è, quindi, uno dei principali problemi che è necessario affrontare per la produzione di granella di mais sana, da destinare alle filiere produttive.

Vi sono molti fattori ambientali ed agronomici che possono favorire lo sviluppo di *A. flavus* e di conseguenza la contaminazione da aflatossine delle derrate: la suscettibilità dell'ospite, la prevalenza di ceppi tossigeni del fungo nell'ambiente, il sistema di coltivazione e di conservazione post raccolta, le condizioni meteorologiche, in quanto questo fungo e la produzione di aflatossine sono favoriti in annate calde e con scarse piogge, danni da insetti – per esempio *Ostrinia nubilalis* – che possono favorire la penetrazione di *A. flavus* nella pianta ospite. (Mehl et al., 2012).

Per quanto riguarda i mezzi per il contenimento delle aflatossine, vi sono strategie che possono essere utilizzate in post raccolta o prima della raccolta: particolarmente interessante ed efficace è il biocontrollo delle aflatossine tramite l'utilizzo di ceppi non tossigeni di *A. flavus* che funzionano per esclusione competitiva: se dispersi nell'ambiente o sulla coltura vanno a sostituire le spore del fungo tossigeno, abbassando il livello di contaminazione da aflatossine: strategie di questo tipo sono state usate con successo in Africa e negli Stati Uniti con la registrazione e l'uso di prodotti a base di ceppi non tossigeni di *A. flavus*, quali Afla-Guard® (Syngenta), su mais, mandorlo, pistacchio, arachide e cotone (Ojambo et al., 2018).

In Italia è in corso di registrazione AF-X1: un agrofarmaco di natura microbiologica sviluppato dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza (Mauro et al., 2014 e 2018) in collaborazione con Corteva Agriscience specificatamente per il controllo della produzione di aflatossine in mais da uso mangimistico.

Caratteristiche tecniche di AF-X1

AF-X1 è a base di *Aspergillus flavus* (Famiglia Trichocomaceae, Ordine Eurotiales, Classe Ascomyceti) ceppo A2058.

Il ceppo A2085 di *A. flavus* è naturalmente presente nell'ambiente italiano, ma è stato selezionato e caratterizzato in Italia per la sua incapacità di produrre aflatossine (AFs) ed acido ciclopiazonico (CPA) a causa della mancanza dell'intero *cluster* genico a questo dedicato e per la migliore efficacia competitiva nei confronti degli altri ceppi di *A. flavus*.

Le attività sperimentali hanno dimostrato che questo ceppo è in grado di sostituire, sulle colture *target*, i ceppi potenzialmente tossigeni di *A. flavus* andando a ridurre in media del 92% la contaminazione da aflatossine in mais durante le prove sperimentali in pieno campo.

Da maggio 2013 questo ceppo è stato depositato presso la Belgium Collection of Micro-Organism (BCCM) con il codice di MUCL54911 e dal 2015 è disponibile come formulato denominato AF-X1. Il prodotto si presenta in formulazione granulare: consiste infatti di seme di sorgo sterilizzato a cui sono state fatte aderire conidiospore di *A. flavus* ceppo MUCL54911 ad una concentrazione di 1×10^5 CFU/g, corrispondenti a 0,0008 g del fungo in 100 g di prodotto. Al fine di prevenire fenomeni di "dust-off" il substrato è rivestito con un coformulante liquido.

Il seme di sorgo funziona come substrato di nutrimento e crescita per il fungo: dopo l'applicazione *A. flavus* ceppo MUCL54911 cresce sul seme (figura 1) e dopo la sporulazione si disperde sulla coltura *target* andando a competere ed a escludere i ceppi di *Aspergillus* potenzialmente tossigeni.

Figura 1. AF-X1 prima (a) e dopo (b) la sporulazione di *A. flavus* ceppo MUCL54911



AF-X1 funziona per competizione ed ha quindi un meccanismo d'azione innovativo che lo rende adatto all'utilizzo sia in agricoltura integrata che biologica: una volta applicato sulla coltura il ceppo atossigeno di *A. flavus* ha infatti la capacità di agire per esclusione competitiva andando a sostituirsi ai ceppi produttori di AFs riducendo così la problematica della contaminazione (Mauro et al., 2018).

Può essere utilizzato una volta per stagione su mais ad uso mangimistico quando questo è nella fase fenologica di levata: dalla fase fenologica di allungamento dello stelo fino a quando sono visibili 9 o più nodi.

È stato possibile verificare che l'effetto positivo di AF-X1 va oltre il momento dell'applicazione, dato che la sporulazione prosegue per un lungo periodo (Cotty, 2006; Mauro et al., 2018). In ogni

caso l'effetto cala nell'anno successivo all'applicazione per cui è necessario ripetere l'applicazione ogni anno per ottenere un'efficacia costante (Ojambo et al., 2018).

AF-X1 è attualmente in corso di registrazione in Italia, ma è stato commercializzato dal 2016 al 2019 in regime di uso in deroga (Art. 53) per mais ad uso mangimistico, vista la mancanza di soluzioni alternative chimiche o biologiche registrate in Europa per il contenimento di questo problema.

Caratteristiche tossicologiche

Il prodotto AF-X1 risulta essere un prodotto sicuro per l'uomo; la sua formulazione granulare così come la sua modalità applicativa, direttamente sul terreno, impediscono inalazioni di eventuali spore agli operatori, lavoratori e residenti di aree limitrofe ai terreni trattati.

Gli studi condotti non hanno rilevato problematiche particolari di tossicità acuta o cronica a livello dermale, oculare e - come sopraccitato - inalatorio. È stata dimostrata, inoltre, l'assenza di tossicità per la riproduzione, cancerogenicità e genotossicità.

Dati al riguardo verranno resi pubblici all'autorizzazione del *dossier*.

Caratteristiche eco-tossicologiche

Gli studi condotti hanno dimostrato che i rischi eco-tossicologici del prodotto e della sostanza attiva nell'ambiente hanno una rilevanza trascurabile. Non è intaccata la biomassa e la capacità riproduttiva di specie come i lombrichi e non è rilevata nessuna mortalità significativa per le specie saggiate. Il prodotto AF-X1 non è classificato a livello ambientale né come molto tossico, né tossico o nocivo.

Caratteristiche ambientali

Il fungo *A. flavus*, nel suolo, cresce rapidamente grazie ai nutrienti presenti nel substrato del prodotto; l'ambito acquatico non rappresenta un comparto ideale per la crescita di questo microrganismo così come l'aria che risulta, però, essere un ottimo mezzo di trasporto di spore.

MATERIALI E METODI

Prove di efficacia e selettività

Per la determinazione dell'efficacia di AF-X1 sono state considerate 17 prove effettuate su mais nel 2013 (10), 2015 (2), 2016 (2) e 2017 (3) in Italia - EPPO Southern Zone – nei principali areali maidicoli di Lombardia, Emilia Romagna e Friuli Venezia Giulia, dove la problematica di contaminazione della granella da AFs è maggiormente sentita.

Lo schema delle prove era a blocco randomizzato includendo anche un non trattato, con 3 repliche nelle prove del 2013 e 4 in quelle degli anni successivi; AF-X1 è stato applicato una volta alla dose di 25 kg/ha, con l'utilizzo di uno spandiconcime, quando il mais era allo stadio fenologico di levata. Non è stato possibile includere un prodotto di riferimento dal momento che non esiste un prodotto già registrato, chimico o biologico, per il controllo delle aflatoxine.

Le prove effettuate fra il 2015 ed il 2017 sono state condotte secondo GEP e seguendo le linee guida EPPO PP 1/181(4) “*Conduct and reporting of efficacy evaluation trials, including good experimental practice*”, PP 1/152(4) “*Design and analysis of efficacy evaluation trials*” e PP 1/135 “*Phytotoxicity assessment*”.

I rilievi per la determinazione dell'efficacia di AF-X1 sono stati effettuati a raccolta commerciale della granella di mais, analizzandone il contenuto di aflatoxine B1, B2, G1 e G2.

Monitoraggio aflatossine e parametri qualitativi della granella

Una seconda serie di prove dimostrative di monitoraggio è stata effettuata negli anni 2014, 2015 e 2016, al fine di analizzare i parametri qualitativi, il profilo nutrizionale ed il contenuto di micotossine di granella di mais trattata con AF-X1 in comparazione con granella non trattata.

Le analisi per i parametri nutrizionali quali contenuto di sostanza secca, ceneri, grassi, acido oleico e linoleico, proteine, fibra neutro-detersa (NDF) ed amido sono state fatte tramite *Near Infra Red technology* (NIR), mentre quelle per la contaminazione da tossine sono state fatte tramite cromatografia liquida-spettrometro di massa (LC-MS-MS).

RISULTATI

Prove di efficacia e selettività

I risultati ottenuti nelle 17 prove italiane condotte fra il 2013 ed il 2017 mostrano l'ottimo effetto di contenimento di AF-X1 applicato a 25 hg/ha sia sul contenuto di AFB₁ che sul totale delle aflatossine. La riduzione media, infatti, risulta del 86,4% per quanto concerne il contenuto di AFB₁ nella granella alla raccolta (tabella 1).

Tabella 1. Efficacia di AF-X1 nel ridurre la contaminazione da aflatossine B1 in mais. Il rilievo è stato condotto sul totale di aflatossine presenti a raccolta commerciale della granella (75-125 giorni dopo il trattamento)

Prova	Varietà	Intervallo dal trattamento (N. giorni)	Aflatoxine B1 nel non trattato (µg/kg)	Media % riduzione AF-X1 25 kg/ha
1	PR33M15	121	74,9	88,3
2	PR33M15	88	5,4	61,8
3	P1114	96	10,7	83,7
4	PR35T36	75	99	95,9
5	PR33M15	104	22,2	46,4
6	PR32B10	122	11,2	100
7	PR33A46	108	5,4	100
8	PR0837	90	1,6	81
9	PR36W66	125	3,5	63,3
10	PR33M15	123	0,6	100
11	P1785	99	28,2	95,8
12	P1758	78	18,2	87,9
13	P1517	124	7,6	100
14	P1535	100	13,5	99,7
15	P0937	83	35,6	76,2
16	P1028	90	61,1	74,7
17	P9911	84	105,2	88,4
media ± dev. std.			40,61 ± 35,4	86,4% ± 15,3

Riguardo alle aflatossine totali invece, la riduzione media è stata del 87,3%, anche se i dati risultano variabili e compresi fra un minimo del 41,7% ed un massimo pari al 100% rispetto al non trattato (tabella 2).

Tabella 2. Efficacia di AF-X1 nel ridurre la contaminazione da aflatossine in mais. Il rilievo è stato condotto a raccolta commerciale (75-125 giorni dopo il trattamento) sul totale di aflatossine presenti

Prova	Varietà	Intervallo dal trattamento (N. giorni)	Totale aflatossine nel non trattato ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Media% riduzione AF-X1 25 kg/hg
1	PR33M15	121	80,9	88,2
2	PR33M15	88	5,42	61,5
3	P1114	96	11,04	84,3
4	PR35T36	75	104,52	96,1
5	PR33M15	104	22,19	41,7
6	PR32B10	122	17,4	100
7	PR33A46	108	5,4	100
8	PR0837	90	2,72	89,1
9	PR36W6	125	3,92	67,6
10	PR33M15	123	1,4	100
11	P1785	99	30,8	95,9
12	P1758	78	19,28	88,7
13	P1517	124	8,08	96,4
14	P1535	100	14,4	99,7
15	P0937	83	43,84	80,1
16	P1028	90	65,92	75,8
17	P99111	84	111,34	88,5
media \pm dev. std.			41.16 \pm 37.25	87,3% \pm 15,8%

Monitoraggio aflatossine e parametri qualitativi della granella

I risultati delle prove del 2015 e 2016 sono illustrati in tabella 3. Quelli del 2014 non sono inclusi in quanto non significativi: l'estate di quell'anno è stata infatti particolarmente fresca e piovosa e questo ha portato ad un bassissimo livello generale di contaminazione da AFs anche nei non trattati.

I risultati delle prove 2015 e 2016 dimostrano che anche in questi anni il contenuto di AFs è più basso nel trattato che nel non trattato per cui viene riconfermata l'efficacia di AF-X1 per il contenimento di questa problematica.

I risultati dimostrano altresì che non vi sono differenze fra trattato e non trattato per quanto riguarda i parametri nutrizionali rilevati nè le altre micotossine a seguito di un trattamento con AF-X1. Il trattamento con *A. flavus*, quindi, non determina un peggioramento della qualità nutrizionale della granella, dal momento che non favorisce lo sviluppo di altre muffe produttrici di tossine.

Si può concludere che il trattamento con AF-X1 non ha effetti sulla qualità nutrizionale della granella, né su altri parametri diversi dalle aflatossine.

Tabella 3. Risultati delle prove di monitoraggio del 2015-2016; i parametri nutritivi sono espressi in percentuale sulla sostanza secca, mentre la contaminazione da aflatossine in ppb nella sostanza secca ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Per ogni anno sono presentati i dati come media del trattato (media tratt.) e media del non trattato (media n.t.), la deviazione standard è presentata fra parentesi (dev. st.).

Tabella 3. Risultati delle prove 2015 e 2016

Anno		2015		2016	
Parametro misurato		Media tratt. (dev. st.)	Media n. t. (dev. st.)	Media tratt. (dev. st.)	Media n. t. (dev. st.)
PROFILO NUTRIZIONALE (% sostanza secca)	N° campioni	37	36	20	20
	Ceneri	1,4 (0,05)	1,39 (0,04)	1,41 (0,05)	1,38 (0,05)
	Grassi	3,8 (0,21)	3,79 (0,25)	3,75 (0,11)	3,75 (0,14)
	Acido oleico	30,55 (1,73)	30,88 (1,68)	28,65 (2,59)	28,55 (2,64)
	Acido linoleico	47,38 (1,78)	47,04 (1,82)	48,63 (3,09)	49,04 (2,94)
	Proteine	8,42 (0,6)	8,25 (0,52)	8,35 (0,82)	8,3 (0,9)
	NDF	8,96 (0,95)	8,79 (0,81)	8,51 (0,4)	8,14 (0,43)
	Amido	70,65 (1,16)	70,76 (1,07)	71,86 (0,85)	72,33 (0,94)
MICOTOSSINE (µg/kg)	FUMOSININE TOT	1,56 (2,19)	2,31 (2,86)	3,01 (3,21)	3,19 (2,63)
	AFLATOSSINE B1	0,8 (2,22)	7,46 (13,66)	1,47 (3,58)	7,45 (9,89)
	AFLATOSSINE TOT	0,81 (2,21)	7,48 (13,65)	1,54 ()	7,87 ()
	DON	0,04 (0,16)	0,04 (0,21)	0,05 (0,11)	0,03 (0,04)
	ZEARALENONE	1,17 (3,18)	0,81 (1,59)	10,66 (18,77)	8,25 (16,22)
	TOSSINA T2	0 (0)	0 (0)	1,89 (5,95)	0 (0)
	TOSSINA H-T2	0 (0)	0 (0)	15,87 (31,75)	15,01 (20,73)
	OCRATOSSINA A	0 (0)	0 (0)	0,05 (0,15)	0,03 (0,14)
	OCRATOSSINA B	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	NIVALENOLO	2,97 (8,77)	2,34 (7,88)	8,99 (21,67)	5,47 (17,3)
	FUSX	0 (0)	0 (0)	4,76 (21,29)	16,45 (40,25)
	DAS	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	3ADON	9,41 (39,62)	7,63 (28,5)	10,22 (16,55)	5,94 (10,18)

Non sono inoltre stati rilevati fenomeni di fitotossicità su tutte le varietà testate (dati non mostrati).

In tutte le prove effettuate fra il 2015 ed il 2017 è stata rilevata la resa in granella alla raccolta: non è stato rilevato alcun effetto negativo sulla resa (tabella 4).

Tabella 4. Effetto di AF-X1 sulla resa in granella nelle prove di efficacia condotte fra il 2015 ed il 2017

Prova	Anno	Resa delle parcelle non trattate (kg/parcella)	Resa delle parcelle trattate rispetto al non trattato (%)
1	2015	2741,5	100,1
2	2015	1864,8	114,1
3	2016	4030	100,2
4	2016	2937,5	101,5
5	2017	1992,5	99
6	2017	2537,5	98,8
7	2017	2060	97,5
media ± dev. std.			101,6 ± 5,6

Considerato il meccanismo d'azione di AF-X1, che agisce solo in modo meccanico per esclusione competitiva, non ci si aspettano effetti negativi sulla granella o sui prodotti da essa derivati (farine, insilati) quando il prodotto è utilizzato secondo le indicazioni dell'etichetta e non è ipotizzabile alcun effetto negativo sulle colture adiacenti o in successione, nè che vi sia il rischio di insorgenza di resistenze.

CONCLUSIONI

AF-X1 è un nuovo prodotto a base di *Aspergillus flavus* ceppo M UCL54911 sviluppato dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza in collaborazione con Corteva Agriscienze per il controllo della contaminazione da aflatossine in mais. Il prodotto agisce per competizione spaziale in quanto, applicato sulla coltura, questo ceppo atossigeno di *A. flavus* va ad escludere per competizione gli altri ceppi potenzialmente tossigeni appartenenti alla medesima specie.

AF-X1 si presenta in formulazione granulare di semi di sorgo sterilizzati e rivestiti da spore di *A. flavus* ceppo MUCL54911 e contiene 1×10^5 CFU/g, corrispondenti a 0,0008 g del fungo in 100 g di prodotto. Può essere applicato una volta per stagione quando il mais è in fase di levata alla dose di 25 kg/ha.

Grazie agli ottimi risultati ottenuti sul contenimento di AFs in mais, all'assenza di effetti negativi sulla coltura, al suo profilo tossicologico ed eco-tossicologico positivo ed al meccanismo d'azione alternativo, adatto all'impiego in ogni forma di agricoltura, compresa quella biologica, che inoltre esclude la possibilità di evolvere popolazioni resistenti, AF-X1 si dimostra uno strumento innovativo ed efficace per la produzione di granella di mais sana.

LAVORI CITATI

- Cardwell K. F., Henry S. H., 2006. Risk of exposure to and mitigation of effects of aflatoxin on human health: a West African example. *Food science and technology-New York-Marcel Dekker-*, 151-213.
- Cotty P. J., 2006. Biocompetitive exclusion of toxigenic fungi. In: Barug D, Bhatnagar D, van Egmond HP, van der Kamp JW, van Osenbruggen WA, Visconti A (eds) *The mycotoxin factbook*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, pp 179-197.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P., 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 113 (3), 330-338.
- International Agency for Research on Cancer, IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2002, vol. 82 pp 301-366.
- Mauro A., Battilani P., Cotty P. J., 2014. Atoxigenic *Aspergillus flavus* endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize. *BioControl*, 60(1), 125-134.
- Mauro A., Garcia-Cela, E. Pietri, A. Cotty, P. Battilani, 2018. Biological control products for aflatoxin prevention in Italy: Commercial field evaluation of atoxigenic *Aspergillus flavus* active ingredients. *Toxins*, 10 (1), 30.
- 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.
- Payne G. A., Yu J., 2010. Ecology, development and gene regulation in *Aspergillus flavus*. *Aspergillus: molecular biology and genomics*, 157-171.
- Wu F., Khlangwiset P., 2010. Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin-reduction strategies in Africa: case studies in biocontrol and post-harvest interventions. *Food Additives and Contaminants*, 27 (4), 496-509.

