

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**

DIPARTIMENTO DI AGRARIA

CORSO DI DOTTORATO IN  
AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

XXVII° CICLO

TESI DI DOTTORATO

**BIO-FORMULATI A BASE DI MISCELE DI  
MICROORGANISMI**

Relatore:  
Ch. mo Prof.  
Matteo Lorito

Candidato:  
Alberto Pascale

Correlatore  
Dott. Francesco Vinale

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
1.1	<b>Microrganismi benefici e agenti di biocontrollo</b>	<b>7</b>
1.1.1	Batteri della rizosfera	7
1.1.2	Funghi benefici	8
1.1.3	Micorrize arbuscolari (AMF)	9
1.1.4	Il genere <i>Trichoderma</i>	11
1.2	<b>Scopo della tesi</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>24</b>
2.1	<b>Materiale fungino utilizzato negli esperimenti</b>	<b>24</b>
2.2	<b>Saggio <i>in serra</i> per la selezione dei ceppi <i>Trichoderma</i> per la formulazione delle miscele</b>	<b>25</b>
2.3	<b>Saggio <i>in campo</i> per la valutazione delle nuove miscele di Micosat e ceppi di <i>Trichoderma</i> selezionati</b>	<b>26</b>
2.4	<b>Valutazione dell'incidenza del patogeno <i>Alternaria solani</i> sui frutti di pomodoro prodotti nell'esperimento in campo.</b>	<b>27</b>
2.5	<b>Analisi qualitativa dei frutti prodotti</b>	<b>28</b>
2.5.1	Quantificazione del contenuto di solidi solubili	28
2.5.2	Quantificazione del contenuto di carotenoidi	28
2.5.3	Misura dell'attività antiossidante	28
2.6	<b>Saggio <i>in serra</i> per la valutazione dell'attività delle nuove miscele di <i>Trichoderma</i> spp. e i prodotti commerciali Micosat sullo sviluppo di <i>Phelipanche ramosa</i>.</b>	<b>29</b>
2.7	<b>Isolamento e caratterizzazione dei principali metaboliti secondari dei ceppi "K" di <i>Trichoderma</i> spp.</b>	<b>30</b>
2.8	<b>Saggio <i>in serra</i> per la valutazione degli effetti <i>in-vivo</i> dei metaboliti secondari di <i>Trichoderma</i> spp. e delle loro miscele con i prodotti commerciali Micosat.</b>	<b>31</b>
2.9	<b>Isolamento e caratterizzazione delle proteine dei ceppi "K" di <i>Trichoderma</i> spp. secrete nel mezzo di crescita.</b>	<b>32</b>
2.10	<b>Saggio <i>in serra</i> per la caratterizzazione dell'attività <i>in vivo</i> delle miscele proteiche isolate da <i>Trichoderma</i> spp. in termini di promozione di crescita su piante di mais.</b>	<b>34</b>
2.11	<b>Saggio <i>in serra</i> per la valutazione dell'attività <i>in-vivo</i> della miscela proteica del ceppo "K5" e della sua combinazione con i prodotti commerciali Micosat.</b>	<b>35</b>
2.12	<b>Analisi statistica</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>36</b>
3.1	<b>Selezione di ceppi di <i>Trichoderma</i> spp. per le nuove miscele con Micosat F Tab Plus e Len Plus.</b>	<b>36</b>

<b>3.2</b>	<b>Effetti di trattamenti su piante di pomodoro in campo delle miscele selezionate e dei loro singoli componenti</b>	<b>41</b>
3.2.1	Effetto dei trattamenti con le miscele selezionate, e dei loro singoli componenti sulla resa produttiva.	41
3.2.2	Effetto dei trattamenti con le miscele selezionate, e dei loro singoli componenti sulla qualità dei frutti prodotti.	42
3.2.3	Effetto dei trattamenti con le miscele selezionate, e dei loro singoli componenti sul controllo del patogeno <i>Alternaria solani</i> .	46
<b>3.3</b>	<b>Effetti delle nuove miscele di Micosat Tab e Len e dei ceppi di <i>Trichoderma selezionati</i> sullo sviluppo di <i>Phelipanche ramosa</i>.</b>	<b>48</b>
<b>3.4</b>	<b>Caratterizzazione dei principali metaboliti secondari prodotti dai ceppi di <i>Trichoderma</i> "K".</b>	<b>52</b>
<b>3.5</b>	<b>Effetti di nuove combinazioni a base di Micosat F Tab Plus e Micosat F Len Plus e metaboliti secondari di <i>Trichoderma</i> sulla crescita di piante di pomodoro.</b>	<b>55</b>
<b>3.6</b>	<b>Caratterizzazione delle proteine secrete formanti schiuma dei ceppi di <i>Trichoderma</i> "K".</b>	<b>57</b>
3.6.1	Produzione, isolamento e quantificazione delle proteine	57
3.6.2	Caratterizzazione proteomica delle schiume dei ceppi K di <i>Trichoderma</i> .	58
<b>3.7</b>	<b>Effetti delle miscele proteiche isolate dai ceppi "K" <i>in-vivo</i> su piante di mais, in termini di promozione di crescita e contenuto di clorofilla delle piante</b>	<b>65</b>
<b>3.8</b>	<b>Effetti di nuove combinazioni a base di Micosat F Tab Plus e Micosat F Len Plus e miscele proteiche di <i>Trichoderma viride</i> K5 sulla crescita di piante di pomodoro.</b>	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>84</b>

## 1 Introduzione

Una delle maggiori sfide del ventunesimo secolo sarà legata alla realizzazione di una produzione agricola saggia e sostenibile. Un aumento della produzione è necessario a fornire cibo sufficiente a soddisfare le richieste di una popolazione mondiale in continuo aumento. Infatti, l'Onu prevede che nell'anno 2030 sul nostro pianeta ci saranno circa 8,5 miliardi di abitanti. Successivamente, si stima che la popolazione continuerà a crescere raggiungendo 9,7 miliardi nel 2050 e 11,2 miliardi nel 2100.

Gli attuali metodi produttivi adottati nell'agricoltura convenzionale basati sull'uso improprio di pesticidi e fertilizzanti chimici, crea una lunga lista di problemi per l'ambiente e la salute umana (Gunnell et al., 2007; Leach and Mumford 2008). Inoltre, la comparsa di nuovi agenti patogeni correlati ai cambiamenti climatici, la riemersione di vecchi e l'esistenza di patogeni endemici continua a sfidare la nostra abilità nella salvaguardia della crescita e della salute delle piante in tutto il mondo (Miller et al., 2009; Coakley et al., 1999). Per tutti questi motivi, si chiede sempre di più che in campo agricolo si adottino strategie innovative ed ecocompatibili. Le biotecnologie vegetali, hanno contribuito allo sviluppo di nuove varietà colturali, con maggiori resistenze alle malattie, alla siccità, a stress salini, e con maggior valore nutrizionale. Sfortunatamente, le interazioni benefiche pianta-microrganismo sono state spesso ignorate nelle strategie di miglioramento genetico, anche se i microrganismi associati alle piante ricoprono funzioni importanti nell'ecosistema di pianta e suolo (Smith et al., 1999). Queste interazioni benefiche aumentano la tolleranza agli stress, forniscono resistenza alle malattie, aumentano la disponibilità e l'assorbimento di nutrienti e promuovono la biodiversità (Lugtenber et al., 2002; Morrissey et al., 2004). Inoltre, le comunità microbiche associate alle piante hanno un certo grado di specificità con gli ospiti a cui sono associate grazie ad uno specifico metabolismo secondario ed ad una caratteristica morfologia (Berg and Smalla., 2009).

La ricerca ha ampiamente dimostrato che funghi e batteri hanno un'intima interazione con le piante promuovendone la crescita e di sopprimendo lo sviluppo dei patogeni (Whipps 2001; Thakore 2006; Ehlers 2006).

La rizosfera è popolata da una grande abbondanza di microrganismi in grado di interagire anche positivamente con la pianta nell'agroecosistema (Berg et al., 2005b). Quando i microrganismi isolati dalla pianta sono stati saggiati individualmente, solo dall' 1% al 35% hanno mostrato capacità antagonistiche nell'inibire la crescita dei patogeni *in vitro* (Berg et al., 2002; 2006). In

proporzione, il numero degli isolati invece che hanno dimostrato la capacità di promuovere la crescita delle piante è stata molto più rilevante: fino a due terzi della popolazione coltivabile (Cattelan et al., 1999; Fürnkranz et al., 2009). In generale ci sono due possibilità per influenzare il potenziale antagonistico e/o di promozione di crescita dei microorganismi:

- i. attraverso la gestione del potenziale microbico indigeno, per esempio con l'introduzione di ammendanti organici o inorganici (Hallmann et al., 1999; Conn and Lazarovits 2000).
- ii. attraverso l'applicazione di microrganismi autoctoni come agenti di biocontrollo (BCAs) o di promozione di crescita (PGPAs) (Emmert e Handelsman 1999; Whipps 2001; Weller et al., 2002; Compant et al., 2005; Weller 2007).

Numerosi inoculi microbici sono commercializzati nel mondo e negli ultimi anni la loro popolarità è aumentata notevolmente grazie alla ricerca scientifica che ne ha migliorato la loro efficacia e consistenza (Thakore 2006).

Nell'ultimo decennio il mercato dei bioformulati è in continua crescita con un incremento annuo di circa il 10 %, mentre vi è un calo rilevante delle vendite dei prodotti chimici di sintesi per l'agricoltura (Bailey et al, 2010). Sono ormai numerosissimi i prodotti commerciali a base di microrganismi benefici e agenti di biocontrollo, distribuiti in tutte le nazioni del mondo. Questi prodotti hanno le più svariate formulazioni di agenti di biocontrollo singoli e in combinazione con diversi microrganismi benefici e/o molecole bioattive (Woo et al., 2014) In tabella 1.1 sono riportati alcuni esempi di diverse formulazioni di BCA distribuiti nel mondo.



## 1.1 Microrganismi benefici e agenti di biocontrollo

### 1.1.1 Batteri della rizosfera

I batteri della rizosfera che stimolano la crescita e migliorano lo stato di salute delle piante e del suolo in generale sono moltissimi e sono ascrivibili ai più diversi generi (Compant et al., 2005) I PGPR (*Plant growth promoting rhizobacteria*) sono associati a molte le specie di piante esistenti e sono comunemente presenti i moltissimi ecosistemi (Bashan e Holguin, 1998). Molti di questi batteri sono in grado di penetrare la radice e stabilire all'interno della pianta una popolazione endofita (Kloeppel et al., 1999). Inoltre, molti di questi sono anche capaci di superare le barriere endodermiche e attraversare la corteccia radicale, passare per il sistema vascolare e colonizzare fusto, foglie e altri organi e tessuti della pianta ospite (Compant 2005; Grey e Smith 2005; Hallmann et al., 1997).

La superficie della radice e la rizosfera sono un'importante risorsa di carbonio (Rovira, 1965). L'allocazione dei fotosintati in questa zona può arrivare fino al 40% e lungo tutta la superficie della radice ci sono varie nicchie ecologiche formate da una varietà di nutrienti che attraggono una grande diversità di microrganismi, inclusi i patogeni (Degenhardt et al., 2003). La competizione per questi nutrienti e la formazione delle nicchie ecologiche rappresentano un meccanismo fondamentale attraverso il quale i PGPR proteggono la pianta dai fitopatogeni (Duffy, 2001). I composti chimici noti con attività di attrattori, che sono presenti negli essudati radicali, includono: acidi organici, amminoacidi e zuccheri specifici (Welbaum et al., 2004). Alcuni essudati possono essere efficaci come agenti antimicrobici e forniscono un vantaggio selettivo per i microrganismi dotati di specifici enzimi con la funzione di detossificare questi composti (Bais et al., 2004). La quantità e la composizione di questi essudati radicali è sotto il controllo genetico e ambientale per cui la competenza dei PGPR è altamente dipendente dalla loro capacità di sfruttare degli ambienti specifici.

Il ferro è un elemento essenziale per la crescita di tutti gli organismi viventi. La scarsità di ferro biodisponibile nei suoli e sulle superfici delle piante produce competizione per questo elemento. In condizioni di scarsità di ferro, i PGPR producono metaboliti secondari in grado di chelare stabilmente il ferro. La produzione di queste molecole, denominate siderofori, dipende dalla specie e dal ceppo batterico considerato e la loro biosintesi comporta un notevole vantaggio competitivo per gli organismi produttori (Whipps 2001) I batteri produttori di siderofori privano i funghi patogeni di questo elemento essenziale dal momento che i siderofori fungini hanno una

minore affinità (Loper e Henkels 1999) e portano un beneficio alle piante in quanto favoriscono la assunzione di ferro indisponibile (Vinale et al., 2012).

Le ricerche degli ultimi 20 anni hanno fatto sempre più chiarezza sui meccanismi di biocontrollo dei PGPR. Sono stati identificati una grande varietà di metaboliti secondari ad azione antibiotica come il 2,4-diacetilfluoroglucinolo (DAPG), l'acido cianidrico, la oomicina A, le fenazine, i lipopeptidi ciclici prodotti da *Pseudomonas* e *Bacillus*, la oligomicina A e la streptomicina prodotte da *Streptomyces* (Whipps 2001; de Souza et al., 2003; Nielsen et al., 2002; Nielsen e Sørensen 2003.).

Tracce di elementi, in particolare zinco, e le diverse fonti di carbonio influenzano la stabilità o l'instabilità genetica dei batteri influenzando sulla loro capacità di produrre metaboliti secondari. È importante notare che molti ceppi batterici producono una grande varietà di metaboliti secondari antimicrobici e le condizioni che favoriscono la produzione di uno potrebbero non favorire la produzione di un altro (Duffy e Defago 2000). In questo modo il grande arsenale di antibiotici che i ceppi di biocontrollo hanno a disposizione li rende in grado di conseguire il loro obiettivo ultimo di soppressione degli agenti patogeni in diverse condizioni ambientali (Duffy e Defago 2000).

Molti microrganismi hanno attività parassitica nei confronti dei patogeni grazie alla produzione di enzimi litici delle pareti cellulari. Questa attività è stata riscontrata in batteri del genere *Serratia* spp., *Paenibacillus* sp., *Streptomyces* sp., e *Pseudomonas* sp. che producono chitinasi e laminarasi attive contro una grande varietà di patogeni fungini come *Botrytis cinerea* e *Sclerotium rolfsii* (Chernin e Chet 2002; Frankowsky et al., 2001; Ordentlich et al., 1988; Singh et al., 1999).

L'immunizzazione delle piante con alcuni PGPR può fornire alle stesse una resistenza sistemica contro un ampio spettro di patogeni di origine fungina, batterica e virale e talvolta può fornire protezione anche contro danni da insetti e nematodi (Van Loon et al., 1998).

### 1.1.2 Funghi benefici

I funghi benefici hanno un potenziale di biocontrollo molto maggiore rispetto a quello dei batteri, grazie alla loro facilità di crescita e di dispersione nel suolo e nella rizosfera (Whipps 2001). I funghi appartenenti al genere *Trichoderma* hanno un evidente predominio in questo campo grazie alla facilità di crescita ed alla vasta gamma di ospiti (Whipps e Lumsden 2001).

Altri generi sono stati descritti come agenti di biocontrollo, tra cui alcune specie di *Fusarium* e *Pythium* non patogene, così come alcuni simbionti mutualistici (funghi micorrizici) appartenenti al genere *Glomus* (Whipps 2001).

L'azione benefica nei confronti della pianta da parte dei funghi benefici avviene controllando gli agenti patogeni attraverso molteplici meccanismi, quali la produzione di antibiotici, enzimi litici, sostanze antimicrobiche, ecc., ovvero mediante una competizione per i nutrienti o una diretta parassitizzazione (Tab. 1.2).

**Tabella 1-2: Principali funghi antagonisti con relativo meccanismo di azione e agenti patogeni controllati.**

<b>Fungo antagonista</b>	<b>Meccanismo</b>	<b>Patogeno controllato</b>
<i>Trichoderma</i> spp.	Micoparassitismo, antibiosi, competizione, induzione di resistenza	<i>Fusarium</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Sclerotinia</i>
<i>Verticillium biguttatum</i>	Micoparassitismo	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Chaetomium</i> spp.	Micoparassitismo e antibiosi	<i>Alternaria</i> , <i>Pythium</i>
<i>Sporidesmium sclerotivorum</i>	Micoparassitismo	<i>Sclerotium</i>
<i>Laetisaria arvalis</i>	Micoparassitismo	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i>
<i>Gliocladium virens</i>	Micoparassitismo e antibiosi	<i>Sclerotinia</i> spp.
<i>Coniothyrium minitans</i>	Micoparassitismo	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>Talaromyces flavus</i>	Micoparassitismo	<i>Verticillium</i>
<i>Pythium nunn</i>	Micoparassitismo	<i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i>

I funghi antagonisti possono interagire direttamente con la pianta attraverso processi di colonizzazione, aumento della biodisponibilità di nutrienti, produzione di sostanze utili al metabolismo della pianta e induzione della resistenza (Vinale et al., 2008).

### 1.1.3 Micorrize arbuscolari (AMF)

Le radici sono la nicchia ecologica preferita dai funghi terricoli che vivono nella rizosfera come saprofiti o che sono direttamente associati con piante capaci di compiere fotosintesi, come i simbionti micorrizici (Bonfante e Anca, 2009).

Le micorrize rappresentano un componente vitale nell'ecosistema delle piante. Esse sono ampiamente distribuite sia in ambienti naturali che agricoli in più dell' 80% delle piante esistenti (Smith e Read, 2008). Per un efficiente assorbimento di nutrienti la maggior parte delle piante

terrestri ha bisogno di essere associate a funghi micorrizici che forniscono nutrienti, aumentando la loro produttività e conferendo resistenza agli stress. Lo sfruttamento di questa simbiosi in ambienti naturali ed agronomici è di grande valore economico (Bonfante e Anca, 2009).

Il termine micorriza è utilizzato per descrivere molte diverse interazioni fungo-apparato radicale e il successo ecologico di queste associazioni deriva dall' alto grado di diversità genetica e dalla abilità fisiologiche dei funghi endofiti.

Circa 6000 specie di *Glomeromycotina*, *Ascomycotina* e *Basidiomycotina* sono stati registrati come funghi micorrizici e l'avvento di tecniche di identificazione molecolare sta accrescendo sempre di più questo numero. La posizione tassonomica delle piante e dei partner fungini distingue i tipi di micorriza tra ectomicorrize ed endomicorrize. Per le endomicorrize, come per le micorrize arbuscolari (AMF), le ife penetrano nelle cellule delle radici stabilendo una simbiosi intracellulare indipendentemente dal tipo di pianta ospite (Bonfante e Anca, 2009; Bonfante e Genre 2008).

Le AMF si sviluppano nella rizosfera grazie ai loro propagoli (spore, ife e rizomorfi) che formano un ponte tra il suolo e le radici delle piante. Tali ponti sono responsabili delle comunicazioni tra le diverse piante e funghi formando in questo modo connessioni per uno scambio orizzontale di nutrienti (Simard et al., 1997).

La colonizzazione da parte delle AMF è molto complessa e porta allo sviluppo di appressori sulla superficie delle radici, di ife, di tubuli e di caratteristiche strutture ramificate chiamati arbuscoli che si sviluppano all'interno delle cellule corticali. Queste strutture, che danno il loro nome alla simbiosi, sono considerate il principale sito di scambio di nutrienti tra i due partner (Harrison, 2005).

I funghi micorrizici migliorano l'assorbimento di nutrienti della pianta grazie alla profonda esplorazione della rizosfera da parte delle ife, le quali in cambio ricevono dalla pianta carboidrati essenziali per il completamento del ciclo vitale del fungo (Thompson e Cunningham 2002).

Le AMF posseggono meccanismi di trasporto attivo di fosfato inorganico dal suolo, permettendo il suo rilascio alla pianta. Inoltre, anche le piante posseggono dei trasportatori di fosfato che sono micorriza specifici. Il loro ruolo è ricevere fosfato dai funghi e rilasciarlo alle cellule delle piante (Harrison, 2005; Javot et al., 2007).

L'azoto è un altro importante elemento assorbito dalla maggior parte dei funghi micorrizici. Molti dati fisiologici e molecolari mostrano che i trasportatori di azoto nella pianta sono attivati durante il processo di micorrizzazione, suggerendo che i funghi micorrizici rilasciano una

notevole quantità di azoto ai loro ospiti (Cappellazzo et al., 2008; Lucic et al., 2008; Smith e Read, 2008; Guether et al., 2009a,b).

Le micorrize arbuscolari, oltre che essere note per l'attività di promozione di crescita delle piante sono potenzialmente in grado di agire come agenti di biocontrollo. Le micorrize possono fornire protezione nei confronti di agenti patogeni grazie alla loro associazione obbligata con le piante attraverso la competizione per lo spazio e i nutrienti (Whipps 2001). Le AMF occupano per esempio lo spazio e i siti di infezione delle radici ma molte evidenze dimostrano che la maggiore capacità di biocontrollo di questi funghi simbiotici è maggiormente legata all'induzione di resistenza, al miglioramento delle condizioni nutrizionali della pianta e ai cambiamenti nella morfologia delle radici (Cordier et al., 1996; Norman et al., 1996; Mark e Cassells, 1996).

È necessario che si instauri una buona simbiosi micorrizica per ottenere una adeguata induzione di resistenza nella pianta (Slezack et al., 2000; Khaosaad et al., 2007). Alcuni esperimenti in cui sono state inoculate con micorrize arbuscolari solo una parte delle radici fisicamente separata dal resto della pianta hanno permesso di confermare gli effetti sistemici dell'induzione di resistenza da parte delle AMF (Khaosaad et al., 2007; Zhu et al., 2004). Questo effetto potrebbe essere attribuito alle migliori condizioni nutrizionali della pianta. Infatti questi studi hanno dimostrato una maggiore resistenza contro l'attacco di patogeni anche in un sistema con piante controllo in cui sono state aumentate le dosi di nutrienti alla pianta (Shaul et al., 1999; Fritz et al., 2006; Liu et al., 2003).

Le piante colonizzate con micorrize arbuscolari mostrano un accumulo di sostanze legate alle risposte di difesa della pianta, anche se in quantità decisamente minore rispetto a quella riscontrata durante l'interazione pianta-patogeno. È stato riportato che nelle piante micorrizzate si verifica un accumulo delle specie reattive dell'ossigeno, di fenilpropanoidi e di enzimi idrolitici come le chitinasi e le glucanasi. Queste reazioni sono generalmente localizzate e suggeriscono un ruolo nell'instaurazione della simbiosi micorrizica (Pozo et al., 2002; Dumas et al., 2000; Garcia-Garrido e Ocampo, 2002).

#### **1.1.4 Il genere *Trichoderma***

I microrganismi fungini appartenenti al genere *Trichoderma* sono impiegati in agricoltura e nell'industria. *T. reesei* è ampiamente utilizzato per la produzione di proteine, mentre altre specie vengono impiegati comunemente come biopesticidi, biofertilizzanti e biostimolanti (Harman e

Kubicek, 1998). Questo è reso possibile grazie all'elevato quantitativo di propagoli del fungo che possono essere prodotti velocemente e a costi relativamente contenuti, per poi essere inseriti in appositi formulati (sia liquidi che in polvere) applicabili in serra, in pieno campo ed in post raccolta. Nella tabella 1-3 sono riportati i principali prodotti commerciali presenti sul mercato globale a base di *Trichoderma* (Woo et al., 2014).

Tabella 1-3: Esempi di formulati commerciali a base di *Trichoderma*

<b>Prodotto</b>	<b>Ingrediente attivo</b>	<b>Patogeno bersaglio</b>	<b>Coltura protetta</b>
<b>Binab T™ (Svezia)</b>	<i>T. harzianum</i> (ATCC 20476), <i>T. polysporum</i> (ATCC 20475)	Batteri e funghi	Alberi da frutta, ornamentali, graminacee
<b>Bio-Fungus™</b>	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Phytophthora</i>	Ananas, ciliegio, specie a fiore, ornamentali, alberi da fusto
<b>Antagon™ (Belgio)</b>	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia Solanii</i>	Colture ortive
<b>Harzian 20™ (Francia)</b>	<i>T. harzianum</i> (NPP TH 20)	<i>Armillaria</i> , <i>Pythium</i> sp., <i>Sclerotinia</i> sp.	Alberi da frutta, vite, orchidee
<b>PlantShield™ RootShield™ (USA)</b>	<i>T. harzianum</i> T-22 <i>T. harzianum</i> Rifai	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Thielaviopsis</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Cylindrocladium</i> , <i>Botrytis</i>	Cavolo, cetriolo, pomodoro, ornamentali, alberi
<b>Promote™ Promot Plus™ (Canada)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia solani</i>	Colture in serra
<b>Root Pro™ (Israele)</b>	<i>T. harzianum</i>	<i>Athelia rolfsii</i> , <i>Fusarium</i> <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> <i>Sclerotinia</i> , <i>Thanatephorus</i>	Colture ortive
<b>T-22™ (USA)</b>	<i>T. harzianum</i> T-22	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotinia</i>	Ornamentali, ortive, colture floricole
<b>Tri 002/003™ (Olanda)</b>	<i>T. harzianum</i>	Vari batteri e funghi	Rosa, begonia, rododendro, pomodoro, crisantemo, cetriolo
<b>Trichodex™ (Israele)</b>	<i>T. harzianum</i> T-39	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Monilia laxa</i> <i>Collectotrichum</i> , <i>Fulvia fulva</i> , <i>Plasmopara viticola</i> , <i>Pseudoperonospora</i>	cetriolo, uva, soia, fragole, nettarine, pomodoro, girasole
<b>Trichodowels™ (Nuova Zelanda)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Armillaria</i> sp., <i>Phytophthora</i> <i>Chondrostereum purpureum</i>	Drupacee, pomacee, vite
<b>Trichobject™ (Nuova Zelanda)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Armillaria</i> , <i>Botryosphaeria</i> <i>Chondrostereum purpureum</i>	Kiwi, susino, vite ornamentali
<b>Trichopel™ (Nuova Zelanda)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Fusarium oxisporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i>	Ortive, ornamentali, colture sotto serra

<b>Trichoseal™ (Nuova Zelanda)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i> , <i>Chondrostereum purpureum</i>	Frutticole, ornamentali vite, orchidee
<b>Trisan™ (Tailandia)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Fusarium oxisporum</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Thanatephorus</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i>	Colture sotto serra, ornamentali colture, ortive
<b>TurfShield™ (USA)</b>	<i>T. harzianum</i> T-22	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium sp.</i> , <i>Rhizoctonia sp.</i> , <i>Sclerotinia</i>	Graminacee, prati (campi da golf)

Uno dei meccanismi di biocontrollo utilizzati dai microrganismi appartenenti al genere *Trichoderma* nei confronti di altri funghi patogeni è il micoparassitismo (Howell, 2003; Kubicek e Harman, 1998; Papavizas, 1985). Questo meccanismo è basato sul riconoscimento, l'attacco e la distruzione enzimatica della parete cellulare del fungo ospite. *Trichoderma* produce numerosi enzimi a differente attività idrolasica, come, endochitinasi, esochitinasi, proteasi, endo- ed eso-glucanasi, amilasi, pectinasi e altri (Harman e Kubicek, 1998). *Trichoderma* rileva la presenza di altri funghi e cresce verso di loro (Chet et al., 1981). Il rilevamento a distanza è almeno in parte dovuto all'espressione dei CWDEs (Cell-Wall-Degrading-Enzymes) che il fungo produce sempre a bassi livelli. La diffusione di eso chitinasi catalizza il rilascio di oligomeri della parete cellulare da parte dei funghi bersaglio e questo a sua volta induce l'espressione di endo-chitinasi fungitossiche (Brunner et al., 2003), le quali a loro volta diffondono e iniziano l'attacco del bersaglio ancora prima che il contatto sia avvenuto (Zeilinger et al., 1999; Viterbo et al., 2002; Harman et al., 2004). Il riconoscimento del bersaglio può avvenire attraverso legami tra i residui di zuccheri della parete cellulare di *Trichoderma* e le lecitine del fungo ospite (Inbar et al., 1995). Una volta entrato in contatto con il fungo da parassitare, *Trichoderma* inizia a formare degli appressori sulla superficie dell'ospite. Le ife di *Trichoderma* infine penetrano nelle cellule dell'ospite e provocano solchi e fori di penetrazione generati dall'azione degli enzimi litici (Elad et al., 1982; Harman et al., 2004). Durante questi processi *Trichoderma* produce una miscela sinergica di CWDEs che idrolizzano la parete cellulare del fungo ospite e peptaiboli antibiotici (Kubicek et al., 2001; Howel, 2003; Harman et al., 2004; Woo et al., 2006).

L'attività antagonistica e micoparassitica di *Trichoderma* è strettamente correlata alla capacità dei questo genere di funghi di produrre sostanze antibiotiche come gliovirina e la gliotossina attive contro una vasta gamma di funghi e batteri (Papavizas, 1985; Alabouvette e Lemanceau, 1999), terpeni, derivati isocianidici, polichetidi e famiglie complesse di peptaiboli (peptidi idrofobici) (Brewer et al., 1987; Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998; Reino et al.2008, Vinale

et al. 2014) Questa capacità fornisce ai ceppi produttori un ausilio fondamentale nella competizione con altri microrganismi (Lorito et al., 2010). L'applicazione di antibiotici purificati spesso ha dimostrato di produrre nel fungo ospite gli stessi effetti ottenuti con i corrispondenti microrganismi vivi (Lorito et al., 2010.)

La competizione per spazio e nutrienti è un altro meccanismo d'azione attraverso cui *Trichoderma* esplica la sua attività di biocontrollo nei confronti degli agenti fitopatogeni (Ozbay e Newman, 2004). Tale capacità risulta strettamente legata all'elevata adattabilità ecologica e versatilità metabolica di *Trichoderma*, proprietà che conferiscono a questi funghi un vantaggio in termini di efficienza di colonizzazione di differenti nicchie ecologiche e di utilizzazione di diversi substrati. Basti pensare che questi funghi sono residenti nei suoli di tutto il mondo, anche sottoposti a condizioni ambientali estreme. Quest'ultimo aspetto è legato alla capacità di *Trichoderma* di persistere come clamidospore e conidi, in condizioni di stress da carenza di nutrienti (Gams e Bisset, 1998). Pertanto, la rapida velocità di crescita, l'abbondante produzione di conidi dotati di elevata persistenza e la capacità di utilizzare una vasta gamma di fonti di carbonio, di azoto e di substrati (Gams e Bisset, 1998), fanno di *Trichoderma* un efficace competitore, in grado di sfruttare le risorse disponibili sia come colonizzatore primario sia come colonizzatore secondario di risorse già occupate da altri microrganismi (Cooke e Rayner, 1984). La competizione dei *Trichoderma* nei confronti degli altri microrganismi può interessare l'approvvigionamento di nutrienti derivanti da tessuti già colonizzati dai patogeni, come nel caso del biocontrollo di *Botrytis* spp. e *Sclerotinia* spp. (Gullino, 1992), oppure l'utilizzo degli essudati radicali delle piante e dei semi germinanti, come accade nell'interazione antagonistica con *P. ultimum* (Ahmad e Baker, 1988). L'abilità competitiva è dovuta, tra le altre cose, alla capacità di influenzare la disponibilità di alcuni nutrienti nella rizosfera, come ad esempio il ferro producendo siderofori simili a quelli di *Pseudomonas* spp. (Sivan e Chet, 1989). Inoltre, la capacità di alcuni isolati di *Trichoderma* di competere per spazio e nutrienti è strettamente correlata all'abilità di alcuni ceppi di colonizzare l'apparato radicale delle piante, inducendo in alcuni casi anche un miglioramento della crescita, dell'architettura e dell'efficienza delle radici (Ozbay e Newman, 2004). Tale qualità, definita competenza per la rizosfera (*rhizosphere competence*), ha un ruolo chiave nell'espressione dell'attività biologica di un antagonista (Sivan e Harman, 1991; Harman et al., 2004).

Numerosi esperimenti hanno provato la capacità di alcuni isolati di resistere ad una varietà di tossine e composti xenobiotici, inclusi antibiotici prodotti da altri microrganismi, composti

antimicrobici di origine vegetale e fungicidi di sintesi (Harman et al., 2004). La base molecolare del meccanismo di resistenza che rende questi funghi dei forti competitori ed attivi colonizzatori di ambienti “inquinati” è stata parzialmente delucidata con la recente scoperta di un set di trasportatori di membrana chiamati trasportatori ABC (*ATP Binding Cassette*) (Lorito et al., 2010). Quest’ultimi sono permeasi di membrana ATP-dipendenti, che mediano il trasporto di differenti substrati attraverso le membrane biologiche contro un gradiente di concentrazione (Driessen et al., 2000). La peculiarità di queste proteine è quella di detossificare il citoplasma delle cellule attraverso il trasporto attivo verso l’esterno delle molecole tossiche. La bassa specificità di substrato, e pertanto la capacità di trasportare sostanze chimiche diverse, conferisce ai trasportatori ABC il ruolo di fattori di polichemioresistenza (*Multi Drug Resistance, MDR*) (Ruocco et al., 2009). Infatti, è stato ipotizzato che i trasportatori ABC di *Trichoderma* spp. svolgono un ruolo importante in numerosi processi, dalla secrezione di fattori (micotossine, enzimi idrolitici, ormoni ecc.) necessari per stabilire un’interazione compatibile tra il micoparassita, il fungo ospite e/o la pianta, alla resistenza a sostanze tossiche prodotte dalla microflora o introdotte da attività antropiche (fungicidi, metalli pesanti, idrocarburi etc.) (Ruocco et al., 2009).

Numerosi metaboliti secondari ad attività antibiotica prodotti da *Trichoderma* sono stati isolati e caratterizzati ed in base alla loro struttura chimica sono stati ipotizzati anche diversi meccanismi d’azione (Vinale et al., 2008). Composti a basso peso molecolare non polari e volatili possono attaccare il loro bersaglio anche a lunga distanza, mentre antibiotici polari e peptaiboli possono agire nei confronti dell’antagonista o a distanza ravvicinata o a contatto diretto. Inoltre, queste sostanze possono agire in maniera sinergica con i CWDEs favorendo l’idrolisi delle strutture del patogeno (Vinale et al., 2008)

In combinazione con gli effetti diretti sul patogeno, *Trichoderma* ha anche la capacità di stabilire un intimo rapporto con la pianta e colonizzare la superficie delle radici. Le ife sono in grado di penetrare i tessuti e invadere i primi strati cellulari (Metcalf e Wilson, 2001; Thrane et al., 1997; Yedida et al., 1999). Alcuni ceppi di *Trichoderma* hanno mostrato anche la capacità di crescere sulla superficie delle foglie. Questa capacità è stata osservata dopo trattamenti fogliari con conidi di *T. harzianum* T22 in cui numerose spore germinate e ife sono state rinvenute sulla fillosfera (Lo CT et al., 1998). *Trichoderma* ha mostrato la capacità di poter stimolare le risposte di difesa (Yedida et al., 1999) e promuovere la crescita delle piante (Harman et al., 2004). Inoltre, questi funghi agiscono come simbionti utilizzando quali nutrienti gli essudati radicali e favorendo

l'assorbimento degli stessi da parte della pianta con il risultato di proteggerla da stress biotici ed abiotici (Harman et al., 2004; Shoresh et al. 2010; Lorito et al. 2010).

Il *Trichoderma* interviene nei meccanismi di difesa della pianta, incrementando l'immunità di base attivata (MTI) dai profili molecolari prodotti dai microrganismi (*Microbe-Associated Molecular Patterns* - MAMPs ) e può ridurre la suscettibilità innescata dagli effettori (ETS), come indicato nel modello a zig-zag di Jones e Dangl (Lorito et al., 2010). Infatti, ceppi di *Trichoderma* sono capaci di indurre una risposta di difesa più intensa paragonata a quella causata dai patogeni (MAMP/PAMPs - triggered immunity MTI/PTI - MTI>PTI) producendo vari tipi di MAMPs (Navazio et al., 2007) come le idrofobine, (Djonovic et al. 2006; Vargas et al., 2008) e le proteine simili all'espansina (Brotman et al., 2008), metaboliti secondari ed enzimi che hanno un'attività antimicrobica diretta. Alcuni di essi sono in grado di contrastare gli effettori dei patogeni che interferiscono con l'MTI per esempio inibendo i fattori di patogenicità oppure controllando la dispersione e la nutrizione dei patogeni. Questo riduce la suscettibilità causata dagli effettori (ETS), limita la perdita di resistenza e mantiene la risposta della pianta ad un livello superiore, o appena inferiore, a quello della soglia di efficacia. Il *Trichoderma* inoltre può anche migliorare l'ETI provocando una risposta di difesa più veloce (*priming*), oppure la attiva rilasciando dei composti che sono riconosciuti specificamente dai recettori delle cellule delle piante, così come accade per gli effettori dei patogeni (Lorito et al., 2010).

La pianta si può difendere attuando due strategie: la resistenza sistemica acquisita (SAR) e resistenza sistemica indotta (ISR). La SAR è generalmente attivata dalle infezioni locali e fornisce una resistenza sistemica a lungo termine, conseguente all'attacco del patogeno. Questo tipo di resistenza è correlata con l'attivazione dei geni PR e con l'azione della molecola segnale acido salicilico (SA). L'ISR è una nota conseguenza della colonizzazione delle radici da parte di alcuni rizobatteri non patogeni e le molecole segnale che attivano questo tipo di risposta sono l'acido jasmonico (JA) e l'etilene. Molti esperimenti dimostrano che l'acido jasmonico e l'etilene sono coinvolti nei meccanismi di controllo biologico di *Trichoderma* (Shoresh et al., 2005). Inoltre, è stato dimostrato che *Trichoderma* induce nella pianta una sovra-espressione del gene Pal1 che codifica per l'enzima fenilalanina ammonio-liasi. Quest'enzima catalizza la prima di una sequenza di reazioni che portano alla formazione di composti fenolici, incluse le fitoalessine (Shoresh et al. 2010; Lorito et al. 2010)

L'inoculo di *Trichoderma* sulle radici delle piante produce una sotto-regolazione delle proteine PR (Chen et al., 2005) ed una sotto-espressione delle proteine coinvolte nella produzione di etilene (Shoresh et al., 2005). Questo silenziamento locale delle risposte di difesa facilita le interazioni simbiotiche (Chen et al., 2005). Le piante attivate dal priming attraverso l'inoculo di *Trichoderma*, e attaccate da un patogeno, mostrano dei livelli di espressione di proteine PR molto più alti rispetto ai controlli non trattati. Ciò è associato anche ad un innalzamento dei livelli dei glicosidi fenolici, i cui agliconi sono composti antifungini altamente tossici (Lorito et al. 2010)

L'effetto di *Trichoderma* sulla crescita delle piante include un maggiore sviluppo di radici e germogli e un aumento della percentuale di germinazione dei semi (Bjorkman et al., 1998; Chang et al., 1986; Harman, 2000; Harman et al., 2004; Harman et al., 2008). In molti casi *Trichoderma* produce un aumento della sostanza secca, del contenuto di amido e di zuccheri solubili in diverse specie di piante (Adams et al., 2007; Shoresh e Harman 2008). È anche possibile che ceppi di *Trichoderma* agenti di biocontrollo influenzino la crescita delle piante contrastando la microflora patogena della rizosfera. Questi organismi in ogni caso hanno mostrato la capacità di migliorare la crescita sia in condizioni di campo sia su substrati sterili suggerendo un effetto diretto sulla pianta (Harman et al., 2004; Yedida et al., 2001).

L'interazione con *Trichoderma* ha l'effetto di promuovere la crescita e in generale il benessere della pianta nonostante attivi contemporaneamente risposte di difesa, che hanno un costo metabolico. Tuttavia si è visto che *Trichoderma* in realtà attiva uno stato di priming che richiede una spesa energetica molto bassa (Van Hulst et al., 2006). Inoltre il costo energetico richiesto dall'attivazione dei meccanismi di difesa è compensato da un aumento della fotosintesi (Shoresh e Harman, 2008). L'applicazione di *Trichoderma* ha mostrato anche un effetto sui pathways metabolici della glicolisi e degli acidi tricarbossilici, la maggior parte dei quali è sovra-regolato nei germogli (Shoresh e Harman, 2008).

Oltre ad un aumento dei meccanismi coinvolti nella fotosintesi, l'applicazione di agenti di biocontrollo e di *Trichoderma* evidenzia anche un aumento dell'efficienza fotosintetica dovuta sostanzialmente ad un aumento dell'efficienza nel trasporto di elettroni (Oukarroum et al. 1982; Demming e Bjorkman 1987; Rai et al., 2008).

L'effetto dei trattamenti con *Trichoderma* si può osservare anche sulla morfologia delle radici. L'apparato radicale delle piante trattate è più robusto e sviluppato (Harman, 2000). La promozione della crescita ed un aumento della lunghezza e della ramificazione delle radici e

della densità dei peli radicali può migliorare lo sfruttamento del suolo e quindi migliorare la crescita delle piante (Shoresh et al., 2010). L'idrofobina, un effettore proteico isolato da T22, ha dimostrato di un effetto di promozione di crescita delle radici mimando l'azione del fungo produttore (Ruocco et al., 2014).

Molti metaboliti secondari isolati da *Trichoderma* e applicati direttamente sulle piante si comportano come composti auxino-simili, o induttori di auxina promuovendo la crescita e lo sviluppo delle radici laterali delle piante (Vinale et al., 2008).

Un altro fattore coinvolto nella promozione di crescita delle piante può essere legato ad un maggior assorbimento di nutrienti. *Trichoderma* ha una significativa capacità di solubilizzare un'ampia gamma di elementi nutritivi (fosforo, ferro, rame, zinco e manganese) rendendoli più disponibili per l'assorbimento radicale. L'interazione tra le piante e gli agenti di biocontrollo inoltre può incrementare l'efficienza di utilizzo dell'azoto (NUE). Quest'effetto è stato riscontrato in piante di mais allevate in condizioni di carenza d'azoto. Gli individui trattati con *T. harzianum* mostravano un incremento dei livelli di accrescimento ed avevano un colore verde più intenso (Harman, 2000). Le piante generalmente rispondono ad un aumento di apporto di sostanze azotate con una relazione dose/effetto fino al raggiungimento di un plateau, per cui un ulteriore incremento di azoto non corrisponde ad una maggiore resa produttiva. In presenza di T22 questo plateau veniva raggiunto con il 40-50% in meno di azoto rispetto al testimone non trattato. Questi risultati possono essere spiegati con l'induzione da parte di *Trichoderma* dell'espressione dell'enzima nitrato-reduttasi che converte il nitrato in ioni ammonio (forma necessaria a sostenere il metabolismo dell'azoto) (Shoresh et al., 2010).

Diversi meccanismi sono coinvolti nell'interazione pianta/microrganismi (Whipps 2001; Compant et al., 2005). In molti dei casi di interazione benefica pianta/microrganismo sono coinvolti numerosi meccanismi (Berg et al., 2002; Haas e Defago 2005; Müller et al., 2009). È difficile differenziare meccanismi di interazione diretta con la pianta che promuovono la crescita delle piante da quelli che agiscono attraverso la soppressione delle malattie. Inoltre l'importanza di un meccanismo specifico può variare all'interno di diversi pato-sistemi (Chet e Chernin 2002). La capacità di colonizzazione dei tessuti vegetali è importante dell'interazione benefica pianta/microrganismo (Lugtenberg et al., 2002; Kamilova et al., 2005). Le radici delle piante iniziano il dialogo con i microrganismi del suolo attraverso la produzione di segnali che sono riconosciuti da questi e che in risposta producono i segnali che danno il via alla colonizzazione (Bais et al., 2006). Nella partecipazione a questo dialogo si avvantaggiano i microrganismi dotati

di motilità (Lugtemberg et al., 2002). Inoltre è probabile che l'esito, la durata e l'intensità dell'interazione pianta/microorganismo siano significativamente influenzati dalla conformazione della popolazione microbica aderente (Danhorn e Fuqua, 2007).

La comunità microbica presente nel suolo interagisce con le piante attraverso un complesso sistema di interazioni molecolari che attivano nelle cellule delle piante una immunità innata che è elicitata anche da segnali sistemici emanati dai siti di infezione. Jones e Dangl (2006) hanno elaborato un modello coevolutivo tra piante e microrganismi che è molto utilizzato per inquadrare queste interazioni.

I microrganismi producono numerose molecole di diversa natura, come proteine, carboidrati, acidi grassi e metaboliti secondari. Questi profili molecolari prodotti dai microrganismi (MAMPs/PAMPs: microbe/pathogen-associated molecular patterns) vengono percepiti in maniera aspecifica dalle piante attraverso dei recettori di riconoscimento dei pattern molecolari (PRRs: pattern recognition receptors). I MAMPs innescano nella pianta una risposta di difesa di diversa intensità permettendo di raggiungere una prima soglia di resistenza che arresta un'ulteriore colonizzazione (MTI/PTI: microbe/pathogen triggered immunity).

I microrganismi patogeni si evolvono e superano questo primo livello di difesa delle piante producendo una serie di molecole chiamate effettori che contribuiscono alla virulenza del patogeno e deprimono l'immunità di base delle piante inibendo o interferendo con le risposte che la pianta ha prodotto per diventare immune riportandola quindi al di sotto della soglia di resistenza efficace. La condizione di suscettibilità in cui si trova la pianta a causa degli effettori è detta ETS (Effector-triggered susceptibility).

Alcuni degli effettori dei patogeni possono essere riconosciuti in maniera specifica da alcune proteine NB-LRR costituite da domini ricchi di leucine ripetute (LRR: *leucine rich repeat*) che legano i nucleotidi (NB: nucleotide binding). Queste proteine sono prodotte da specifici geni di resistenza mentre i geni che codificano per gli effettori dei patogeni, riconosciuti in maniera specifica, sono detti geni di avirulenza (AVR). Quando avviene questo riconoscimento specifico la pianta si trova in una condizione di immunità innescata dagli effettori (ETI: effector triggered immunity). Questa risposta di difesa è molto più intensa di quella innescata dai MAMPs e la pianta reagisce superando la soglia della Risposta Ipersensibile (HR: *hypersensitive response*) provocando la morte delle cellule invase dal patogeno o di quelle circostanti il punto di infezione.

La selezione naturale conduce i patogeni ad evitare l'ETI mutando e diversificando i geni degli effettori che sono stati riconosciuti o producendo dei nuovi effettori che possono diminuire l'ETI, e riportare la pianta nella condizione di suscettibilità, al di sotto della soglia della resistenza efficace.

L'intero processo descritto può essere ricondotto ad un modello cosiddetto a "zig-zag" schematizzato nella Figura 1.1 (Jones & Dangl, 2006).

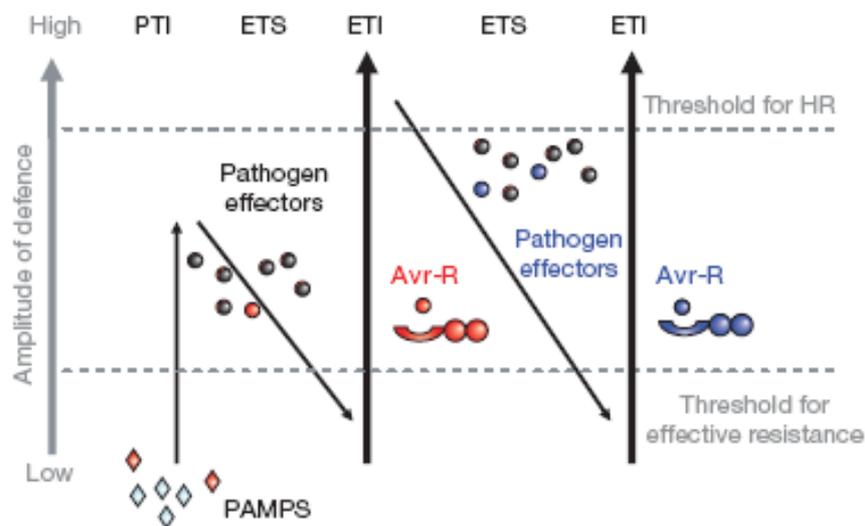


Figura 1-1: Sistema immunitario della pianta: modello a zigzag. Nella fase 1 la pianta riconosce i pattern molecolari associati al microrganismo o patogeno (MAMPs/ PAMPs, rombo rosso) per innescare la MAMP/PAMPs - triggered immunity (MTI/PTI). Nella fase 2 i patogeni virulenti rilasciano gli effettori che interferiscono con l' MTI/PTI con il risultato di portare alla suscettibilità innescata dagli effettori (ETS). Nella fase 3, un effettore (indicato in rosso) è riconosciuto da una proteina NB-LRR attivando l'immunità innescata dagli effettori (ETI). Questa è una versione amplificata della MTI/PTI che spesso oltrepassa la soglia della risposta di ipersensibilità (HR). Nella fase 4 i patogeni selezionati non producono più l'effettore rosso ma ne producono di altri tipi (in blu) attraverso un flusso genico orizzontale. Questo può aiutare il patogeno a superare l'ETI. Questa selezione naturale favorisce nuovi alleli NB-LRR delle piante che possono riconoscere uno dei nuovi effettori, ritornando nuovamente nell 'ETI.

La pianta difende se stessa attraverso due principali meccanismi: i) barriere fisiche che inibiscono l'ingresso del patogeno e la sua diffusione all'interno della pianta; ii) reazioni biochimiche nella cellula e nei tessuti della pianta che produce sostanze tossiche per il patogeno, o crea le condizioni per l'inibizione del patogeno. Per entrambe le strategie esistono meccanismi che possono essere già presenti costitutivamente nella pianta oppure possono subentrare al momento dell'infezione.

Le difese meccaniche pre-infezionali sono rappresentate da strutture capaci di impedire l'adesione e la penetrazione del patogeno, e la sua successiva colonizzazione dell'ospite (ad es. presenza e spessore della cuticola, presenza di cera, di peli, di stomi e lenticelle aventi forma, grandezza o posizione particolari, la struttura stessa della parete cellulare).

Altre modificazioni di tipo morfologico e strutturale possono svilupparsi nella pianta successivamente all'infezione, impedendo o rallentando la penetrazione del patogeno. Tra queste, vi sono: la formazione di tulle o di gomme contenenti tannini, la creazione di uno strato ligno-suberizzato nella parete cellulare e di strati di abscissione, la deposizione di gomma e infine la risposta nota come reazione di ipersensibilità (HR).

Le difese di natura biochimica pre-infezionali sono legate, invece, al rilascio di essudati fungitossici e di sostanze ad attività antifungina, sintetizzate precedentemente al tentativo di infezione, quali composti fenolici (acido caffeico, catecolo), glucosidi (saponine, glucosidi fenolici) e glucosinolati.

Le difese biochimiche post-infezionali consistono nella secrezione di sostanze prodotte *ex-novo*, oppure presenti prima dell'infezione ma in piccole quantità e successivamente indotte, come ad esempio i fenoli (attivi nella forma ossidata dalle fenolasi, fenolossidasi, perossidasi e polifenolossidasi), le fitoalessine, i sesquiterpeni, i ROS (specie reattive dell'ossigeno), le proteine PR (pathogenesis related proteins = proteine correlate alla patogenesi), etc. I ROS, che hanno un ruolo diretto come molecole antimicrobiche e come molecole segnale per attivare la reazione di ipersensibilità e resistenza sistemica, possono distruggere le membrane cellulari producendo perossidi lipidici e, nello stesso tempo, favorire reazioni che rafforzano le pareti cellulari. Le proteine PR sono proteine vegetali indotte da stress biotici e abiotici e comprendono enzimi (glucanasi, proteasi, perossidasi), inibitori di proteasi, proteine ricche in glicina o cisteina, osmotine e tarmatine. Nell'ambito di queste proteine risultano essere particolarmente interessanti le chitinasi e le glucanasi, enzimi che catalizzano rispettivamente l'idrolisi della chitina e dei  $\beta$ -glucani, ovvero i principali costituenti delle pareti cellulari della maggior parte dei funghi. Si ritiene che questi enzimi siano responsabili della lisi dell'apice ifale, con conseguente inibizione della crescita fungina e del rilascio di sostanze che elicitano le risposte di difesa della pianta (Sahai e Manocha, 1993).

Una caratteristica comune della resistenza delle piante alle malattie è la risposta ipersensibile (HR) nella zona di infezione, caratterizzata da una morte rapida e localizzata di cellule al sito di attacco, al fine di evitare l'accesso ai nutrienti e limitare la proliferazione del patogeno. Tale

reazione non è un semplice fenomeno di resistenza di tipo meccanico in quanto l'infezione viene bloccata anche nelle cellule lontane dal punto di infezione. Infatti, a seguito di questa risposta localizzata, il tessuto distale la zona di infezione sviluppa una resistenza sistemica acquisita (SAR) nei confronti di successive infezioni da parte dello stesso o di altri patogeni.

## 1.2 Scopo della tesi

Questo dottorato di ricerca si inserisce nell'ambito del progetto “Dottorato in azienda” ha previsto la collaborazione con la C.C.S. MED S.R.L. di Napoli, produttrice di bioformulati per l'agricoltura a base di microrganismi benefici. In particolare, i prodotti distribuiti sono costituiti da miscele di micorrize arbuscolari, batteri della rizosfera e funghi saprofiti.

Lo scopo di questo lavoro di dottorato è stato quello di implementare nuovi formulati a base di miscele microbiche ottenute dalle combinazioni dei prodotti commerciali Micosat Tab Plus WP (Tab) ed Micosat Len Plus WP (Len) della CCS Med, con ceppi fungini selezionati appartenenti al genere *Trichoderma* e/o suoi metaboliti secondari. Questi due prodotti commerciali sono costituiti da diverse specie di *Glomus* (*G. coronatum* ceppo GU 53, *G. caledonium* ceppo GM 24, *G. intraradices* ceppo GG 31, *G. mosseae* ceppo GP 11 e *G. viscosum* ceppo GC 41) e batteri rizosfera-competenti (*Bacillus subtilis* ceppo BA 41 e *Streptomyces* sp. ceppo SB 14). I due prodotti differiscono per la composizione in funghi saprofiti: il Tab contiene due diversi ceppi di *Trichoderma* (*T. harzianum* ceppo TH 01 e *T. viride* ceppo TV 03), mentre il Len contiene *Beauveria bassiana* ceppo BB 48 e *Pochonia chlamydosporia* ceppo PC 50.

Le nuove formulazioni ottenute con l'aggiunta dei ceppi di *Trichoderma* selezionati e/o loro metaboliti sono state valutate in termini di promozione di crescita e di biocontrollo su pomodoro e mais in esperimenti in serra ed in pieno campo. Inoltre, è stato analizzato il metaboloma dei ceppi di *Trichoderma* selezionati per la identificazione dei metaboliti secondari e delle proteine secreti nel mezzo di crescita per valutare l'utilizzo di queste molecole bioattive come componenti delle nuove miscele.

## 2 Materiali e metodi

### 2.1 Materiale fungino utilizzato negli esperimenti

I ceppi di *Trichoderma* utilizzati nel corso di questo lavoro sono stati:

- *T. harzianum* rifai T22 (ATCC® 20847™);
- *T. harzianum* ceppo TH1 (collezione micologica del laboratorio Lotta biologica del Dipartimento di Agraria dell'Università di Napoli "Federico II");
- *T. harzianum* ceppo K2 (collezione microbica della ABM™, sede di ricerca e sviluppo di Geneva NY USA);
- *T. harzianum* ceppo K3 (collezione microbica della ABM™, sede di ricerca e sviluppo di Geneva NY USA);
- *T. atroviride* ceppo K4 (collezione microbica della ABM™, sede di ricerca e sviluppo di Geneva NY USA);
- *T. viride* ceppo K5 (collezione microbica della ABM™, sede di ricerca e sviluppo di Geneva NY USA).

Tutti i funghi sono stati mantenuti e coltivati in piastre Petri di 90 mm su potato dextrose agar (PDA – Hi Media - Laboratories, Mumbai India). La coltivazione è stata mantenuta fino a completa sporulazione e le spore sono state raccolte utilizzando 10 ml di acqua distillata sterile, quindi filtrate per allontanare i residui di micelio, sciacquate con acqua distillata sterile, concentrate e conservate a -20° C in una soluzione di glicerolo 20% (v/v) fino al loro utilizzo.

I prodotti commerciali Micosat Tab Plus WP (Tab) ed Micosat Len Plus WP (Len) della CCS Med s.r.l., sono costituiti da diverse specie di *Glomus* (*G. coronatum* ceppo GU 53, *G. caledonium* ceppo GM 24, *G. intraradices* ceppo GG 31, *G. mosseae* ceppo GP 11 e *G. viscosum* ceppo GC 41) e batteri rizosfera-competenti (*Bacillus subtilis* ceppo BA 41 e *Streptomyces* sp. ceppo SB 14). I due prodotti differiscono per la composizione in della componente fungina (Tab contiene *T. harzianum* ceppo TH 01 e *T. viride* ceppo TV 03; Len contiene *Beauveria bassiana* ceppo BB 48 e *Pochonia chlamydosporia* ceppo PC 50).

## 2.2 Saggio *in serra* per la selezione dei ceppi *Trichoderma* per la formulazione delle miscele

È stato condotto un esperimento in serra in cui è stata valutata l'attività *in vivo* delle nuove miscele composte dai prodotti commerciali Tab e Len addizionati con diversi ceppi di *Trichoderma* descritti nel paragrafo precedente.

I propagoli fungini utilizzati per gli esperimenti *in vivo* (serra e pieno campo) sono stati prodotti attraverso fermentazione in stato solido su riso.

Le spore dei ceppi di *Trichoderma* spp., cresciuti in piastra petri per 7 giorni a 25°C sono raccolte con glicerolo al 20% (Sigma-Aldrich – St. Louis MO). Le sospensioni di spore (1 ml per ogni ceppo utilizzato) alla concentrazione di 10<sup>6</sup> unità formanti colonia/ml sono state inoculate in 100 ml di potato dextrose broth (PDB Hi Media - Laboratories, Mumbai India) e i ceppi sono stati cresciuti in agitazione a 25°C. Dopo 2 giorni le colture sono state inoculate su 500 g di riso sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti. Al termine della fermentazione su substrato solido (7 giorni), i propagoli cresciuti sul riso sono stati raccolti con glicerolo al 20% e le sospensioni di spore sono state mantenute a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

I saggi in serra sono stati effettuati su piante di pomodoro *Solanum lycopersicum* var. Docet allevate per 60 giorni in vasi dal diametro 12 cm con una capienza di 500 ml utilizzando come substrato di crescita una miscela 1:1 di torba e suolo naturale.

Il saggio è stato condotto seguendo lo schema sperimentale riportato in tabella 2.1. I trattamenti, in un volume finale di 50 ml, sono stati effettuati ogni 7 giorni dal momento dell'emergenza delle piante ed il primo trattamento è stato effettuato al momento della semina. Le dosi utilizzate per i trattamenti con Micosat sono state quelle consigliate nelle etichette dei prodotti della CCS Med

**Tabella 2-1: Schema sperimentale del saggio di selezione dei ceppi di *Trichoderma* effettuato in serra per la formulazione delle nuove miscele basate sulla combinazione con i prodotti commerciali Micosat. I trattamenti sono stati effettuati su un numero totale di 20 piante utilizzando per i trattamenti un volume finale di 50ml**

Trattamenti	dose di <i>Trichoderma</i> spp.	dose Micosat
Controllo (H <sub>2</sub> O)	0	0
T22	10 <sup>6</sup> spore/ml	0
TH1	10 <sup>6</sup> spore/ml	0
K2	10 <sup>6</sup> spore/ml	0
K4	10 <sup>6</sup> spore/ml	0
K5	10 <sup>6</sup> spore/ml	0
Tab	0	3g/L

Tab+T22	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L
Tab+TH1	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L
Tab+K2	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L
Tab+K4	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L
Tab+K5	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L
Len	0	3g/L
Len+T22	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L
Len+TH1	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L
Len+K2	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L
Len+K4	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L
Len+K5	10 <sup>6</sup> spore/ml	3g/L

Dopo 60 giorni dalla semina le piante sono state raccolte e sottoposte a valutazione degli indici biometrici (misura della lunghezza del fusto, della lunghezza delle radici e del peso fresco di fusto e radici).

### 2.3 Saggio *in campo* per la valutazione delle nuove miscele di Micosat e ceppi di *Trichoderma* selezionati

I ceppi di *Trichoderma* che hanno dato i migliori risultati in termini di promozione di crescita in combinazione con i due prodotti commerciali Micosat Tab e Len sono stati selezionati per essere saggiati in condizioni naturali di pieno campo. In quest'esperimento è stata valutata la resa produttiva delle piante trattate in termini di numero di frutti prodotti e peso dei frutti per ogni trattamento. Inoltre, è stata valutata la capacità di controllare l'attacco naturale di *Alternaria solani* misurando il livello di controllo in base all'incidenza della malattia.

È stato valutato anche l'effetto dei trattamenti sulla qualità dei frutti in termini di attività antiossidante, contenuto di carotenoidi e contenuto totale di solidi solubili nei frutti prodotti.

Il saggio è stato condotto presso l'azienda agricola Papale con sede in S. Maria Capua Vetere (Caserta) su piante di pomodoro della varietà Docet. Il saggio ha ricoperto la durata dell'intero ciclo colturale che nel meridione d'Italia ha una durata di circa 120 giorni. I primi trattamenti sono stati eseguiti a 15 giorni dal trapianto in pieno campo e sono continuati ogni 15 giorni fino al momento della raccolta dei frutti.

Il sesto d'impianto è stato costituito da file binate con una distanza tra le bine di circa 50 cm, una distanza tra le file di circa 120 cm e una lunghezza media delle file di circa 110 m. Ogni bina del campo è stata destinata ad un trattamento diverso ed i trattamenti, con un volume finale di 100 L,

sono stati effettuati per irrigazione a goccia in ali gocciolanti posizionate tra le 2 bine della fila. Le dosi di Micosat utilizzate per gli esperimenti in campo sono quelle consigliate per la fertirrigazione e riportate nelle etichette dei prodotti (0,5 g/m<sup>2</sup> - 0,3 g/L).

Le dosi di *Trichoderma* adoperate per questo esperimento sono state di 1x10<sup>5</sup> spore/ml in modo da rispettare lo stesso rapporto tra le dosi dei due componenti delle miscele utilizzate nel saggio in serra.

I trattamenti effettuati sono schematizzati nella tabella 1.2.

**Tabella 2-2: Schema sperimentale del saggio per la valutazione delle nuove miscele di Micosat e *Trichoderma* spp. in pieno campo. I trattamenti sono stati effettuati con le dosi descritte in tabella sulle file binate utilizzando un volume finale di 100 L**

<b>Trattamenti</b>	<b>dose di <i>Trichoderma</i> spp.</b>	<b>dose di Micosat</b>
Controllo	0	0
T22	10 <sup>5</sup> spore/ml	0
K2	10 <sup>5</sup> spore/ml	0
K4	10 <sup>5</sup> spore/ml	0
Tab	0	0,3g/L
Len	0	0,3g/L
Tab+T22	10 <sup>5</sup> spore/ml	0,3g/L
Tab+K4	10 <sup>5</sup> spore/ml	0,3g/L
Len+T22	10 <sup>5</sup> spore/ml	0,3g/L
Len+K2	10 <sup>5</sup> spore/ml	0,3g/L

Alla fine del ciclo colturale è stata valutata la resa produttiva campionando all'interno della fila 20 piante per ogni trattamento, delle quali sono stati contati e pesati i frutti prodotti.

#### **2.4 Valutazione dell'incidenza del patogeno *Alternaria solani* sui frutti di pomodoro prodotti nell'esperimento in campo.**

È stata effettuata una valutazione visiva dei sintomi prodotti da un'infezione naturale di *Alternaria solani* descritti da Agrios (2005) sui frutti delle piante campionate nell'esperimento in campo. L'incidenza della malattia è stata calcolata come rapporto tra il numero di frutti che presentavano sintomi ed il numero totale di frutti prodotti dalla pianta.

## 2.5 Analisi qualitativa dei frutti prodotti

### 2.5.1 Quantificazione del contenuto di solidi solubili

È stata effettuata una quantificazione del contenuto totale dei solidi solubili all'interno dei frutti di pomodoro prodotti. Questi sono stati misurati attraverso il rifrattometro ottico (Atago). La sostanza secca (%) è stata ottenuta tramite essiccazione in stufa ventilata a 70° C fino all'ottenimento di un peso costante. I risultati sono riportati come °Brix a 20° C e sono calcolati come media di tre repliche per ogni trattamento. Ogni replica è costituita da un raggruppamento casuale di 3 frutti di pomodoro raccolti per ogni trattamento.

### 2.5.2 Quantificazione del contenuto di carotenoidi

Per ogni trattamento sono stati omogenizzati 3 pomodori interi. I 5 ml di succo ottenuto sono stati estratti con 3 volumi di una soluzione di acetone ed esano (1:1 v/v). Gli estratti quindi sono stati centrifugati ed il surnatante raccolto è stato seccato tramite roto - evaporazione sotto vuoto a 35°C (Thermo-Savant) ed è stato ridisciolti in 1 ml di una soluzione composta dal 40% Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN), 20% metanolo (MeOH), 20% esano, e 20% diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

La quantificazione dei carotenoidi è stata ottenuta attraverso analisi HPLC degli estratti per comparazione con le rette di taratura ottenute dall'analisi degli standard di licopene e β-carotene (Fluka).

Il metodo di separazione cromatografica utilizzato è stato quello descritto da Leonardi et al.(2000).

### 2.5.3 Misura dell'attività antiossidante

La quantificazione dell'attività antiossidante è stata ottenuta secondo quanto descritto da Pellegrini et al. (2003). 19,2 mg del sale di ammonio del 2-2'-azinobis-(acido 3-etilenbenzotiazoline-6-sulfonico) (ABTS) sono stati aggiunti a 5 mL di acqua grado HPLC ottenendo una concentrazione finale pari a 7 mM. A questa soluzione sono stati aggiunti 88 µL di una soluzione acquosa 140 mM di persolfato di potassio e il preparato così ottenuto è stato conservato a 4° C al buio per almeno 6 ore, in modo da raggiungere un valore stabile di assorbanza. Tale preparato al momento dell'analisi è stato diluito con etanolo (~1:88), ottenendo

così il cromogeno utilizzato per l'analisi dei campioni, ed ha mostrato un'assorbanza pari a  $0.700 \pm 0.100$  nm. Il bianco è stato preparato con 1 mL di cromogeno e da 100  $\mu$ L di etanolo.

Per l'analisi spettrofotometrica, sono stati prelevati 1 ml di cromogeno e 100  $\mu$ l di campione diluito.

Ogni campione è stato analizzato in triplicato. È stata misurata l'assorbanza a 734 nm dopo 2.5 minuti dalla preparazione della suddetta soluzione (Uvikon 930-Kontron Instrument).

La retta di taratura per l'ABTS è stata costruita utilizzando come standard liofilo il Trolox, cioè l'analogo idrosolubile dell' $\alpha$ -tocoferolo.

L'attività antiossidante è calcolata per confronto con la relativa retta di taratura (Trolox standard) ed è espressa in mmol equivalenti di Trolox.

## 2.6 Saggio in serra per la valutazione dell'attività delle nuove miscele di *Trichoderma* spp. e i prodotti commerciali Micosat sullo sviluppo di *Phelipanche ramosa*.

Le miscele, costituite dai ceppi di *Trichoderma* spp. selezionati nell'esperimento in serra (paragrafo 2.2) ed i prodotti commerciali Micosat, sono state saggiate in un esperimento in serra su piante di pomodoro della varietà Docet in cui è stato valutato l'effetto dei trattamenti sullo sviluppo della pianta parassita *Phelipanche ramosa*.

Ogni condizione adottata nell'esperimento è stata costituita da 10 repliche e lo schema sperimentale è stato sintetizzato nella tabella 2.3. I trattamenti sono stati effettuati ogni 7 giorni a partire dalla data del trapianto con un volume finale di 50 ml per pianta con le stesse dosi utilizzate nel precedente esperimento in serra (vedi paragrafo 2.2).

**Tabella 2-3: Schema sperimentale del saggio per la valutazione delle nuove miscele di Micosat e *Trichoderma* spp. sullo sviluppo di *P. ramosa* in serra. I trattamenti sono stati effettuati con le dosi descritte in tabella su un numero totale di 10 repliche per condizione.**

Trattamenti	dose di <i>Trichoderma</i>	dose di Micosat
Controllo H <sub>2</sub> O	0	0
Controllo <i>P. ramosa</i>	0	0
T22	10 <sup>6</sup> spore/ml	0
K2	10 <sup>6</sup> spore/ml	0
K4	10 <sup>6</sup> spore/ml	0
Tab	0	0,3g/L
Len	0	0,3g/L
Tab+T22	10 <sup>6</sup> spore/ml	0,3g/L

Tab+K4	10 <sup>6</sup> spore/ml	0,3g/L
Len+T22	10 <sup>6</sup> spore/ml	0,3g/L
Len+K2	10 <sup>6</sup> spore/ml	0,3g/L

Le piante sono state fatte germinare in vassoi di polistirolo alveolato e sono state trapiantate dopo una settimana dall'emergenza in vasi da 12 cm con una capienza di 500 ml di suolo.

Il substrato di crescita utilizzato per le piante è stato una miscela 1:1 di sabbia e torba. Al momento del trapianto, le piante sono state inoculate con semi di *P. ramosa* (20 mg/pianta) precedentemente preconditionati secondo il metodo descritto da Zhou et al. (2004). Dopo circa 30 giorni dall'emergenza di *P. ramosa* le piante sono state raccolte e per ogni pianta sono stati contati il numero di turioni emersi, il numero di tubercoli che attaccavano le radici delle piante ospite ed inoltre sono stati valutati gli indici biometrici delle piante di pomodoro, misurando peso fresco di fusto e radici.

## 2.7 Isolamento e caratterizzazione dei principali metaboliti secondari dei ceppi "K" di *Trichoderma* spp.

I ceppi di *Trichoderma* spp. caratterizzati per la produzione di metaboliti secondari rilasciati nel mezzo di crescita sono stati: *T. harzianum* ceppo K2; *T. harzianum* ceppo K3; *T. atroviride* ceppo K4 e *T. viride* ceppo K5. Piastre da 100 mm di diametro di ogni specie di *Trichoderma* in crescita attiva sono state inoculate in beute da 5 L contenenti 1,5 L di PDB (HiMedia Laboratories, Mumbai India).

Le specie di *Trichoderma* sono state incubate per 30 giorni a 25° C in coltura statica. La coltura è stata filtrata mediante pompa da vuoto attraverso carta Whatman 3MM-CHR (Whatman, Brentford, UK). Il filtrati culturali ottenuti dai 4 ceppi di *Trichoderma* sono stati estratti esaustivamente con acetato di etile (EtOAc). Le frazioni organiche raccolte sono state unite e anidificate con l'aggiunta di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Successivamente il solvente è stato allontanato mediante evaporazione a pressione ridotta.

Il residuo secco dei ceppi K2 (435mg), K3 (378mg), K4 (365mg) e K5, (415mg) sono stati rispettivamente sottoposti ad analisi cromatografia su colonna a pressione atmosferica, (Si gel; 50 g Merck, Kiesegel 60, 0.063 - 0.2 µm) ed eluite con un gradiente di Etere di petrolio : EtOAc da 8:2 v/v a 1:1 v/v. Le frazioni raccolte sono state analizzate mediante cromatografia su strato sottile (TLC) (Si gel, Kiesel gel 60, GF254 di 0,25 mm, Merck, Darmstadt; Germany)

eluite con Etere di petrolio : EtOAc in rapporto 8:2 v/v e rilevate per irraggiamento con lampada UV (254nm). Le frazioni che mostravano lo stesso profilo sono state riunificate.

Le frazioni “pure” più abbondanti (6 e 7) isolate dall’estratto secco del ceppo K2 sono state sottoposte ad analisi NMR. Gli spettri <sup>1</sup>H sono stati registrati con un Bruker Avance 400 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) operante a 400 (<sup>1</sup>H) MHz, e i picchi ottenuti dai solventi deuterati sono stati utilizzati come standard di riferimento.

La frazione n. 2 isolate dai ceppi K3, K4 e K5 sono state sottoposte ad analisi di spettrometria di massa con lo strumento Agilent LCMS/MS QTOF 6540 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) per infusione diretta nella sorgente di ionizzazione ESI (Electrospray ionization).

I filtrati culturali dei ceppi K4 e K5 inoltre sono stati analizzati con HPLC utilizzando la colonna Agilent RP18 LiChrospher® 100 RP-18 (4,5x10mm) con lo strumento Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e i profili cromatografici sono stati comparati con quelli ottenuti dallo standard di 6PP (Sigma - St.Louis MO) per una quantificazione accurata. Il metodo cromatografico utilizzato è stato un gradiente lineare di 30 min 80% A (0,1% di acido formico) a 20% B (CH<sub>3</sub>CN 0,1% acido formico). Il picco di 6PP rilevato nella corsa cromatografica dello standard è stato eluito al min 19.2.

## **2.8 Saggio in serra per la valutazione degli effetti *in-vivo* dei metaboliti secondari di *Trichoderma* spp. e delle loro miscele con i prodotti commerciali Micosat.**

Sono stati condotti degli esperimenti in serra in cui sono stati valutati gli effetti di promozione di crescita dei metaboliti secondari di *Trichoderma* spp. e delle loro miscele con i prodotti commerciali Micosat su piante di pomodoro della varietà Docet. 20 piante per ogni condizione considerata sono state allevate per 30 giorni in vassoi di polistirolo alveolato in cui ogni alveolo aveva una capienza di 50 ml. Il substrato di crescita utilizzato per allevare le piante è stato una miscela di torba e suolo di campo 1:1 v/v. I metaboliti secondari utilizzati in quest’esperimento sono stati:

- 6PP, purificato dal ceppo di *T. viride* K5;
- acido harzianico (HA) isolato dal ceppo M10 di *T. harzianum* (Vinale et al., 2009);
- ed il metabolita secondario volatile (VOC) di *Trichoderma* spp. 1-octen-3-olo (98%, ACROS Organics™).

Tutti i trattamenti sono stati effettuati ogni 7 giorni con un volume finale di 5 ml. I metaboliti secondari sono stati applicati in soluzione acquosa alla concentrazione 1  $\mu\text{M}$  e i prodotti commerciali Micosat sono stati applicati ad una dose di 3 g/L.

Lo schema dei trattamenti è stato riassunto nella tabella 2.4.

**Tabella 2-4: Schema sperimentale del saggio di promozione di crescita effettuato in serra dei metaboliti secondari di *Trichoderma* spp. e delle loro combinazioni con i prodotti commerciali Micosat (Tab e Len). Nelle colonne sono riportati l'elenco dei trattamenti con le rispettive concentrazioni e dosi.**

<b>Trattamenti</b>	<b>Concentrazione metabolita</b>	<b>dose di Micosat</b>
Controllo H <sub>2</sub> O	0	0
1-octen-3-olo	1 $\mu\text{M}$	0
6PP	1 $\mu\text{M}$	0
HA	1 $\mu\text{M}$	0
Tab	0	0,3g/L
Len	0	0,3g/L
Tab+1-octen-3-olo	1 $\mu\text{M}$	0,3g/L
Tab+6PP	1 $\mu\text{M}$	0,3g/L
Tab+HA	1 $\mu\text{M}$	0,3g/L
Len+1-octen-3-olo	1 $\mu\text{M}$	0,3g/L
Len+6PP	1 $\mu\text{M}$	0,3g/L
Len+HA	1 $\mu\text{M}$	0,3g/L

Dopo 30 giorni le piante sono state raccolte e per ognuna sono stati misurati i pesi freschi di fusto e radici.

## **2.9 Isolamento e caratterizzazione delle proteine dei ceppi "K" di *Trichoderma* spp. secrete nel mezzo di crescita.**

È stata valutata la produzione di proteine dei ceppi *T. harzianum* K2; *T. harzianum* K3; *T. atroviride* K4 e *T. viride* K5 secrete nel substrato durante la crescita in agitazione in mezzo liquido salino (SM). Dopo 7 giorni le colture liquide sono state filtrate con carta Whatman 3MM-CHR (Whatman, Brentford, UK) ed i mezzi liquidi sottoposti ad agitazione con imbuto separatore hanno prodotto una abbondante schiuma persistente. Le schiume sono state quindi raccolte con etanolo (EtOH) al 70%.

È stata effettuata la quantificazione delle proteine all'interno delle schiume estratte con il lettore di piastre a 96 pozzetti Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader utilizzando il kit di quantificazione CBQCA (Molecular Probe – Invitrogen Thermo Fisher Scientific Waltham MA). La quantificazione è stata effettuata per comparazione con la retta di taratura ottenuta

mediante diluizioni seriali dello standard di BSA (sieroalbumina bovina Thermo Fisher Scientific).

Le schiume estratte sono state quindi sottoposte a caratterizzazione proteomica con spettrometria di massa nano-LCMS/MS con lo strumento Orbitrap Elite™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap (Thermo Scientific™ - Whaltam MA).

10 µg di ogni campione di proteine estratto sono stati essiccati a pressione ridotta in una Savant™ SPD131DDA SpeedVac™ Concentrator e sono stati sottoposti a denaturazione dissolvendo i campioni secchi in 30 µl di una soluzione di guanidina 6 M in 50 mM Tris HCl pH 8. Dopo la denaturazione i campioni sono stati sottoposti a reazioni di riduzione e alchilazione. La riduzione è stata effettuata per aggiunta di 3µl 110mM DTT in 50 mM Tris HCl pH 8 e sono stati quindi incubati a 60° C per 60 minuti. La reazione di alchilazione è stata ottenuta aggiungendo 3,5 ml 0,6 M di Iodoacetammide (IAM) in 50 mM Tris HCl pH 8 ed i campioni sono stati ulteriormente incubati per 60 minuti al buio a temperatura ambiente. L'azione della IAM è stata quindi definitivamente bloccata dall'aggiunta di 2 µl di DTT 0,5 M ed è stata effettuata un'ulteriore incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni proteici denaturati sono stati sottoposti a digestione triptica per aggiunta dell'enzima Tripsina in rapporto 1:10 v/v con le proteine digerite. La digestione è stata eseguita a 37° C per 16 ore e la reazione è stata bloccata per aggiunta di 0,5 % di acido formico.

I campioni digeriti sono stati desalificati e concentrati attraverso un passaggio in colonne di silice a fase inversa C18 per l'estrazione in fase solida (SPE) (Waters SEP-PAK 1cc). I passaggi di eluizione hanno previsto un lavaggio con 7 ml di 0,1% di TFA (acido trifluoroacetico) e l'eluizione è stata eseguita con 1,2 ml di CH<sub>3</sub>CN al 50% con 0,1 di TFA.

I campioni così digeriti sono stati quindi sottoposti a cromatografia nanoLC effettuata con lo strumento Dionex UltiMate® 3000 Nano LC ed il metodo cromatografico utilizzato è stato un gradiente lineare di 90 minuti dal 5 % al 38 % di B. Le fasi mobili sono state: A 2% di H<sub>2</sub>O con lo 0,1% di acido formico e B 95% di CH<sub>3</sub>CN con lo 0,1% di acido formico.

Il metodo MS/MS utilizzato è stato uno scan CID (Collision Induced Dissosiation) con metodo di ionizzazione positiva (Positive Ion Mode) e l'intervallo di massa scelto è stato 375-1800 m/z.

Gli spettri di massa ottenuti sono stati analizzati con il Software Mascot versione 2.5.1 ed il tipo di ricerca effettuata è stata l'MS/MS Ion search. I risultati sono stati confrontati con il database delle proteine di *Trichoderma* di NCBI v.20150618 contenente 67101 proteine. I parametri di ricerca selezionati sono stati: un massimo numero di siti di taglio mancati pari a 2; alchilazione

delle cisteine mediante carbamidometilazione (C) scelta come possibile modificazione fissa della proteina e deamidazione (NQ) e ossidazione (M) come possibili modificazioni variabili. Inoltre, è stata utilizzata una tolleranza massima di 10 ppm per l'identificazione MS dei peptidi e 0,8 ppm come tolleranza massima per i frammenti MS/MS ottenuti dal CID.

I risultati sono stati filtrati scegliendo le proteine che presentavano almeno 2 peptidi unici, un *protein score*  $\geq$  di 100 ed un valore di abbondanza relativa maggiore di 1, espresso come molar %, trasformazione molare del valore (Ishihama et al., 2005).

## 2.10 Saggio in serra per la caratterizzazione dell'attività in vivo delle miscele proteiche isolate da *Trichoderma* spp. in termini di promozione di crescita su piante di mais.

Le miscele proteiche estratte dai ceppi di *Trichoderma* "K" sono state saggiate in vivo su piante ibride di mais con destinazione di utilizzo mista (insilato/granella) (Blue River Hybrids Organic Seeds). I trattamenti sono stati effettuati per confettatura dei semi. I trattamenti, costituiti da diluizioni seriali delle soluzioni proteiche estratte dai ceppi "K", sono stati effettuati su 15 semi con una quantità di soluzione pari al 3% w/v. Le concentrazioni delle soluzioni proteiche utilizzate sono state 100ppm; 10ppm; 1ppm; 0,1ppm.

Le piante sono state allevate in serra in vasi dalla capienza di 2,83 litri (altezza 35,56cm; larghezza 10,1cm) ed il substrato di crescita utilizzato è stato una miscela di torba e suolo naturale in rapporto 1:1. In ogni vaso sono state seminate 3 piante per un totale di 15 piante divise in 5 vasi per ogni condizione considerata.

Lo schema sperimentale dei trattamenti è riassunto nella tabella 2.5

Tabella 2-5: Schema sperimentale del saggio di promozione di crescita effettuato in serra con le miscele proteiche estratte dai ceppi di *Trichoderma* "K". In tabella sono riportati i trattamenti con le concentrazioni utilizzate.

Trattamenti	Concentrazione delle soluzioni proteiche
controllo	
HPK2	100ppm
	10ppm
	1ppm
	0,1ppm
HPK3	100ppm
	10ppm
	1ppm
	0,1ppm

	100ppm
	10ppm
HPK4	1ppm
	0,1ppm
<hr/>	
	100ppm
	10ppm
HPK5	1ppm
	0,1ppm

Gli effetti di promozione di crescita sono stati valutati misurando il peso fresco di fusto e radici. Inoltre è stato valutato il contenuto di clorofilla delle foglie con lo strumento Minolta SPAD 502 Chlorophyll meter effettuando le misurazioni sulla parte mediana dell'ultima foglia estesa.

### 2.11 Saggio in serra per la valutazione dell'attività *in-vivo* della miscela proteica del ceppo "K5" e della suo combinazione co i prodotti commerciali Micosat.

È stata valutato l'effetto di promozione di crescita della miscela proteica purificata dal ceppo "K5" applicata alla concentrazione più efficace (0,1ppm) e della sua combinazione con i prodotti commerciali Micosat in un esperimento in serra. Per ogni trattamento sono state coltivate 20 piante di mais in vasi da 12 cm di diametro con una capienza di 500ml ed il substrato di crescita utilizzato è stata una miscela di torba e suolo naturale. Le miscele proteiche sono state applicate sia per confettatura dei semi sia per irrigazione con un volume finale di 50 ml ogni 7 giorni, a partire dal momento dell'emergenza delle piante. I trattamenti con Micosat Tab e Len sono stati effettuati ogni 7 giorni, alla dose di 3g/L, con un volume finale di 50 ml per pianta, sia quando sono state effettuate applicazioni individuali dei prodotti commerciali, sia quando sono stati applicati in miscela con la miscela proteica di "K5". Dopo 30 giorni le piante sono state raccolte e sono stati valutati gli effetti di promozione di crescita delle piante misurando il peso fresco di fusto e radici.

### 2.12 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati biometrici è stata eseguita con il software R studio versione 0.99.473 utilizzando il pacchetto "Agricolae". Il tipo di analisi effettuata è stata l'LSD test con correzione di Bonferroni e sono stati considerati significativi valori di pvalue<0,05.

### 3 Risultati

#### 3.1 Selezione di ceppi di *Trichoderma* spp. per le nuove miscele con Micosat F Tab Plus e Len Plus.

Sospensioni sporiche di cinque diversi ceppi fungini appartenenti al genere *Trichoderma* sono state miscelate con i prodotti Micosat F Tab Plus (primo esperimento) e Len Plus (secondo esperimento) per selezionare le migliori combinazioni possibili. La selezione è stata effettuata in serra valutando gli effetti di promozione di crescita *in vivo* su piante di pomodoro della varietà Docet.

Sono stati quindi misurati l'altezza del fusto, la lunghezza delle radici ed il peso fresco di fusto e radici. Per tutte le sperimentazioni è stata effettuata una valutazione statistica dei dati per dimostrare la significatività delle prove.

I risultati del primo esperimento sono riportati nei seguenti istogrammi (Figure: 3.1; 3.2; 3.3; 3.4).

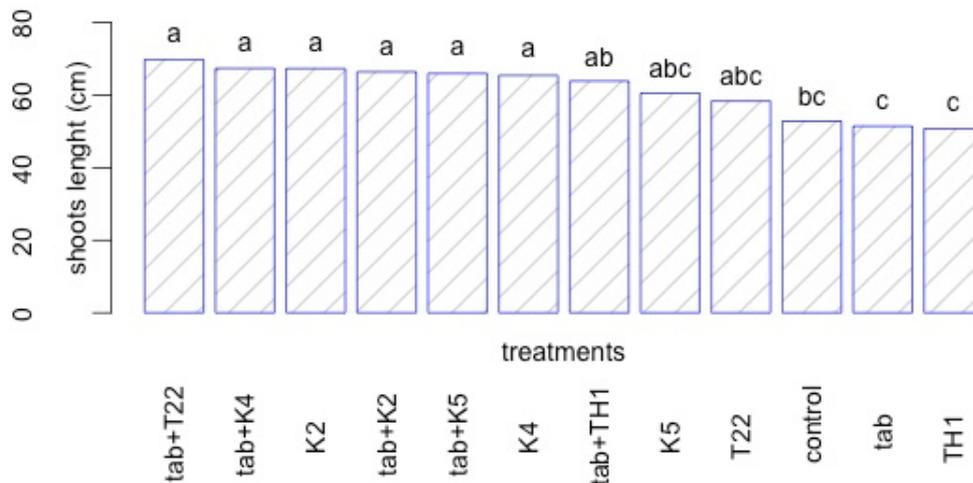


Figura 3-1: Il grafico mostra le differenze di lunghezza del fusto, espresse in centimetri (cm), delle piante trattate con Micosat F Tab Plus (tab) e con i diversi ceppi di *Trichoderma* (T22, K2, K4, K5, TH1) applicati singoli e in combinazione. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

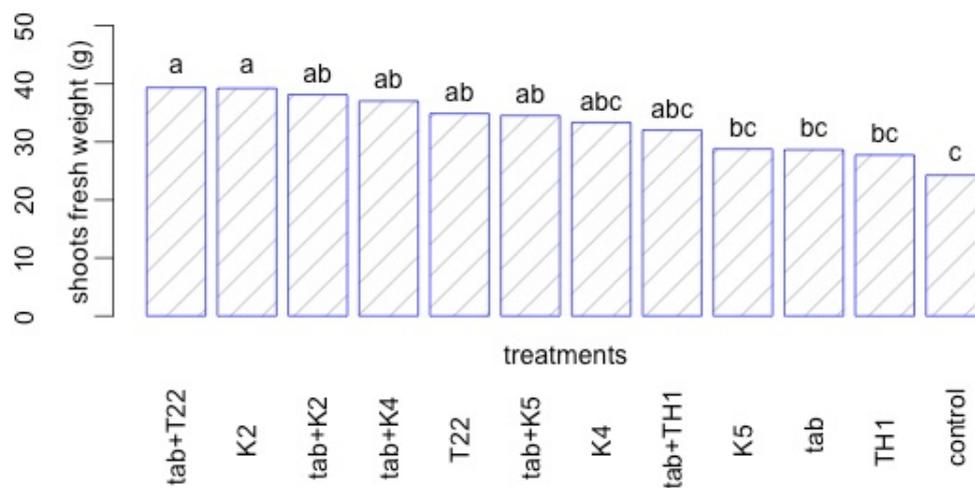


Figura 3-2: Il grafico mostra le differenze di peso fresco del fusto, espresse in grammi (g), delle piante trattate con Micosat F Tab Plus (tab) e con i diversi ceppi di *Trichoderma* applicati singoli e in combinazione. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

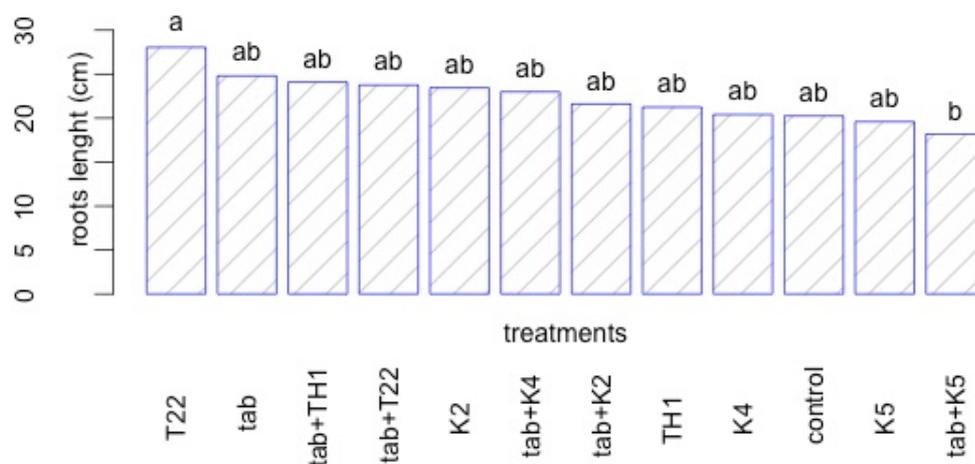


Figura 3-3: Il grafico mostra le differenze di lunghezza delle radici espresse in centimetri (cm), delle piante trattate con Micosat F Tab Plus (tab) e con i diversi ceppi di *Trichoderma* applicati singoli e in combinazione. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

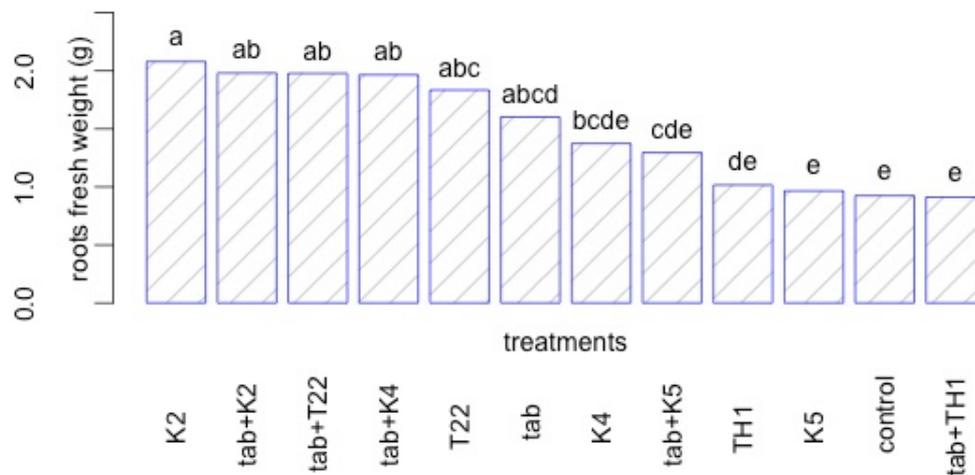


Figura 3-4: Il grafico mostra le differenze di peso fresco delle radici, espresse in grammi (g), delle piante trattate con Micosat F Tab Plus (tab) e con i diversi ceppi di *Trichoderma* applicati singoli e in combinazione. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

Il primo esperimento ha mostrato che tutte le nuove miscele hanno determinato un incremento significativo dei parametri analizzati. In particolare, le maggiori differenze sono state rilevate per i pesi freschi di fusto e radici. I trattamenti più efficaci, per questi due parametri, sono stati ottenuti con la combinazione di Tab con *T. harzianum* T22 e con i ceppi K2 e K4. Questi trattamenti hanno prodotto un aumento del peso fresco di fusto e radici, sia rispetto alle piante controllo trattate con acqua, sia rispetto al prodotto commerciale applicato singolarmente.

Nel secondo esperimento sono state analizzate le combinazioni dei ceppi di *Trichoderma* con il prodotto commerciale, Micosat F Len Plus, valutando gli effetti sulla promozione della crescita del pomodoro. I risultati sono riportati nei seguenti istogrammi (Figure 3.5; 3.6; 3.7; 3.8).

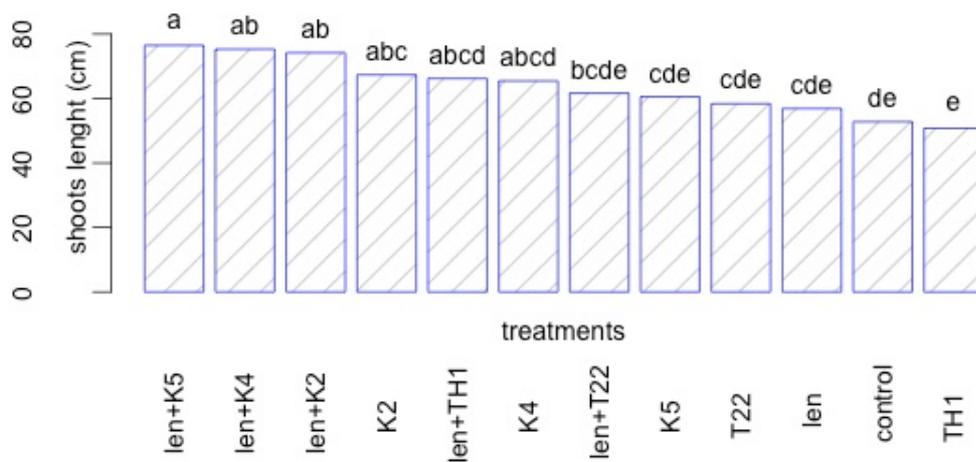


Figura 3-5: Il grafico mostra le differenze di lunghezza del fusto, espresse in centimetri (cm), delle piante trattate con Micosat F Len Plus(len) e con i diversi ceppi di *Trichoderma* applicati singoli e in combinazione. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

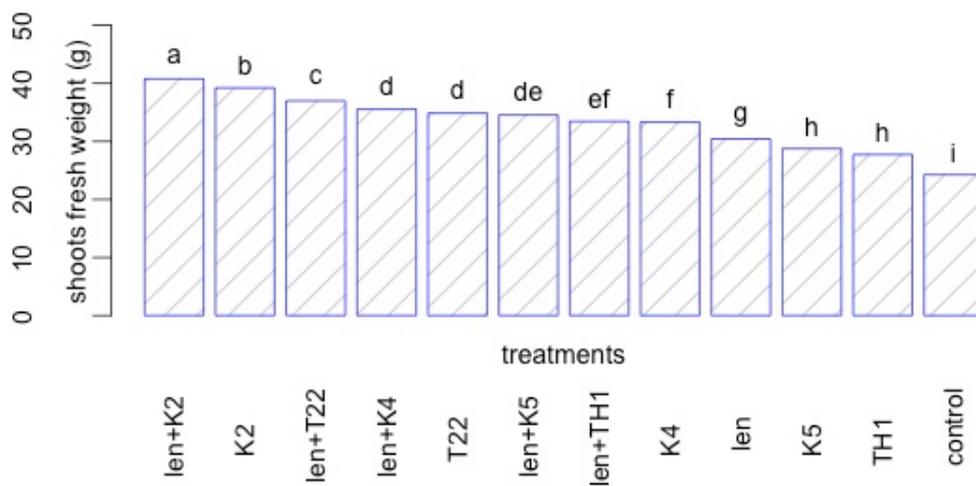


Figura 3-6: Il grafico mostra le differenze di peso fresco del fusto, espresse in grammi (g), delle piante trattate con Micosat F Len Plus(len) e con i diversi ceppi di *Trichoderma* applicati singoli e in combinazione. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

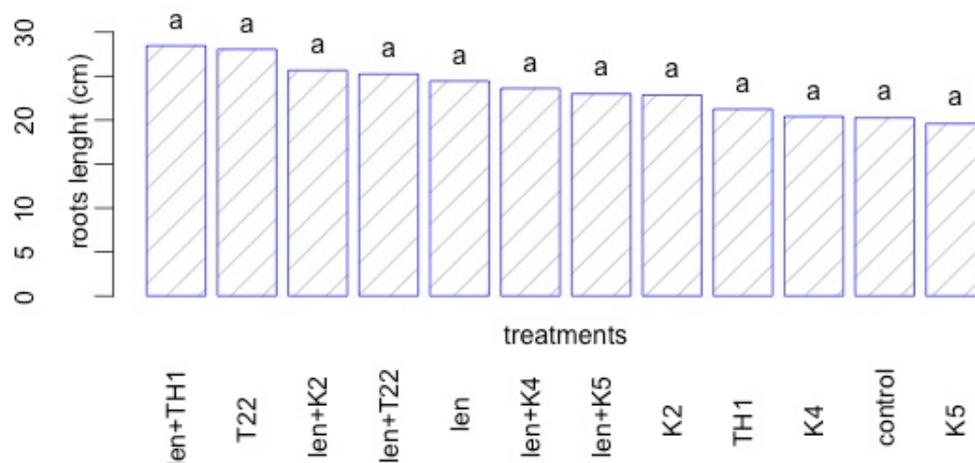


Figura 3-7: Il grafico mostra le differenze di lunghezza delle radici espresse in centimetri (cm), delle piante trattate con Micosat F Tab Plus (tab) e con i diversi ceppi di *Trichoderma* applicati singoli e in combinazione. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

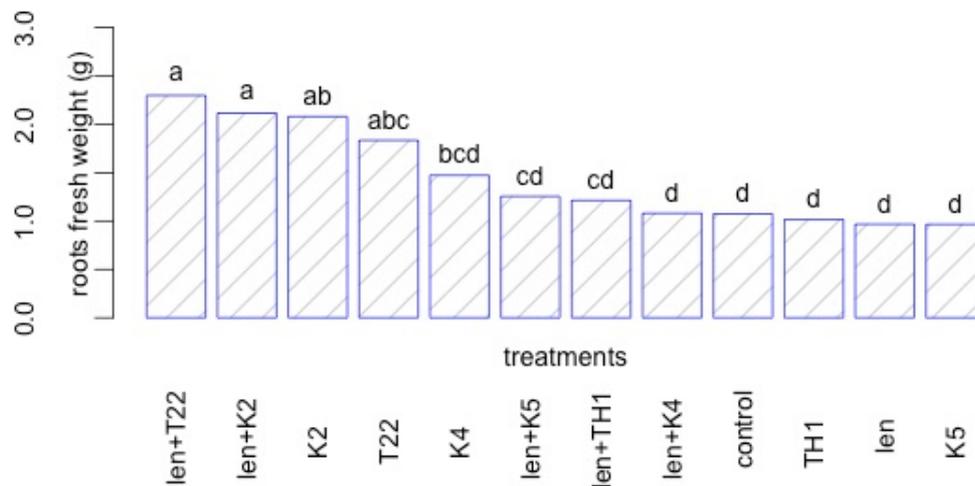


Figura 3-8: Il grafico mostra le differenze di peso fresco delle radici, espresse in grammi (g), delle piante trattate con Micosat F Len Plus(len) e con i diversi ceppi di *Trichoderma* applicati singoli e in combinazione. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

Diversamente da quanto evidenziato nell'esperimento di combinazione con il Micosat Tab, l'applicazione del solo Micosat Len non ha prodotto differenze significative rispetto alle piante controllo trattate con sola acqua. I trattamenti più efficaci in questo esperimento sono stati quelli

con Len addizionato di *T. harzianum* T22 e *T. harzianum* K2. Queste miscele hanno prodotto differenze significative soprattutto sull'incremento della biomassa delle piante trattate aumentando il peso fresco di fusto e radici rispetto sia all'applicazione del prodotto commerciale applicato singolarmente, sia a quella dei singoli ceppi di *Trichoderma*.

### 3.2 Effetti di trattamenti su piante di pomodoro in campo delle miscele selezionate e dei loro singoli componenti

#### 3.2.1 Effetto dei trattamenti con le miscele selezionate, e dei loro singoli componenti sulla resa produttiva.

Le nuove combinazioni di Micosat F Tab Plus e Micosat F Len Plus con i ceppi di *Trichoderma* selezionati nell'esperimento in serra sono state successivamente saggiate in un esperimento in pieno campo su piante di pomodoro della varietà Docet con l'obiettivo di valutare l'effetto sulle rese produttive di questa varietà. A tale scopo gli indici considerati sono stati sia il numero di frutti sia il peso totale degli stessi per pianta campionata. I risultati sono riportati nei seguenti istogrammi (Figura 3.9; 3.10)

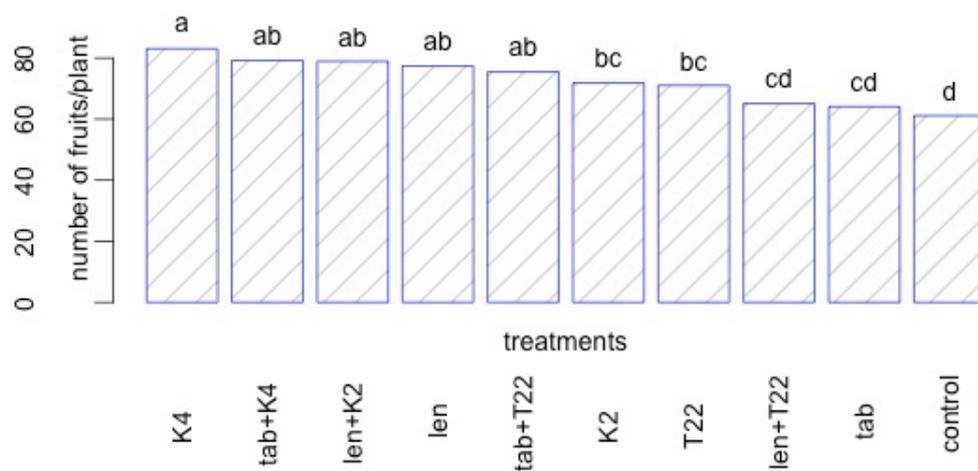


Figura 3-9: Effetti delle nuove miscele basate sui prodotti commerciali Micosat Tab e Len con i ceppi *Trichoderma* selezionati sulla resa produttiva di pomodoro in campo, in termini di numero di frutti prodotti per pianta. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$ .

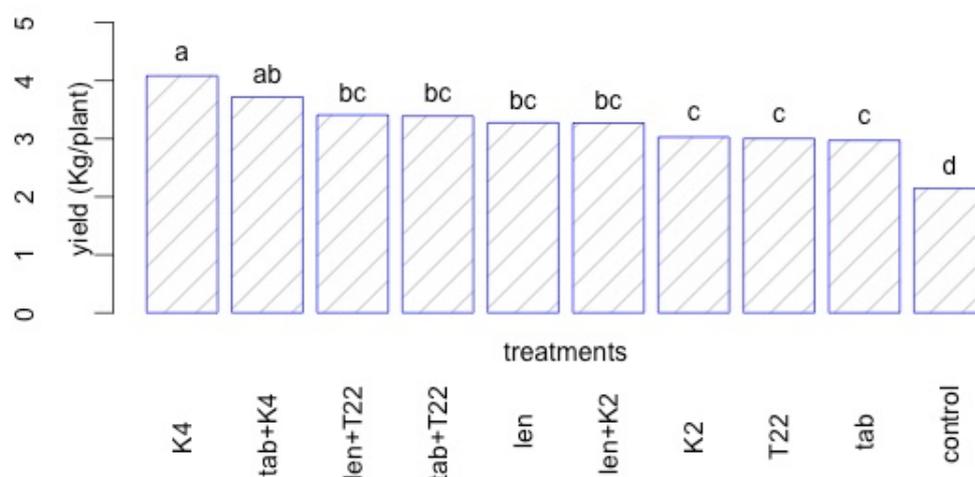


Figura 3-10 Effetti delle nuove miscele basate sui prodotti commerciali Micosat Tab e Len con i ceppi *Trichoderma* selezionati sulla resa produttiva di pomodoro in campo, in termini di numero di peso totale dei frutti prodotti per pianta (Kg). Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

Tutti i trattamenti sono riusciti ad incrementare significativamente la resa produttiva in termini di Kg di pomodori prodotti da ogni pianta. Nelle condizioni di pieno campo i risultati migliori sono stati ottenuti con il ceppo di *T. atroviride* K4. La combinazione di “K4” con “Tab” si è dimostrata la miscela più efficace, aumentando significativamente la resa produttiva anche rispetto all’applicazione del prodotto singolo. Tutte le altre miscele saggate invece non hanno prodotto risultati statisticamente significativi rispetto all’applicazione dei singoli componenti.

### 3.2.2 Effetto dei trattamenti con le miscele selezionate, e dei loro singoli componenti sulla qualità dei frutti prodotti.

Le nuove miscele selezionate sono state valutate per la loro capacità di influenzare la qualità della produzione. A tale scopo sono state condotte delle analisi sui principali parametri qualitativi dei frutti valutando le differenze tra le piante controllo trattate con acqua, le miscele delle due linee di Micosat, “Tab” e “Len” addizionate con i ceppi di *Trichoderma* selezionati e i rispettivi componenti singoli, in termini di: contenuto totale di solidi solubili, attività antiossidante degli estratti e contenuto di licopene e  $\beta$ -carotene.

Il primo parametro considerato è stato il contenuto totale di solidi solubili misurato mediante analisi rifrattometrica ed i risultati sono stati espressi come °Brix (Figura 3.11)

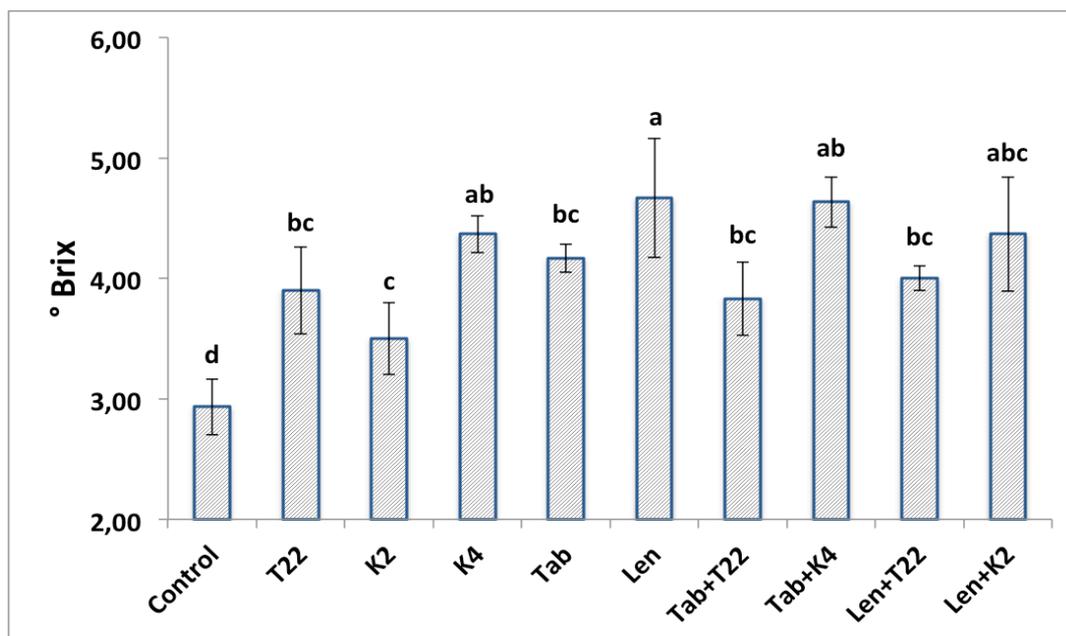


Figura 3-11: Effetti delle nuove miscele basate sui prodotti commerciali Micosat Tab e Len con i ceppi *Trichoderma* selezionati sulla qualità dei frutti di pomodoro prodotti nell'esperimento in campo, in termini di contenuto totale di solidi solubili espressi come °Brix. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

Tutti i trattamenti hanno mostrato un maggiore contenuto di solidi solubili totali rispetto alle piante controllo. I trattamenti migliori sono risultati essere il Micosat Len, applicato singolarmente, le miscele Micosat F Tab Plus + *T. atroviride* K4 e Micosat F Len Plus + *T. harzianum* K2 e l'applicazione del singolo ceppo K4, rispettivamente con il 59%, il 58%, 49% e 49% di incremento di gradi Brix.

Il secondo parametro qualitativo considerato è stato l'attività antiossidante degli estratti di pomodoro. Per questo tipo di analisi è stato utilizzato il saggio colorimetrico TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), che si basa sulla capacità di molecole antiossidanti di ridurre l'assorbanza del catione radicalico ABTS<sup>•+</sup>. I risultati riportati in figura 3.12 sono espressi come millimoli equivalenti di Trolox, una molecola antiossidante, analogo della vitamina E, utilizzato come standard nella costruzione della retta di taratura.

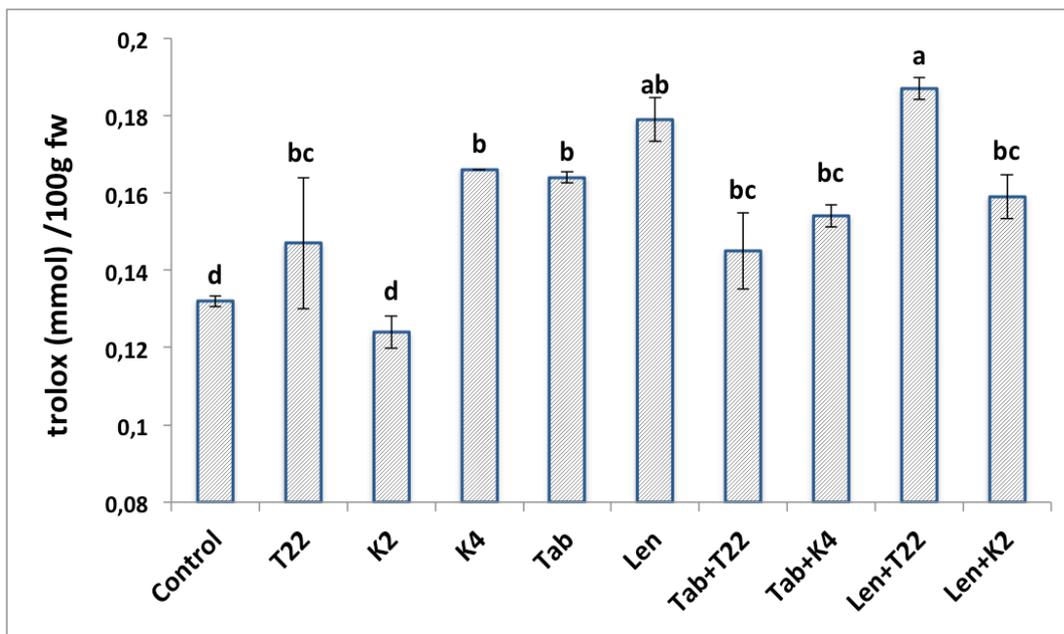


Figura 3-12 Effetti delle nuove miscele basate sui prodotti commerciali Micosat Tab e Len con i ceppi *Trichoderma* selezionati sulla qualità dei frutti di pomodoro prodotti nell'esperimento in campo, in termini di capacità antiossidante degli estratti dei frutti espressa come millimoli equivalenti di Trolox/100 grammi di peso fresco dei frutti. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

In questo caso non tutti i trattamenti si sono dimostrati efficaci nell'aumentare la capacità antiossidante dei frutti prodotti. Il trattamento con il ceppo K2 di *T. harzianum* infatti non ha prodotto differenze significative rispetto al controllo.

I risultati migliori sono stati ottenuti dalla miscela di Micosat Len + *T. harzianum* T22 e il Micosat F Len Plus applicato singolarmente, che hanno aumentato la capacità antiossidante dei frutti rispettivamente del 42% e del 36% rispetto al controllo.

L'ultimo parametro qualitativo esaminato è stato il contenuto di carotenoidi negli estratti di pomodoro. I carotenoidi analizzati, licopene e  $\beta$ -carotene, sono stati quantificati tramite analisi cromatografica DAD-HPLC per comparazione con gli standard quantificati con retta di taratura. Le differenze nelle quantità di licopene e  $\beta$ -carotene, tra gli estratti di frutti delle piante sottoposte ai diversi trattamenti sono riportati nelle figure 3.13 e 3.14. I risultati sono espressi come mg di ognuna delle molecole su 100 grammi di peso fresco del frutto.

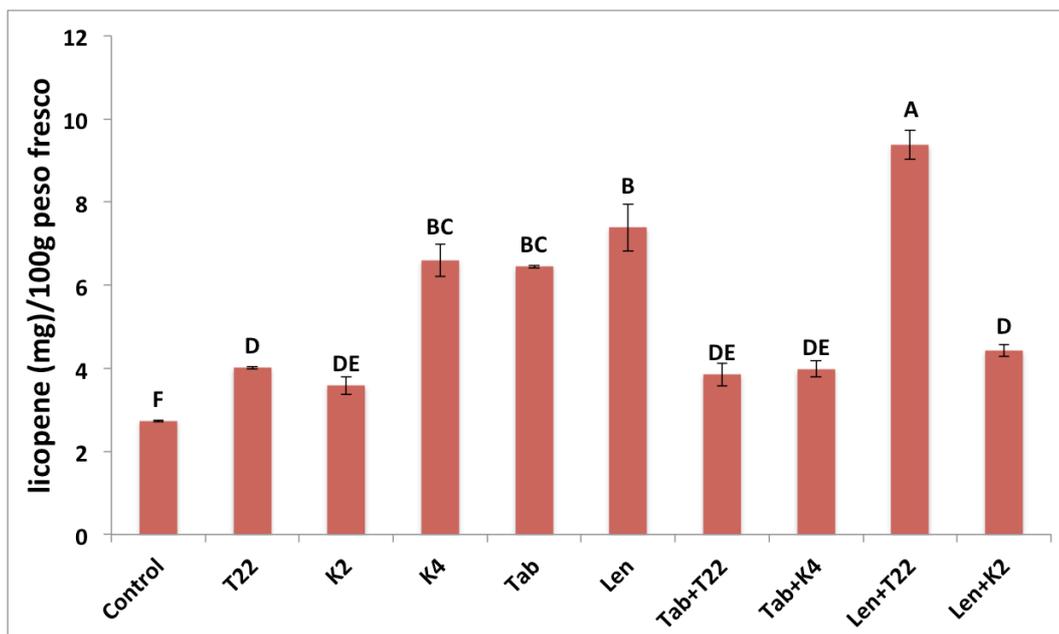


Figura 3-13: Il grafico mostra gli effetti delle nuove miscele basate sui prodotti commerciali Micosat Tab e Len con i ceppi *Trichoderma* selezionati sulla qualità dei frutti di pomodoro prodotti nell'esperimento in campo, in termini di contenuto di licopene all'interno degli estratti dei frutti espresso come mg di licopene/100 grammi di peso fresco dei frutti. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

Tutti i trattamenti hanno avuto un effetto positivo sul contenuto di licopene, aumentando significativamente la quantità di questi importanti metaboliti di pianta rispetto al controllo. Il trattamento che ha determinato un maggiore incremento è stato ancora una volta la miscela di Micosat Len+*T. harzianum* T22 con un contenuto di licopene maggiore del 243% rispetto al controllo e del 27% e del 134% rispetto ai due componenti della miscela, Micosat F Len Plus e T22, applicati singolarmente. Questa miscela inoltre è stata l'unica che ha determinato un effetto positivo maggiore rispetto all'applicazione dei singoli componenti.

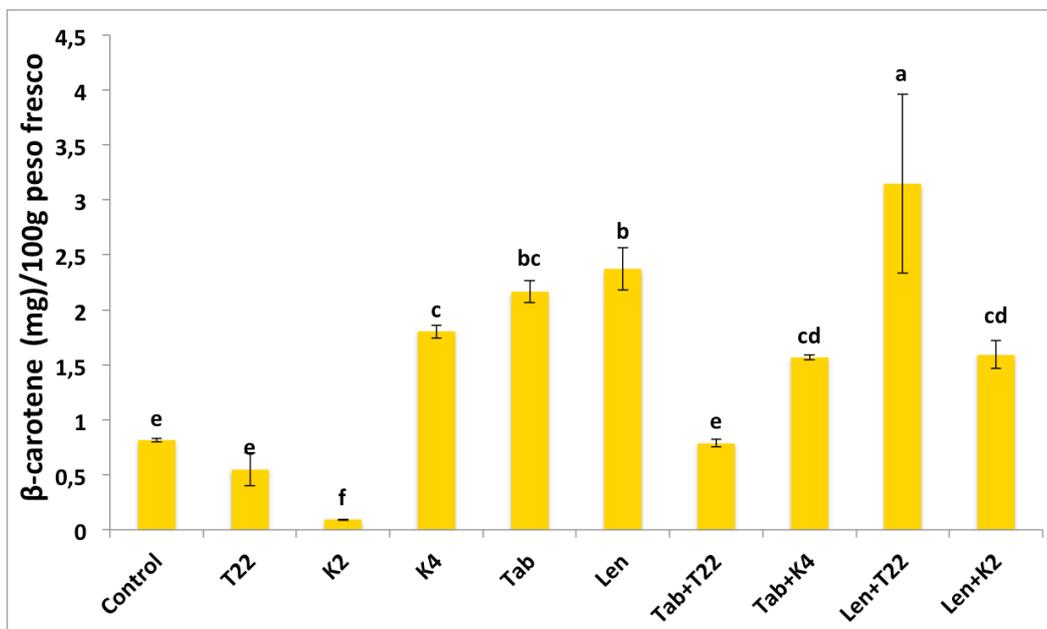


Figura 3-14: Effetti delle nuove miscele basate sui prodotti commerciali Micosat Tab e Len con i ceppi *Trichoderma* selezionati sulla qualità dei frutti di pomodoro prodotti nell'esperimento in campo, in termini di contenuto di β-carotene all'interno degli estratti dei frutti espresso come mg di β-carotene/100 grammi di peso fresco dei frutti. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

L'analisi del contenuto di β-carotene ha evidenziato che, diversamente dal parametro esaminato precedentemente, non tutti i trattamenti hanno avuto un effetto positivo in termini di aumento del suo contenuto. Il trattamento Micosat F Len Plus + *T. harzianum* T22 ancora una volta è stato quello più efficace con un incremento del 287% rispetto al controllo e del 33% e del 471% rispetto ai trattamenti singoli.

### 3.2.3 Effetto dei trattamenti con le miscele selezionate, e dei loro singoli componenti sul controllo del patogeno *Alternaria solani*.

È stata valutata la capacità dei diversi trattamenti di controllare l'infezione naturale del patogeno *Alternaria solani* in pieno campo.

Durante il ciclo colturale oggetto degli esperimenti, a circa 80 giorni dal trapianto si sono verificate frequenti piogge che, associate alle elevate temperature della stagione, hanno creato condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo dell'agente causale di alternariosi su pomodoro. I tessuti che presentavano i sintomi di fusariosi sono stati prelevati a campione ed utilizzati per l'isolamento del patogeno *A. solani* (caratterizzato mediante valutazione morfologica). Lo stesso reinoculato su pomodoro produceva gli stessi sintomi osservati in precedenza.

Al momento della raccolta, sulle bacche sono stati osservati i tipici sintomi della malattia, con aree necrotiche scure ad andamento concentrico (Figura 3.15).



Figura 3-15: Sintomi di *Alternaria solani* su frutto di pomodoro prodotto nell'esperimento in campo: sono evidenti le aree necrotiche scure ad andamento concentrico, tipiche della malattia.

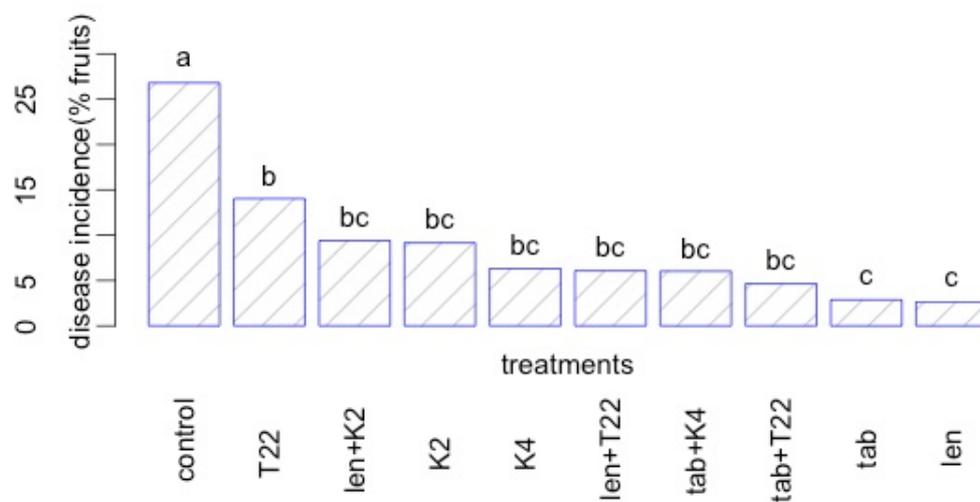


Figura 3-16: Effetti di biocontrollo delle nuove miscele basate sui prodotti commerciali Micosat Tab e Len con i ceppi *Trichoderma* selezionati su un'infezione naturale di *Alternaria solani* nell'esperimento in campo. Il grafico mostra l'incidenza della malattia espressa come percentuale di frutti attaccati in rapporto al numero di frutti prodotti da ogni pianta. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

La valutazione dell'efficacia di bio-controllo è stata effettuata in termini di riduzione dell'incidenza della malattia misurata come percentuale di frutti con sintomi rispetto al numero totale dei frutti prodotti da ogni pianta campionata.

I risultati sono mostrati nella figura 3.16 ed hanno evidenziato che tutti i trattamenti hanno avuto la capacità di controllare la diffusione della malattia in maniera statisticamente significativa rispetto al controllo. I prodotti commerciali Micosat F Tab Plus ed F Len Plus si sono dimostrati i trattamenti più efficaci quando applicati singolarmente e non sono state riscontrate differenze significative quando applicati in combinazione con i ceppi di *Trichoderma* selezionati.

### **3.3 Effetti delle nuove miscele di Micosat Tab e Len e dei ceppi di *Trichoderma* selezionati sullo sviluppo di *Phelipanche ramosa*.**

Secondo alcune osservazioni registrate nei centri di saggio dell'azienda C.C.S. Med, i prodotti Micosat consentono un migliore sviluppo delle piante trattate rispetto alle piante controllo in campi infestati dalla pianta parassita *Phelipanche ramosa*.

Le prove di campo effettuate dall'azienda sono state condotte in un'area agricola della provincia di Foggia, dove negli ultimi dieci anni si è verificato un forte incremento degli attacchi della pianta parassita che ha determinato un drastico calo delle rese produttive (Tarantino et al., 2015). Al fine di valutare la capacità di ridurre i danni provocati da *Phelipanche ramosa*, sono state saggiate le nuove miscele a base di Micosat Tab F Plus e Len F Plus e dei ceppi di *Trichoderma* selezionati su piante di pomodoro della varietà Docet in un esperimento in serra.

Nell'esperimento sono stati misurati gli effetti dei trattamenti sullo sviluppo della pianta parassita in termini di numero di turioni emersi dal terreno e numero di tubercoli per ogni pianta. Inoltre sono state valutate le condizioni vegetative delle piante trattate, sia rispetto alle piante controllo non trattate ma inoculate con i semi della pianta parassita, sia rispetto a piante controllo non trattate e non inoculate.

La comparsa dei primi turioni è avvenuta a circa 45 giorni dal trapianto del pomodoro e dopo altri 30 giorni le piante sono state raccolte ed è stata quantificata l'infestazione da parte della pianta parassita e i parametri vegetativi delle piante ospite.

Gli effetti dei trattamenti, sul controllo dello sviluppo di *Phelipanche ramosa*, sono riportati nei grafici riportati nelle figure 3.17 e 3.18.

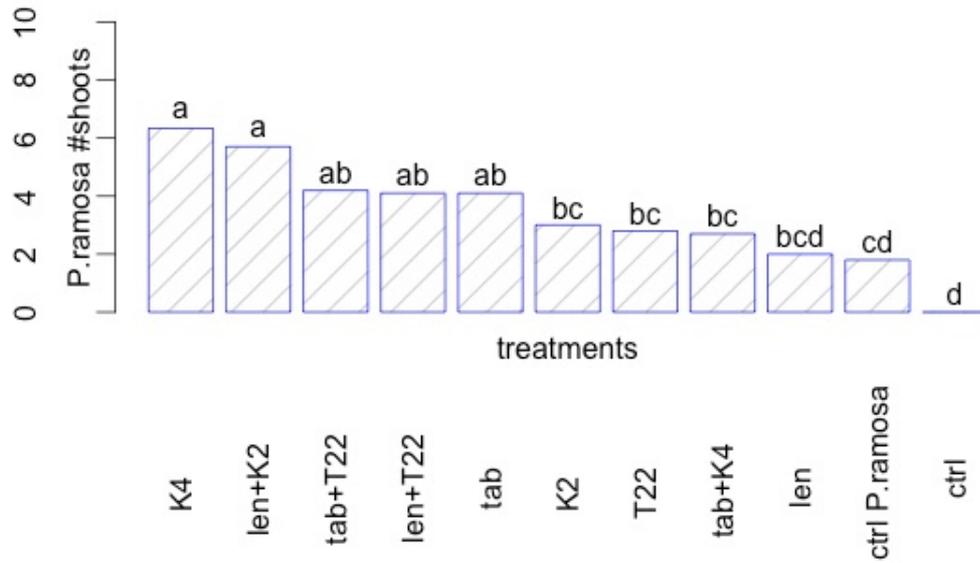


Figura 3-17: Effetto delle nuove miscele di Micosat Tab e Len e dei ceppi di *Trichoderma* selezionati sullo sviluppo di *Phelipanche ramosa* in serra espresso come numero di turioni di *P. ramosa* emersi per ogni vaso. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

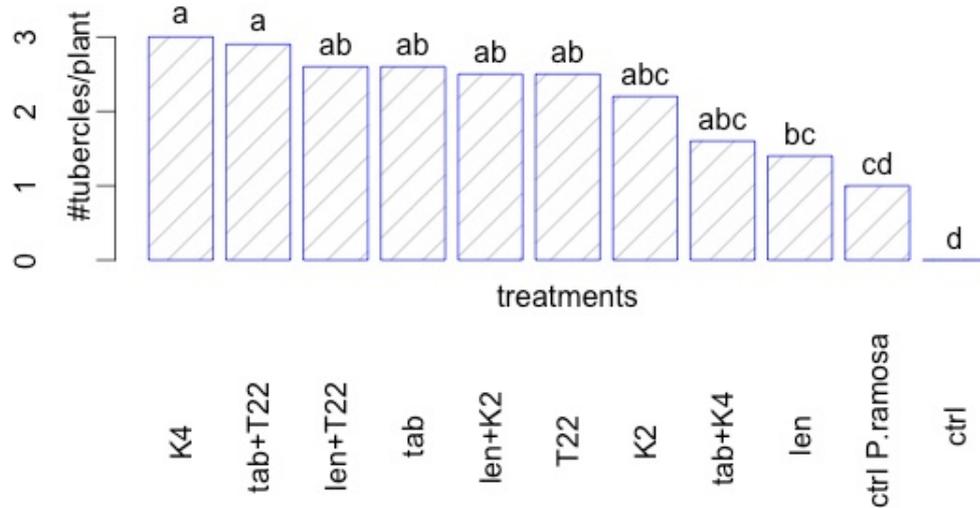


Figura 3-18: Effetto delle nuove miscele di Micosat Tab e Len e dei ceppi di *Trichoderma* selezionati sullo sviluppo di *Phelipanche ramosa* in serra espresso come numero di tubercoli di *P. ramosa* attaccati alle radici di ogni pianta. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

Tutti i trattamenti hanno mostrato avere un effetto positivo sullo sviluppo di *P. ramosa* incrementando il numero di turioni emersi e il numero di tubercoli attaccati alle radici delle piante ospite. In particolare, le applicazioni singole del ceppo K4 e delle miscele di Tab e Len

con T22, di Len con il ceppo K2 e l'applicazione singola del prodotto Micosat F Tab Plus hanno avuto un'azione stimolante sulla crescita delle *Philipanche*.

Quest'effetto ha provocato una conseguente inibizione della crescita delle piante attaccate, specialmente in termini di peso fresco del fusto (Figura 3.19). L'applicazione singola di T22, è stato l'unico trattamento che è riuscito a non far peggiorare lo stato di salute delle piante trattate non producendo differenze significative in termini di peso fresco dei fusti rispetto alle piante inoculate con *P.ramosa*, soprattutto rispetto alle piante controllo non inoculate.

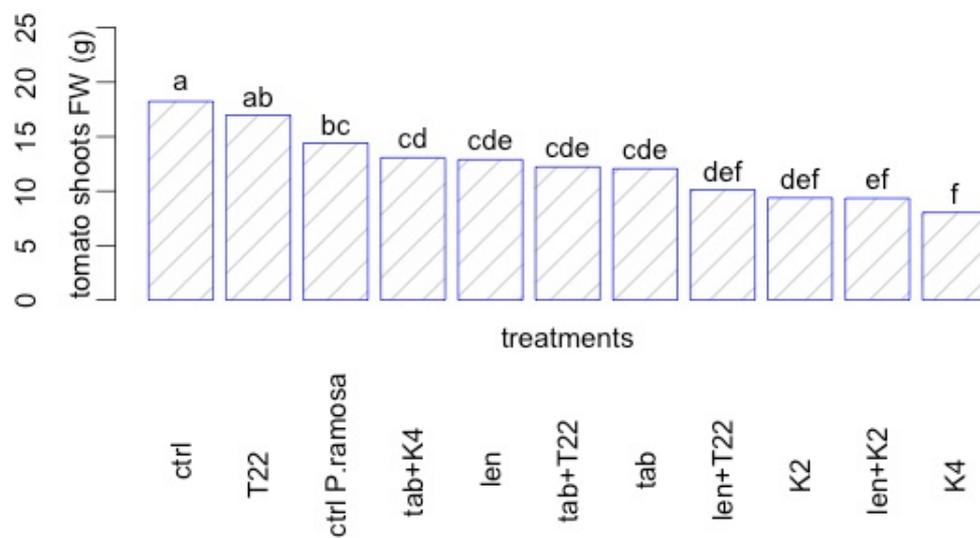


Figura 3-19: Effetto delle nuove miscele di Micosat Tab e Len e dei ceppi di *Trichoderma* selezionati sulla crescita di piante di pomodoro infestate con la pianta parassita *Phelipanche ramosa* in serra espressa peso fresco del fusto delle piante di pomodoro. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

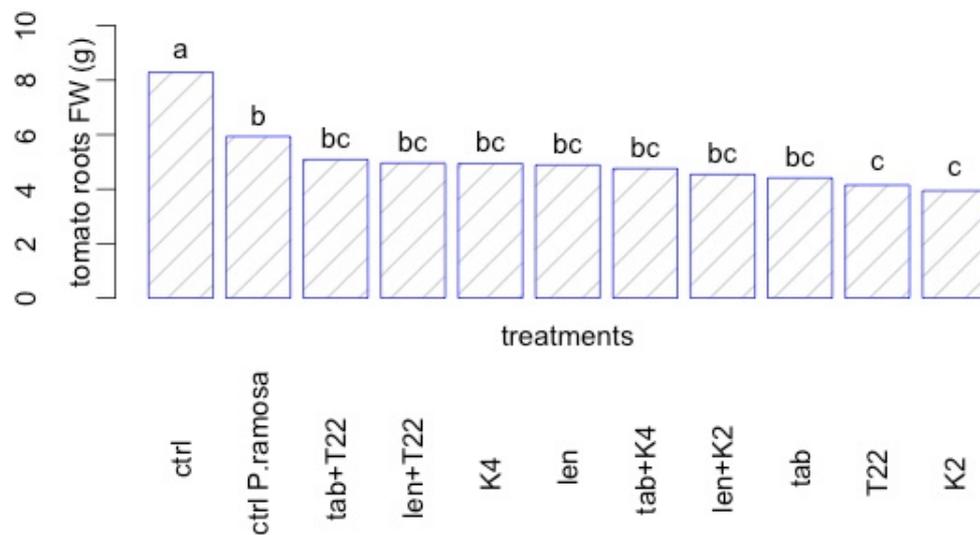


Figura 3-20: Effetto delle nuove miscele di Micosat Tab e Len e dei ceppi di *Trichoderma* selezionati sulla crescita di piante di pomodoro infestate con la pianta parassita *Phelipanche ramosa* in serra espressa peso fresco delle radici delle piante di pomodoro. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$

Al contrario non sono state evidenziate importanti differenze significative sul peso fresco delle radici delle piante trattate rispetto alle piante controllo inoculate con la pianta parassita (Figura 3.20).

### 3.4 Caratterizzazione dei principali metaboliti secondari prodotti dai ceppi di *Trichoderma* “K”.

Sono stati isolati e caratterizzati i principali metaboliti secondari dei ceppi di *T. harzianum* K2 e K3, *T. atroviride* K4 e *T. viride* K5. I ceppi sono stati cresciuti in coltura statica e dopo 30 giorni i filtrati colturali sono stati estratti con EtOAc come riportato nel capitolo “Materiali e Metodi”. Gli estratti totali dei ceppi “K3”, “K4” e “K5” sono stati analizzati mediante TLC a fase diretta ( $\text{SiO}_2$ ) confrontando i profili con uno standard di 6PP. I profili cromatografici dei ceppi hanno mostrato la banda più intensa con lo stesso Rf del 6-pentil- $\alpha$ -pirone (Figura 3.21).

Per analizzare tutti i componenti principali degli estratti i residui ottenuti dai diversi ceppi di *Trichoderma* sono stati sottoposti a separazione con colonna cromatografica a pressione atmosferica.

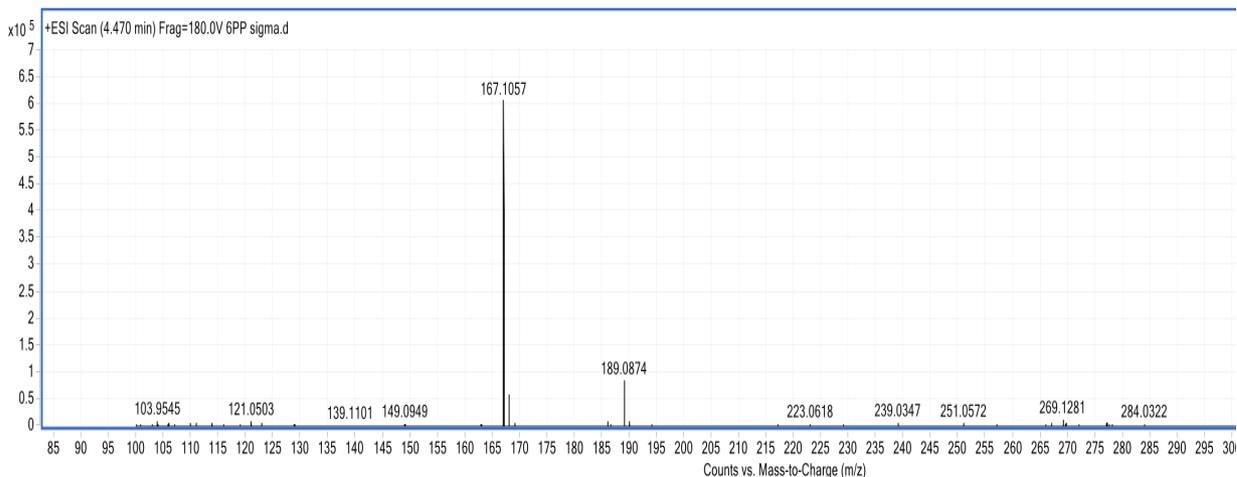


Figura 3-21: Profilo TLC ( $\text{SiO}_2$ ) degli estratti da filtrato colturale dei ceppi K. Le bande evidenziate mostrano che la molecola più abbondante (intensità maggiore) prodotta dai ceppi K3, K4 e K5 presenta lo stesso Rf dello standard di 6PP

La separazione cromatografica dell’estratto di “K2” (435mg) ha prodotto 11 frazioni omogenee. Le frazioni 6 e 7 (rispettivamente 22,3 e 37,2 mg) erano le più abbondanti e sono state analizzate con esperimenti di risonanza magnetica nucleare (NMR). I segnali degli spettri  $^1\text{H}$  NMR si sono rivelati identici a quelli riportati in letteratura per harzianolide e deidro-harzianolide (Almassi et al., 1991; Vinale et al., 2008).

Il ceppo “K3” ha prodotto un residuo secco di 378 mg che è stato successivamente separato per colonna cromatografica in 18 frazioni. La frazione 2, più apolare, che su TLC presentava lo stesso Rf dello standard di 6PP, si è rivelata essere la più abbondante (45 mg) ed è stata

analizzata con LC/ MS-MS. Lo spettro di massa ha rivelato un picco ionico molecolare  $[MH^+]$  a 167,1057 ed un addotto sodico  $[MNa^+]$  a 189,0874, tipico del 6-pentil- $\alpha$ -pirone



**Figura 3-22: Spettro di massa della frazione 2 dell'estratto del ceppo K5. Lo spettro mostra 2 principali picchi molecolari 1) 167,1057 corrispondente ad  $[MH^+]$  del 6PP e 2) il suo addotto sodico  $[MNa^+]$  con 189.0874 uma.**

Dall'estratto totale sono state isolate le successive 2 frazioni più abbondanti che analizzate con TLC hanno mostrato lo stesso Rf di harzianolide e deidro-harzianolide, purificate dal ceppo "K2".

Le diverse componenti degli estratti organici dei ceppi "K4" (365 mg) e "K5" (415 mg) sono state sottoposte a separazione per colonna cromatografica. La frazione 2 del ceppo "K4" (57 mg) e la frazione 2 del ceppo "K5" (85 mg), che per cromatografia su strato sottile hanno mostrato lo stesso Rf dello standard 6PP, sono state ulteriormente analizzate mediante spettrometria di massa LC/MS-MS. Gli spettri di massa e la successiva analisi NMR (segnali identici a quelli riportati da Cutler et al., 1986) hanno permesso di confermare ed identificare il 6PP

Nella tabella 2.1 sono riportati i singoli ceppi con i principali metaboliti secondari isolati e caratterizzati.

**Tabella 3-1: Riepilogo dei principali metaboliti secondari isolati dai ceppi di *Trichoderma* K**

<b>Ceppo</b>	<b>Principali metaboliti secondari</b>
K2	Harzianolide; deidro-harzianolide
K3	6PP; Harzianolide; deidro-harzianolide
K4	6PP
K5	6PP

La biosintesi di 6PP dei ceppi K4 e K5 è stata quantificata mediante analisi HPLC-DAD direttamente dai filtrati colturali fungini.

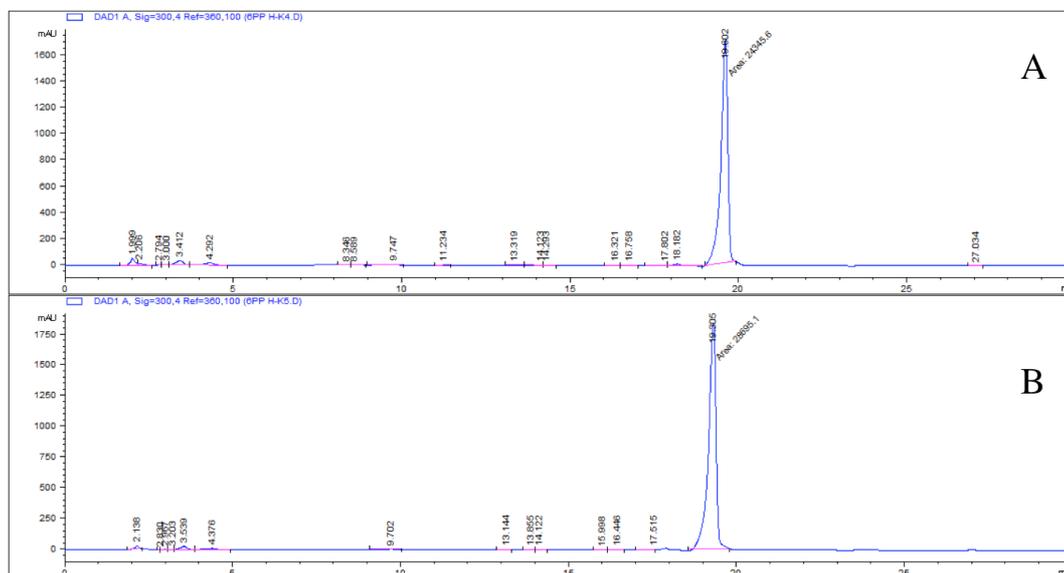


Figura 3-23: Profilo cromatografico dei filtrati colturali dei ceppi K4 (A) e K5 (B). I picchi evidenziati mostrano lo stesso tempo di ritenzione mostrato dallo standard della molecola 6PP

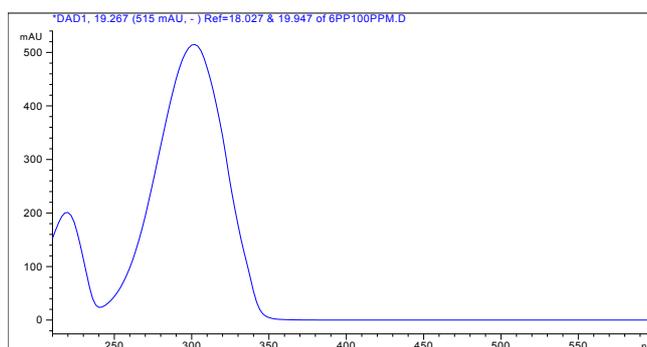


Figura 3-24: Spettro UV estratto dalla corsa cromatografica dello standard 6PP al minuto 19 mostra il picco di assorbimento a 300nm.

Il picco cromatografico con Rt a 19,3 min e spettro UV-Vis con  $\lambda$  max a 300 nm corrispondente al 6PP è stato utilizzato per la quantificazione per confronto con una retta di taratura ottenuto con uno standard della molecola.

L'analisi ha rivelato che la quantità di 6PP rilasciata nel mezzo di crescita da parte dei ceppi "K4" e "K5" è stata rispettivamente di 430 ppm e 515 ppm.

### 3.5 Effetti di nuove combinazioni a base di Micosat F Tab Plus e Micosat F Len Plus e metaboliti secondari di *Trichoderma* sulla crescita di piante di pomodoro.

Nuove miscele a base di Micosat F Tab Plus e Len Plus e di metaboliti secondari di *Trichoderma* spp. sono state saggate *in-vivo* valutando gli effetti sulla crescita delle piante trattate (peso fresco di fusti e radici).

I metaboliti scelti per queste combinazioni sono stati il 6-pentil- $\alpha$ -pirone, purificato dal ceppo di *Trichoderma* K5, l'acido harzianico, isolato da *Trichoderma harizantum* M10 (Vinale et al., 2009) e l'1-octen-3-olo.

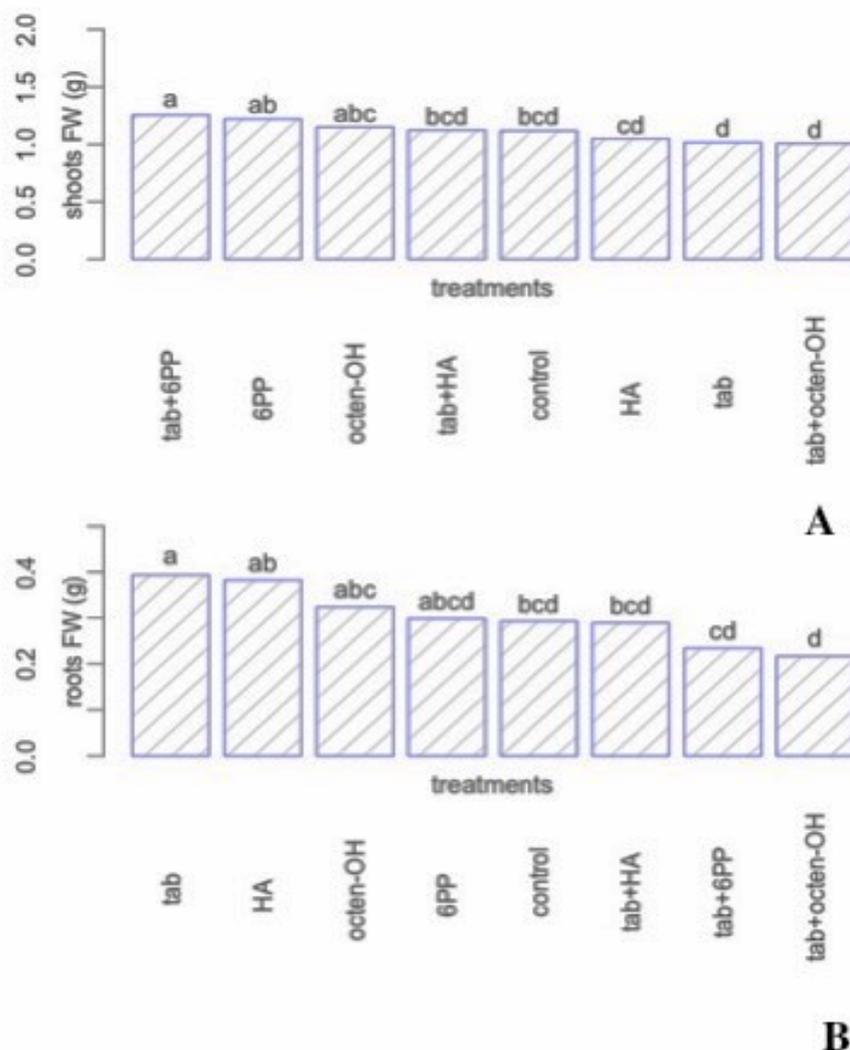


Figura 3-25: Effetto di promozione di crescita *in-vivo* dei metaboliti secondari di *Trichoderma* 6-pentil- $\alpha$ -pirone (6PP) acido harzianico (HA) e 1-octen-3-olo (octen-OH) e delle loro combinazioni con il prodotto commerciale Micosat Tab su peso fresco di fusto (A) e radici (B) di piante di pomodoro

Nel primo esperimento sono state valutate le applicazioni singole e le combinazioni del Micosat Tab con i 3 metaboliti secondari. L'unica miscela che è stata in grado di promuovere significativamente la crescita delle piante trattate è stata "Tab"+6PP. Questa miscela ha prodotto differenze significative in termini di aumento del peso fresco del fusto solo rispetto alle piante non trattate senza evidenziare differenze rispetto all'applicazione singola di 6PP. Quest'incremento non è stato riscontrato sul peso fresco delle radici, dove l'unica differenza significativa rispetto alle piante non trattate è stata ottenuta dall'applicazione singola del Micosat Tab.

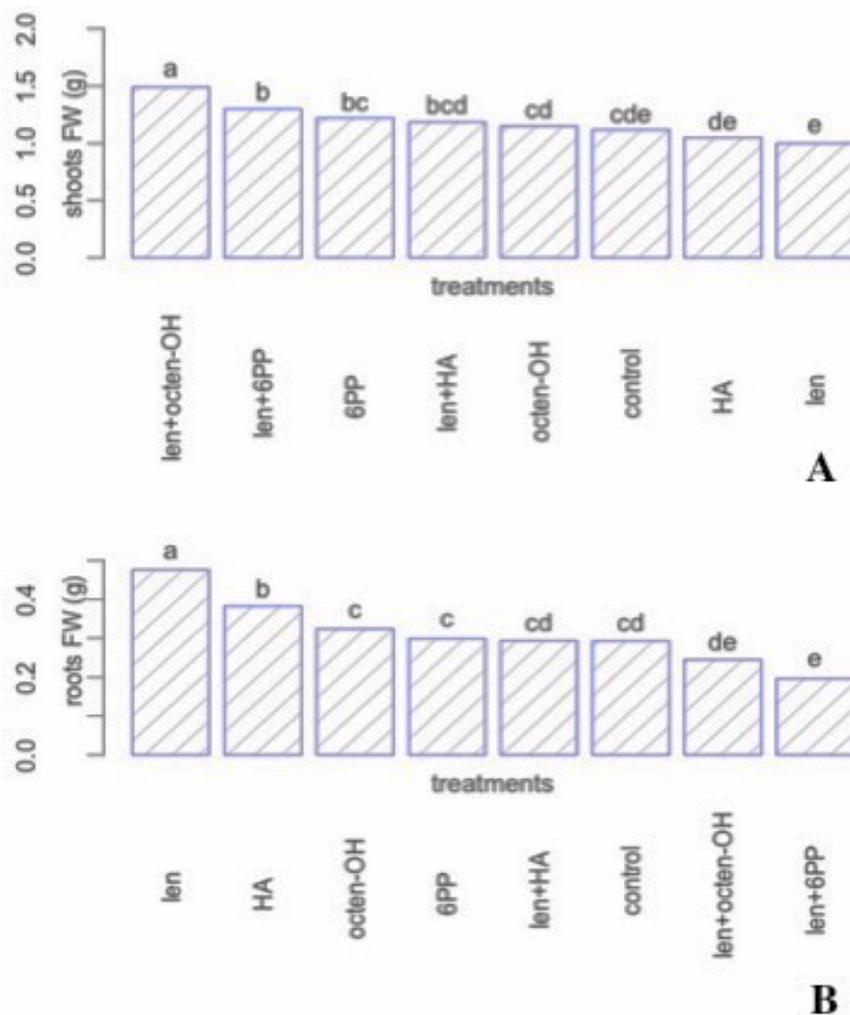


Figura 3-26: Effetto di promozione di crescita *in-vivo* dei metaboliti secondari di *Trichoderma* 6-pentil- $\alpha$ -pirone (6PP) acido harzianico (HA) e 1-octen-3-olo (octen-OH) e delle loro combinazioni con il prodotto commerciale Micosat Len su peso fresco di fusto (A) e radici (B) di piante di pomodoro.

Nell'esperimento con le miscele a base di Micosat F Len, i trattamenti che hanno prodotto un aumento significativo del peso fresco del fusto rispetto al controllo trattato con acqua sono state le 2 combinazioni del prodotto commerciale con l'1-octen-3-olo e con 6PP, dove i risultati migliori sono stati ottenuti dalla prima combinazione.

Queste differenze non sono state riscontrate nella misura dei pesi freschi delle radici, dove gli unici aumenti statisticamente significativi sono stati osservati con le applicazioni singole di Micosat F Len e acido harzianico.

### **3.6 Caratterizzazione delle proteine secrete formanti schiuma dei ceppi di *Trichoderma* "K".**

#### **3.6.1 Produzione, isolamento e quantificazione delle proteine**

Durante l'esperienza all'estero nel laboratorio di Ricerca e Sviluppo dell'azienda ABM proprietaria dei ceppi di *Trichoderma* "K" sotto il tutoraggio del Prof. Harman, sono stati caratterizzati i ceppi "K" per la capacità di rilasciare specifiche proteine idrofobiche. La ricerca si è focalizzata su uno specifico gruppo di proteine extracellulari secrete nel mezzo di crescita e capaci di formare schiuma durante lo sviluppo in substrato liquido.

I ceppi di *T. virens* K1, *harzianum* K2, *harzianum* K3, *atriviride* K4 e *viride* K5 sono stati cresciuti in mezzo di crescita salino (Salt medium SM) addizionato di saccarosio allo 1% come fonte di carbonio, in agitazione per 7 giorni. Tutti i ceppi, tranne il K1, hanno mostrato la capacità di formare un'abbondante schiuma persistente sulla superficie del mezzo. La produzione di schiuma è stata associata alla formazione di aggregati proteici con proprietà di auto-assemblaggio all'interfaccia aria/liquido per costante incorporazione di aria durante la crescita in agitazione.

Le schiume prodotte dai ceppi "K2", "K3", "K4" e "K5" sono state raccolte con Etanolo al 70% ed è stata effettuata una quantificazione fluorimetrica delle proteine in soluzione (CBQCA – Invitrogen - Molecular Probes ). La quantificazione è stata fatta per comparazione con la retta di taratura costruita con diluizioni seriali dello standard di BSA (sieroalbumina bovina: Thermo Fisher Scientific).

Nella seguente tabella sono riportati i valori delle concentrazioni delle proteine, raccolte in un volume finale di 50ml e la concentrazione finale di EtOH in soluzione.

Tabella 3-2: Quantificazione delle proteine raccolte.

Ceppo	Concentrazione ( $\mu\text{g/ml}$ )	%EtOH in soluzione
K2	378,7	22%
K3	263,9	18%
K4	445,4	35%
K5	385,2	27%

### 3.6.2 Caratterizzazione proteomica delle schiume dei ceppi K di *Trichoderma*.

Le soluzioni proteiche estratte sono state sottoposte a caratterizzazione proteomica. I campioni provenienti dai quattro ceppi sono stati sottoposti a digestione triptica e i peptidi ottenuti sono stati analizzati con tecnica di spettrometria di massa tandem (nano-LC/MSMS) con un tipo di approccio “non-targeted”. I dati raccolti sono stati analizzati con il software Mascot Server utilizzando il più recente database NCBI per le proteine di *Trichoderma* al momento dell’analisi. Attraverso quest’approccio, sono state identificate un totale di 38 proteine per ciascuno dei ceppi K2 e K3; 82 proteine per il ceppo K4; 86 proteine per il ceppo K5.

Questi risultati sono stati successivamente filtrati e sono state scelte le proteine che presentavano almeno due peptidi unici, valori di abbondanza relativa maggiori di 1, espressi come percentuale molare ed un protein score maggiore di 100. Per la valutazione dei criteri di scelta dell’analisi proteomica si considera che un peptide è definito unico quando indipendentemente dalla sua lunghezza esiste solo in una proteina o proteoma di interesse (Zhao et al., 2010). Il protein score è un valore derivato dalla somma dei peptides score della proteina di riferimento e rappresenta la probabilità che la corrispondenza tra il valore del peptide trovato e il valore teorico del peptide presente nella banca dati non sia un evento casuale con un valore di significatività di 0,05. Il valore di percentuale molare è la trasformazione in valore percentuale dell’abbondanza relativa del valore emPAI della proteina all’interno del campione analizzato; il valore emPAI rappresenta la trasformazione esponenziale dell’abbondanza relativa della proteina, definito come il numero di peptidi rilevati diviso per il numero di peptidi osservabili e normalizzato per il numero di peptidi attesi teoreticamente per digestione *in-silico* (Ishihama et al., 2005).

I risultati ottenuti dopo il filtraggio hanno mostrato che le proteine identificate, che rispettavano i valori scelti, sono state 8 per il ceppo “K2”, 9 per il ceppo “K3”, e 11 per i ceppi “K4” e “K5”.

La maggior parte delle proteine identificate con il database di NCBI utilizzato nell’analisi sono risultate essere annotate come ‘hypothetical protein’. Le sequenze delle proteine prive di

annotazione funzionale sono state analizzate con lo strumento di NCBI CDD (Conserved Domain Database; Marchler-Bauer A et al. 2015) con cui sono stati identificati i domini funzionali.

Nelle tabelle seguenti (tabella 3.3; tabella 3.4; tabella 3.5; tabella 3.6) sono riportate le proteine identificate prodotte da ogni ceppo, con gli ID proteici, l'annotazione presente nel database di NCBI, i domini conservati identificati e l'annotazione funzionale. Inoltre sono riportati i 'protein scores', il numero di peptidi unici ottenuti e l'abbondanza relativa di ogni proteina.

**Tabella 3-3: Proteine estratte dal ceppo K2. In tabella sono riportati gli ID proteici del database NCBI delle proteine identificate con l'analisi proteomica, con la relativa descrizione delle proteine annotate, l'annotazione proposta in seguito ad analisi dei domini funzionali conservati, protein score delle proteine identificate, numero di peptidi unici e abbondanza relativa all'interno del campione analizzato.**

<b>Proteine estratte dal ceppo "K2"</b>					
<b>prot. ID</b>	<b>ncbi description</b>	<b>Annotazione proposta- Domini conservati</b>	<b>protein score</b>	<b># unique peptides</b>	<b>% molar</b>
2::gil818159986	hypothetical protein THAR02_07588 [Trichoderma harzianum]	protein with CFEM conserved domain: Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	3534	6	20,2
2::gil818164230	hypothetical protein THAR02_04002 [Trichoderma harzianum]	protein with hydrophobin 2 conserved domain	1677	4	15,4
2::gil818166392	protein SnodProt1 precursor [Trichoderma harzianum]	protein with cerato-platanin conserved domain	1307	3	12,9
2::gil818166483	hypothetical protein THAR02_01963 [Trichoderma harzianum]	protein with CFEM conserved domain: Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	2402	4	8,2
2::gil818164873	hypothetical protein THAR02_03429 [Trichoderma harzianum]	protein with GPI-anchored- superfamily domain	665	3	3,8
2::gil818165637	hypothetical protein THAR02_02761 [Trichoderma harzianum]	predicted small secreted cysteine-rich protein (annotated on EHK24277.1)	339	2	2,7
2::gil358388625	hypothetical protein TRIVIDRAFT_9172, partial [Trichoderma virens Gv29-8]		115	2	2,4
2::gil818165079	WSC domain-containing protein [Trichoderma harzianum]		1156	5	1,6

**Tabella 3-4: Proteine estratte dal ceppo K3. In tabella sono riportati gli ID proteici del database NCBI delle proteine identificate con l'analisi proteomica, con la relativa descrizione delle proteine annotate, l'annotazione proposta in seguito ad analisi dei domini funzionali conservati, protein score delle proteine identificate, numero di peptidi unici e abbondanza relativa all'interno del campione analizzato.**

<b>Proteine estratte dal ceppo "K3"</b>					
prot. ID	ncbi description	Annotazione proposta- Domini conservati	protein score	# unique peptides	% molar
2::gil818164230	hypothetical protein THAR02_04002 [Trichoderma harzianum]	protein with hydrophobin 2 conserved domain	1046	4	19,2
2::gil818167013	hypothetical protein THAR02_01452 [Trichoderma harzianum]	protein with hydrophobin 2 conserved domain	232	3	17,1
2::gil818159986	hypothetical protein THAR02_07588 [Trichoderma harzianum]	protein with CFEM conserved domain: Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	479	4	13,8
2::gil818167537	hypothetical protein THAR02_00961 [Trichoderma harzianum]	predicted small secreted cysteine-rich protein (annotated on EHK19462.1)	162	2	5,6
2::gil818166483	hypothetical protein THAR02_01963 [Trichoderma harzianum]	protein with CFEM conserved domain: Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	442	3	5,3
2::gil818166392	protein SnodProt1 precursor [Trichoderma harzianum]	protein with cerato-platanin conserved domain	241	2	3,6
2::gil818163371	hypothetical protein THAR02_04732 [Trichoderma harzianum]	predicted ATPase F0 complex, subunit A (annotated on JGIDB:TriviGv29_8_2_185571)	203	2	3,0
2::gil818164617	N(4)-(beta-N-acetylglucosaminyl)-L-asparaginase precursor [Trichoderma harzianum]		114	3	2,6
2::gil818160446	hypothetical protein THAR02_07204, partial [Trichoderma harzianum]	protein with CFEM conserved domain: Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	193	3	1,5

**Tabella 3-5: Proteine estratte dal ceppo K4. In tabella sono riportati gli ID proteici del database NCBI delle proteine identificate con l'analisi proteomica, con la relativa descrizione delle proteine annotate, l'annotazione proposta in seguito ad analisi dei domini funzionali conservati, protein score delle proteine identificate, numero di peptidi unici e abbondanza relativa all'interno del campione analizzato.**

<b>Proteine estratte dal ceppo “K4”</b>					
<b>prot. ID</b>	<b>ncbi description</b>	<b>Annotazione proposta- Domini conservati</b>	<b>protein score</b>	<b># unique peptides</b>	<b>% molar</b>
2::gil358392088	hypothetical protein TRIATDRAFT_31624 [Trichoderma atroviride IMI 206040]	predicted small secreted cysteine-rich protein (annotated on Trive1.estExt_Genewise1.C_71057 prot. Id:87351)	1084	7	19,0
2::gil154125577	hydrophobin [Trichoderma atroviride]		581	3	17,0
2::gil154125573	hydrophobin [Trichoderma atroviride]		894	2	15,7
2::gil358390203	eliciting plant response-like protein [Trichoderma atroviride IMI 206040]		3773	5	10,1
2::gil70930993	spore-related hydrophobin [Trichoderma viride]		1735	4	9,1
2::gil154125579	hydrophobin [Trichoderma atroviride]		1128	4	5,1
2::gil358396577	hypothetical protein TRIATDRAFT_256835 [Trichoderma atroviride IMI 206040]		259	2	4,7
2::gil358400203	hypothetical protein TRIATDRAFT_297515 [Trichoderma atroviride IMI 206040]	protein with CFEM conserved domain: Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	552	6	3,8
2::gil358392705	hypothetical protein TRIATDRAFT_28843 [Trichoderma atroviride IMI 206040]	predicted NLP/P60 protein (annotated on [Metarhizium guizhouense ARSEF 977] acc. numb:KID87822)	362	6	1,5
2::gil154125581	hydrophobin [Trichoderma atroviride]		522	5	1,5
2::gil154125571	hydrophobin [Trichoderma atroviride]		205	2	1,5

**Tabella 3-6: Proteine estratte dal ceppo K5. In tabella sono riportati gli ID proteici del database NCBI delle proteine identificate con l'analisi proteomica, con la relativa descrizione delle proteine annotate, l'annotazione proposta in seguito ad analisi dei domini funzionali conservati, protein score delle proteine identificate, numero di peptidi unici e abbondanza relativa all'interno del campione analizzato.**

<b>Proteine estratte dal ceppo "K5"</b>					
<b>prot. ID</b>	<b>ncbi description</b>	<b>Annotazione proposta-Domini conservati</b>	<b>protein score</b>	<b># unique peptides</b>	<b>% molar</b>
2::gil154125579	hydrophobin [Trichoderma atroviride]		1884	6	27,84
2::gil70930993	spore-related hydrophobin [Trichoderma viride]		5784	4	22,87
2::gil358394017	hypothetical protein TRIATDRAFT_258575 [Trichoderma atroviride IMI 206040]	Hypothetical Seed maturation protein (annotated on [Metarhizium album ARSEF 1941] gblKHN98481.1)	341	2	8,06
2::gil358390203	eliciting plant response-like protein [Trichoderma atroviride IMI 206040]		1227	5	5,62
2::gil154125577	hydrophobin [Trichoderma atroviride]		203	2	3,97
2::gil358400203	hypothetical protein TRIATDRAFT_297515 [Trichoderma atroviride IMI 206040]	protein with CFEM conserved domain: Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	419	6	2,79
2::gil358401319	hypothetical protein TRIATDRAFT_52968 [Trichoderma atroviride IMI 206040]	protein with DUF2823 conserved domain (unknown function)	169	3	2,75
2::gil358398091	hypothetical protein TRIATDRAFT_52388 [Trichoderma atroviride IMI 206040]		209	3	2,35
2::gil154125581	hydrophobin [Trichoderma atroviride]		754	7	2,28
2::gil358398976	hypothetical protein TRIATDRAFT_192857, partial [Trichoderma atroviride IMI 206040]	protein with Inhibitor_I9 conserved domain (peptidase inhibitor I9)	168	2	1,90
2::gil358390394	hypothetical protein TRIATDRAFT_303083 [Trichoderma atroviride IMI 206040]		264	4	1,77

È stata eseguita un'analisi comparativa tra tutte le proteine identificate con l'obiettivo di valutare la presenza di proteine condivise tra gli estratti dei diversi ceppi e l'eventuale differenza nei livelli di espressione. Il diagramma di Venn (Figura 3.26) mostra il numero delle proteine condivise tra i diversi ceppi. Inoltre, nelle figure 3.27 e 3.28 sono mostrati i diversi livelli di espressione delle proteine condivise dai ceppi K2-K3 e K4-K5 riportati in termini di abbondanza relativa.

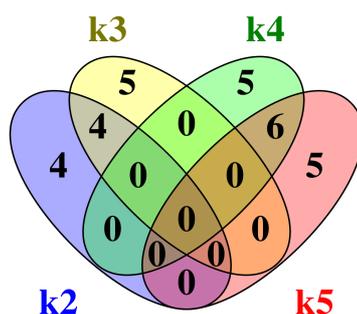


Figura 3-27: Il diagramma di Venn, ottenuto con lo strumento web Venny 2.1 mostra il numero di proteine condivise tra i ceppi di *T.harzianum* K2 e K3 con (4 proteine) e le proteine condivise tra i ceppi K4 e K5 (6 proteine).

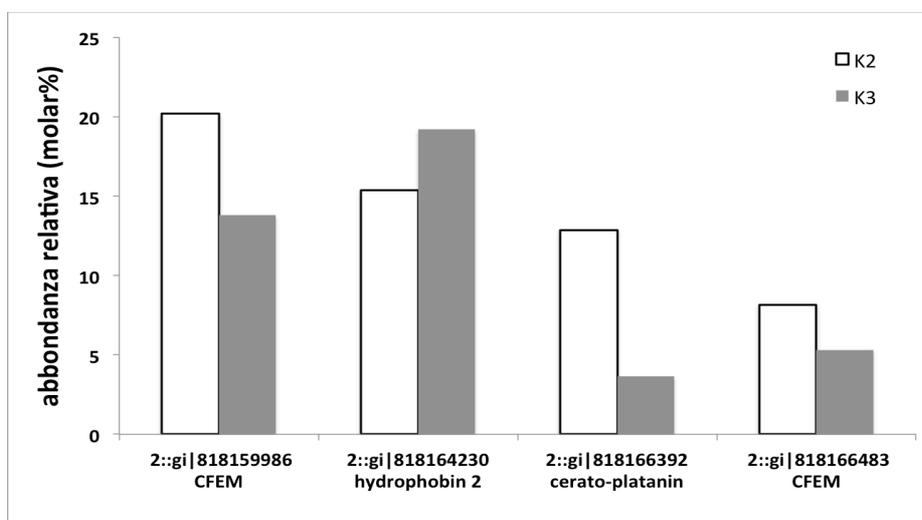


Figura 3-28: Il grafico mostra l'espressione differenziale delle proteine condivise dai ceppi K2 e K3 espressa come abbondanza relativa in molar% delle proteine identificate. Per le proteine presenti nel grafico sono riportati gli ID di del database di NCBI ed il relativo dominio funzionale conservato

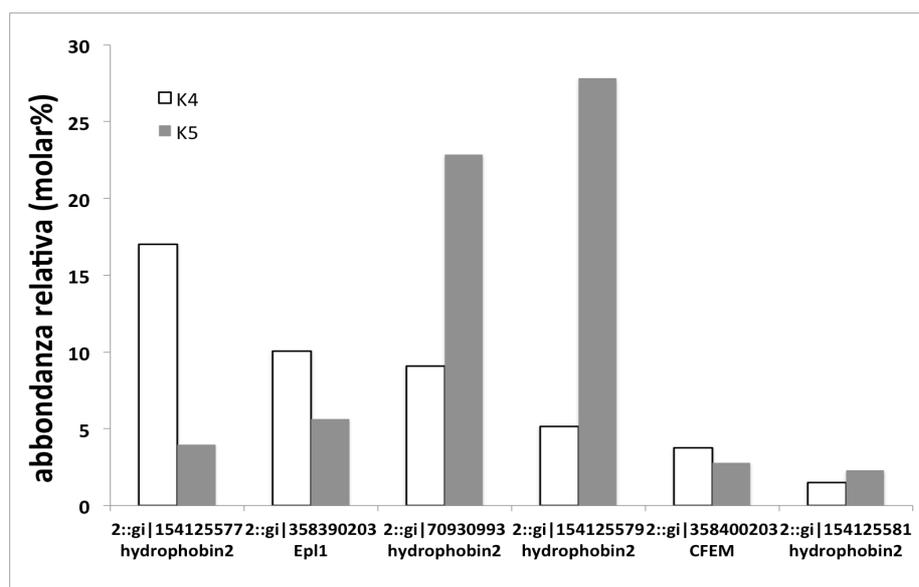


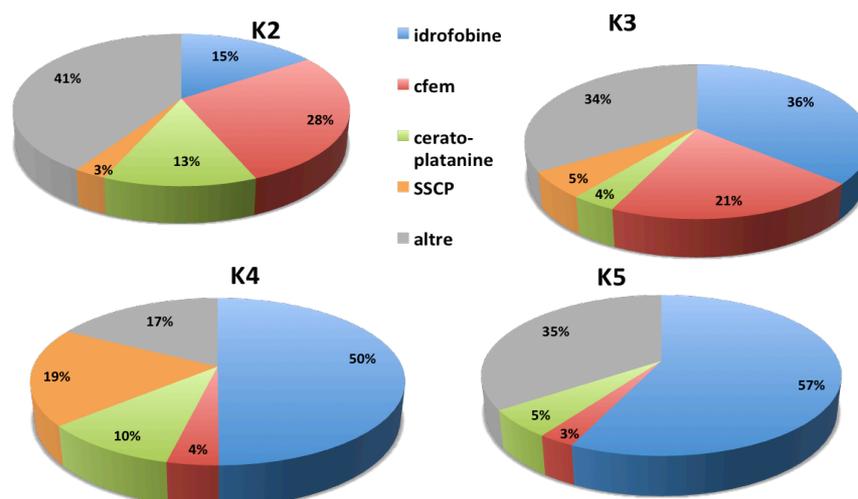
Figura 3-29: Il grafico mostra l'espressione differenziale delle proteine condivise dai ceppi K4 e K5 espressa come abbondanza relativa in molar% delle proteine identificate. Per le proteine presenti nel grafico sono riportati gli ID di del database di NCBI ed il relativo dominio funzionale conservato

La maggior parte delle proteine condivise tra i ceppi K2-K3 e K4-K5 sono anche risultate essere le più rappresentate negli estratti analizzati. Le uniche eccezioni sono state:

- una idrofobina di classe 2 prodotta dal ceppo K3 (2::gil818167013), con una percentuale di abbondanza del 17,12%;
- due proteine estratte dal ceppo K4, rispettivamente con una percentuale di abbondanza relativa di 18,9% e 15,6% e che sono identificate come una hypothetical protein (2::gil358392088) annotata come predicted small secreted cysteine rich protein (jgilTrive11873511estExt\_Genewise1.C\_71057) ed una idrofobina di classe 2 (2::gil154125573);
- inoltre una idrofobina di classe 2 (2::gil154125571) prodotta dal ceppo K5 presente in una percentuale molare di 8,06%.

Come mostrato in figura 3.30, la maggior parte delle proteine in termini di abbondanza relativa, identificate all'interno dei campioni analizzati (oltre il 50% molare), si sono rivelate appartenere a 4 principali famiglie di proteine:

- 1 idrofobine di classe 2,
- 2 proteine con dominio CFEM,
- 3 cerato-platanine
- 4 e le small secreted cysteine-rich proteins (SSCP) che condividono caratteristiche strutturali simili: sono tutte piccole proteine (massimo 300 amminoacidi) secrete e ricche di residui cisteinici (almeno 4, Kubicek et al., 2011).



**Figura 3-30: Il grafico mostra l'abbondanza relativa delle 4 famiglie proteiche più rappresentate all'interno dei campioni analizzati calcolata come somma delle abbondanze relative delle singole proteine con lo stesso dominio funzionale.**

### 3.7 Effetti delle miscele proteiche isolate dai ceppi “K” *in-vivo* su piante di mais, in termini di promozione di crescita e contenuto di clorofilla delle piante

È stato valutato l’effetto di promozione di crescita delle proteine isolate dai ceppi di *Trichoderma harzianum* K2 e K3, *atroviride* K4 e *viride* K5 su piante di mais, in un esperimento in serra in cui ognuna delle miscele estratte è stata applicata per confettatura sui semi a quattro diverse concentrazioni (100 ppm; 10 ppm; 1 ppm; 0,1 ppm). Dopo 30 giorni, sono stati misurati la lunghezza del fusto, la lunghezza delle radici ed il peso fresco di fusto e radici. Le miscele proteiche estratte dai ceppi di *Trichoderma* “K2”, “K3” e “K5” hanno avuto un effetto positivo sulla crescita delle piante. Gli effetti più evidenti dei trattamenti sono stati osservati sull’incremento dei pesi freschi, di fusto e radici (Figura 3.31).

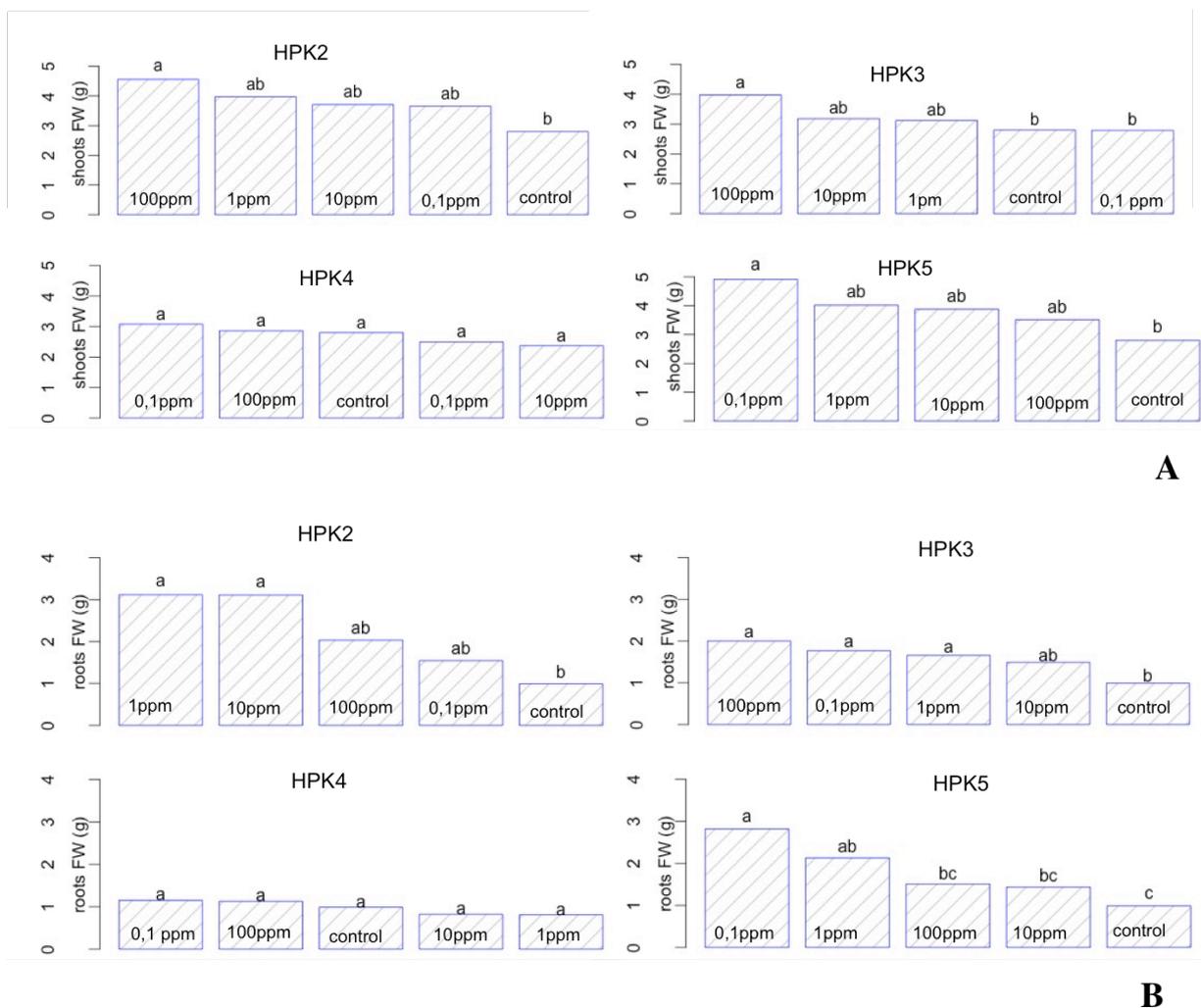


Figura 3-31: Effetto di promozione di crescita *in-vivo* delle proteine secrete dei ceppi di *Trichoderma* K su piante di mais coltivate in serra. Il grafico mostra gli effetti delle miscele proteiche estratte dai ceppi K2 (HPK2), K3 (HPK3), K4 (HPK4) e K5 (HPK5) applicati a 4 diverse concentrazioni (100ppm, 10ppm, 1ppm, 0,1ppm) sul peso fresco del fusto (A) e delle radici (B). Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$ .

I trattamenti con le proteine estratte dai ceppi K2 e K3 hanno mostrato un effetto dose dipendente che è risultato essere direttamente proporzionale alla concentrazione utilizzata producendo un incremento del 63% e del 42% rispetto alle piante controllo alla concentrazione di 100 ppm. Le proteine dei ceppi “K2” e “K3” inoltre hanno aumentato il peso fresco delle radici rispettivamente di 215% e 216% alle concentrazioni di 10 e 1 ppm senza mostrare differenze significative tra di loro. Le proteine estratte dal ceppo K5 hanno prodotto un effetto dose dipendente inversamente proporzionale alla concentrazione utilizzata, aumentando il peso fresco del fusto e delle radici delle piante trattate con 0,1 ppm di miscela proteica del 75% e del 185% rispetto al controllo. La miscela di proteine estratte dal ceppo K4 non ha mostrato nessun effetto statisticamente significativo a nessuna delle concentrazioni saggiate.

Inoltre, è stato valutato l’effetto delle diverse miscele proteiche sul contenuto di clorofilla delle piante trattate attraverso rilevazioni con lo strumento Minolta SPAD - 502 Chlorophyll Meter. Il contenuto di clorofilla è un valore dedotto dalla misura della trasmittanza fogliare a due diverse lunghezze d’onda: 600-700 nm con picco di emissione a 650nm per la rilevazione delle clorofille, e a 900-1000 nm con picco a 940 nm per la normalizzazione dei valori di trasmittanza dovuti ad altri pigmenti fogliari (es.  $\beta$ -carotene, xantofille ecc.)

I valori rilevati dallo strumento sono riportati nel seguente grafico (Figura 3.32).

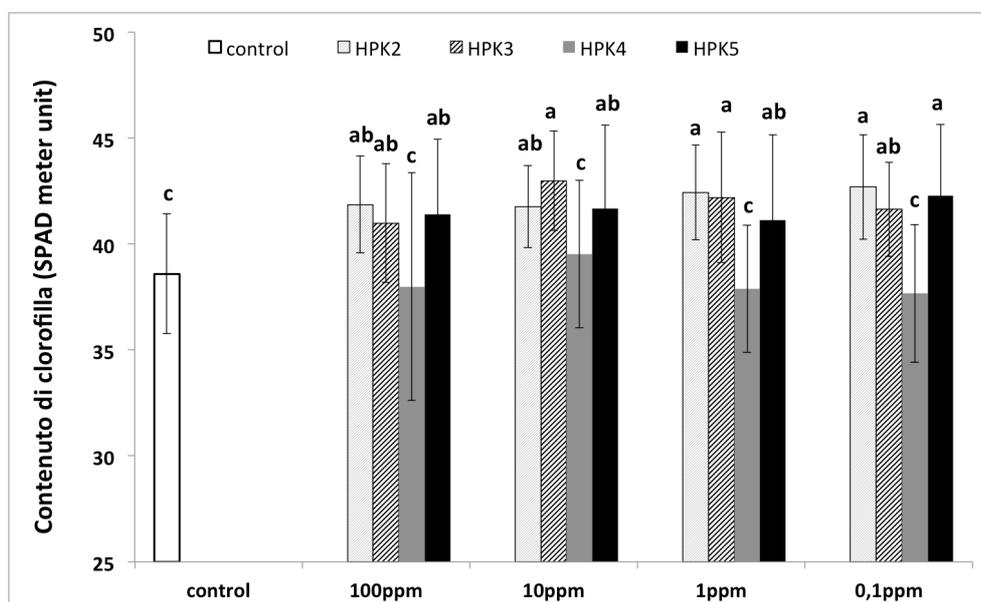


Figura 3-32: Effetto delle proteine secrete dei ceppi di *Trichoderma* “K”. K2 (HPK2), K3 (HPK3), K4 (HPK4) e K5 (HPK5) applicati a 4 diverse concentrazioni (100ppm, 10ppm, 1ppm, 0,1ppm) sul contenuto di clorofilla di piante di mais coltivate in serra espresso come SPAD meter unit. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$ .

Nelle piante trattate con le proteine estratte dai ceppi “K2”, “K3” e “K5” si è riscontrato un maggiore contenuto di clorofilla, in maniera non statisticamente significativa tra i diversi ceppi e tra le diverse concentrazioni saggate. Non sono state riscontrate differenze significative in termini di contenuto di clorofilla tra le piante trattate con le miscele proteiche del ceppo K4 e le piante controllo, in nessuna delle concentrazioni saggate.

### 3.8 Effetti di nuove combinazioni a base di Micosat F Tab Plus e Micosat F Len Plus e miscele proteiche di *Trichoderma viride* K5 sulla crescita di piante di pomodoro.

In seguito all’esperienza di promozione di crescita con le proteine secrete prodotte dai ceppi di *Trichoderma* “K” è stato selezionato il trattamento con le proteine estratte dal ceppo K5 alla concentrazione di 0,1ppm il quale ha prodotto i migliori risultati in termini di crescita sia di fusto sia di radici.

Sono state messe a punto delle nuove combinazioni basate sui prodotti Micosat F Tab Plus e Len Plus addizionate con la miscela proteica selezionata. Queste nuove combinazioni sono state saggate in un esperimento *in-vivo* in cui sono stati valutati gli effetti dei trattamenti in termini di promozione di crescita su piante di mais.

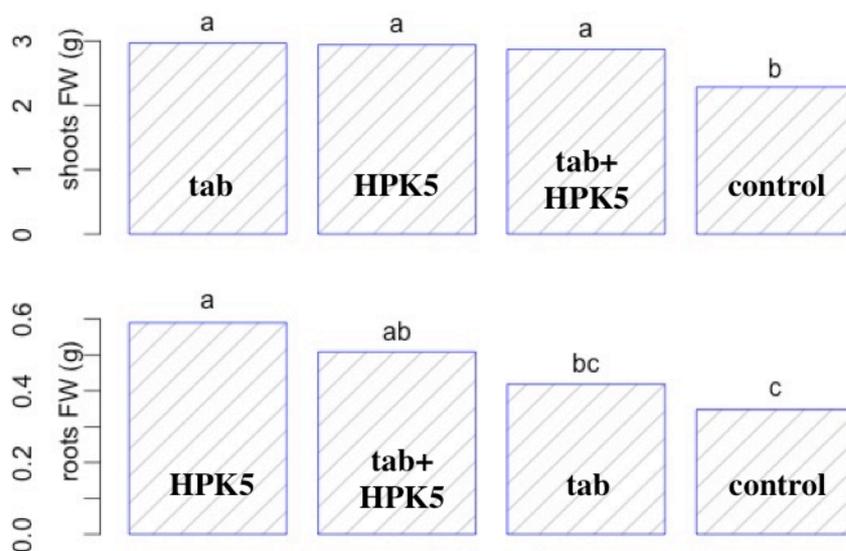


Figura 3-33: Effetto di promozione di crescita *in-vivo* della miscela proteica secreta dal ceppo K5 (HPK5) applicata alla concentrazione di 0,1ppm e della sua combinazione con Micosat Tab su peso fresco di fusto e radici di piante di mais. Lettere diverse sulle barre indicano le differenze significative per  $p < 0,05$ .

I migliori risultati in termini di promozione di crescita sono stati ottenuti sul peso fresco delle radici in seguito all'applicazione delle proteine estratte dal ceppo K5. La nuova miscela formulata composta da Tab+HPK5 non ha prodotto differenze statisticamente significative rispetto all'applicazione di entrambi i componenti applicati singolarmente.

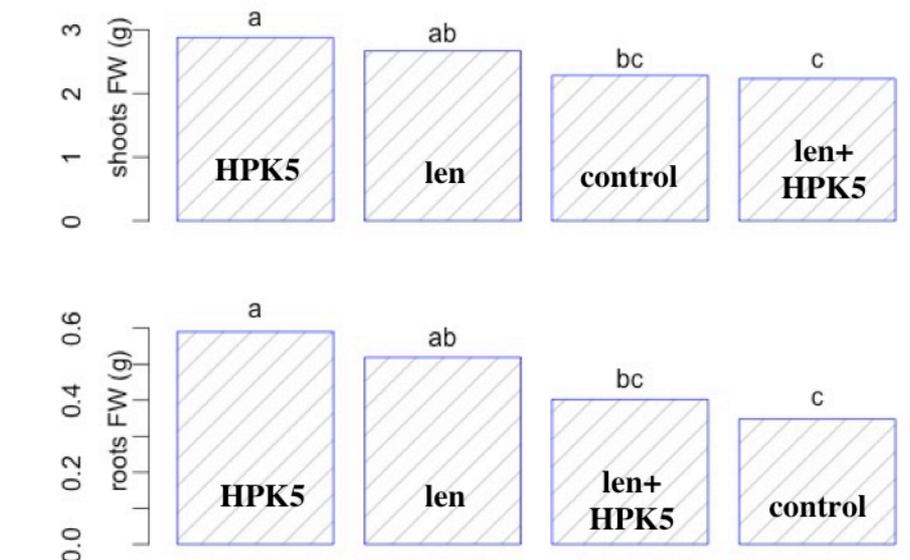


Figura 3-34: Effetto di promozione di crescita *in-vivo* della miscela proteica secreta dal ceppo K5 (HPK5) applicata alla concentrazione di 0,1ppm e della sua combinazione con Micosat Len su peso fresco di fusto e radici di piante di mais.

La nuova miscela composta da Len con le proteine estratte dal ceppo K5 al contrario ha prodotto una diminuzione del peso fresco di fusto e di radici inferiore ai quello delle piante trattate con i singoli componenti e non ha mostrato differenze significative rispetto alle piante trattate con sola acqua.

## 4 Discussione

Una delle strategie più utilizzate per aumentare l'efficacia di biocontrollo e/o di bio stimolazione è rappresentata dallo sviluppo di miscele di BCA composte da agenti microbici di varia natura. Questi consorzi microbici possono agire in maniera più consistente ed efficace rispetto ai singoli microrganismi per il controllo delle malattie e la crescita delle piante (Whipps 2001). L'efficacia dei singoli agenti di biocontrollo che compongono le miscele microbiche può essere condizionata dai parametri ambientali che ne limitano la applicabilità (Larkin et al., 1998; Meyer e Roberts, 2002; Huang et al 2000).

La variabilità dei risultati da parte di agenti microbici è stata attribuita a fattori biotici e abiotici. I fattori biotici includono interazioni con microrganismi non-bersaglio, una diversa capacità di colonizzazione del suolo o della rizosfera che può variare a seconda del livello di popolazione iniziale, e la diversità genetica dei patogeni bersaglio e delle piante o cultivar ospiti (Stirling, 1991; Pierson e Weller, 1994; Kerry e Bourne, 1996; Raupach e Kloepper, 1998; Meyer e Roberts, 2002). I fattori abiotici includono le variazioni climatiche e le variazioni della composizione fisica e chimica del suolo o della rizosfera (Stirling, 1991; Ownley et al., 1992).

Una soluzione valida al superamento degli ostacoli rappresentati dalle diverse condizioni ambientali che possono influenzare l'efficacia dei diversi biopesticidi e bioammendanti a base di un singolo ceppo benefico, è stata trovata in prodotti che utilizzano come principio attivo una miscela di microrganismi benefici. Questa tecnologia viene sempre più adoperata per la preparazione di formulati commerciali utili al miglioramento delle produzioni agricole.

Una popolazione di BCAs può operare attraverso una moltitudine di meccanismi di azione influenzati da fattori biotici ed abiotici in cui operano i microrganismi. Questa limitazione può essere superata grazie alla presenza di consorzi in cui operano microrganismi che usano meccanismi di azione diversi che compensano la diversa suscettibilità dei vari BCA all'ambiente (Xu et al., 2011; Elad e Stewart, "2004; ; Guetsky et al., 2002). Inoltre, l'utilizzo di combinazioni di BCA con diversi meccanismi di azione può determinare un incremento dell'efficacia in termini di biocontrollo e di promozione di crescita delle piante, rispetto a quella ottenuta dalle applicazioni individuali dei singoli microrganismi anche grazie all'instaurarsi di effetti sinergici.

Un esempio è fornito da Dunne et al. (1998) che hanno dimostrato come i due agenti antagonisti *Pseudomonas fluorescens* e *Stenotrophomonas maltophilia* controllano *Pythium* spp. su barbabietola da zucchero attraverso la produzione rispettivamente del metabolita antifungino 2,4-diacetilfloroglucunolo e di enzimi proteolici extra-cellulari. Quando applicati in consorzio, questi due microrganismi hanno mostrato un'efficacia migliore rispetto a quella ottenuta dall'applicazione dei singoli componenti, indicando un effetto sinergico tra i due meccanismi di azione.

Sung e Chung (1997), hanno dimostrato che *Streptomyces* spp. e *Bacillus cereus*, produttori di chitinasi, hanno prodotto un aumento del controllo di *Rhizoctonia* su riso quando usati in associazione con *P. fluorescens* and *Burkholderia cepacia*, produttori di metaboliti secondari ad effetto antibiotico.

Guetsky et al., (2002) hanno dimostrato che *Pichia guilhermondii* e *Bacillus mycoides*, agiscono sinergicamente sul controllo di *Botrytis cinerea* su foglie di fragola utilizzando meccanismi di azione diversi. Infatti, *P. guilhermondii* compete con *Botrytis* per i nutrienti (glucosio, saccarosio, adenina, istidina e acido folico), e *B. mycoides* esplica la sua azione di protezione della pianta attraverso la produzione di metaboliti secondari volatili e non volatili che inducono resistenza in pianta.

I due bioformulati Micosat oggetto di questo studio sono costituiti da complesse miscele di microrganismi considerati agenti di biocontrollo e/o biostimolanti. In entrambi i prodotti sono presenti micorrizze arbuscolari appartenenti al genere *Glomus*: (*G. coronatum* GU 53, *G. caledonium* GM 24, *G. intraradices* GG 31, *G. mosseae* GP 11 e *G. viscosum* GC 41) e batteri rizosfera-competenti (*Bacillus subtilis* BA 41 e *Streptomyces* spp. SB 14). La differenza principale tra i due prodotti è rappresentata dalla composizione della frazione di funghi saprofiti. In particolare, il Micosat F Tab Plus WP (Tab) contiene due ceppi appartenenti al genere *Trichoderma* (*T. harzianum* ceppo TH 01 e *T. viride* ceppo TV 03), mentre i funghi saprofiti contenuti nel Micosat F Len Plus WP (Len) sono *Beauveria bassiana* ceppo BB 48 e *Pochonia chlamydosporia* ceppo PC 50.

In letteratura sono riportati numerosi studi sugli effetti delle associazioni di funghi appartenenti al genere *Trichoderma* e micorrizze arbuscolari appartenenti al genere *Glomus*, in termini di effetto

sulla promozione di crescita delle piante ospiti e bio-controllo, con risultati alcune volte contrastanti.

Calvet et al.(1993) hanno evidenziato un effetto benefico sinergico tra *T. aureoviride* e *G. mosseae* quando coinoculati su *Tagetes erecta* in termini di aumento della biomassa e controllo del patogeno *Pythium ultimum*. Datnoff et al. (1995) hanno dimostrato un maggiore effetto positivo della consociazione dei due microrganismi su piante di pomodoro in pieno campo, in termini di controllo del marciume radicale causato da *F. oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* ed una maggiore resa produttiva quando i due agenti di biocontrollo erano consociati.

Un effetto sinergico del co-inoculo di *T. harzianum* e *G. mosseae* in termini di promozione di crescita è stato ottenuto anche da Chandanie et al. (2009) su piante di cetriolo sulle quali è stato osservato un aumento significativo di peso secco di fusto e radici, rispetto all'applicazione individuale dei due microrganismi.

Alcuni lavori mostrano invece un effetto inibitorio sulla crescita delle piante in seguito alla co-applicazione dei due funghi (McAllister et al., 1994a,b) talvolta in maniera ceppo-specifica (Martinez et al.,2004). Quest'effetto inibitorio è probabilmente spiegabile con un'azione di micoparassitismo di *Trichoderma* nei confronti del micelio delle micorrize arbuscolari (De Jaeger et al., 2011).

Altre interazioni molto studiate sono state quelle tra funghi micorrizici e batteri della rizosfera. Esistono intere comunità di batteri rizosferici associate a funghi micorrizici che hanno la funzione di favorire la simbiosi con le piante. Questi batteri, per tale motivo, sono definiti “mycorrhiza helper bacteria” (MHB), ovvero batteri aiutanti della simbiosi micorrizica e possono appartenere ai più diversi gruppi e generi: gram-negativi, Proteobatteri (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Rhizobium*), gram-positivi, Firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus*, e *Paenibacillus*) e gram-positivi Actinomiceti (*Rhodococcus*, *Streptomyces*, e *Arthrobacter*) (Bonfante et al., 2009; Klett et al., 2007; de Boer et al., 2004)

Poche sono invece le evidenze di interazioni positive tra funghi appartenenti al genere *Trichoderma* e batteri appartenenti al genere *Bacillus*. Tuttavia alcuni lavori riportano un effetto positivo del co-trattamento dei due microrganismi su pianta. Abeysinghe (2009) riporta un migliore controllo di *Rhizoctonia solani* su *Solanum melongena* e *Capsicum annuum* con i trattamenti combinati di *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*. Srinath et al. (2002) mostrano come trattamenti combinati di *T. harzianum* e *B. coagulans* aumentano la nutrizione e

la crescita delle piante di *Ficus benjamina*. Nello stesso lavoro, un dato ancora più interessante è che i parametri analizzati aumentavano ulteriormente quando le piante erano trattate anche con *Glomus mosseae*, come terzo componente della miscela.

Nel presente lavoro, sono stati combinati diversi ceppi di *Trichoderma* o metaboliti secondari di *Trichoderma* con Tab e Len e sono stati valutati per la loro capacità di biocontrollo e di promozione della crescita delle piante. In queste combinazioni, la popolazione microbica che costituisce i prodotti commerciali in uso è stata considerata come un'unica entità attiva.

I risultati ottenuti dai primi esperimenti in cui sono stati combinati i diversi ceppi di *Trichoderma* con Tab e Len, hanno consentito di selezionare due miscele, per ciascuna delle formulazioni commerciali in esame. Le miscele che hanno prodotto il miglioramento più consistente dei parametri biometrici analizzati, rispetto a piante non trattate o piante trattate con i prodotti commerciali singoli sono state quelle ottenute miscelando Tab con K4 e T22, mentre per il Len sono state K2 e T22. I risultati ottenuti da queste miscele però non sono stati significativamente diversi dai trattamenti con i ceppi di *Trichoderma* applicati da soli. Questo risultato probabilmente indica che in condizioni controllate come quelle di serra in cui è stato utilizzato un suolo axenico, i ceppi di *Trichoderma* hanno avuto un effetto predominante sull'altro componente della miscela.

Successivamente queste nuove combinazioni sono state saggiate esperimenti in pieno campo per valutarne l'efficacia in condizioni ambientali non controllate, e quindi diverse da quelle in cui sono state inizialmente selezionate

Si evidenzia un generale incremento della crescita delle piante ed un aumento delle rese produttive al termine dei trattamenti. Questi effetti sono ben noti e riportati per molti dei singoli microrganismi presenti nelle miscele (Kloepper et al., 2004; Lugtenberg e Kamilova, 2009; Harman, 2000; Harman et al., 2004; Lorito et al., 2010; Shores et al., 2010; Gerdemann 1968; Mosse, 1973; Mosse et al., 1976)

L'esperimento in campo ha mostrato che il trattamento più efficace è stato quello con il ceppo K4 quando applicato da solo. La miscela con Tab non si è dimostrata significativamente diversa in termini di Kg di frutti prodotti, confermando i risultati ottenuti dall'esperimento in serra. Al contrario le miscele di Len con i ceppi di *Trichoderma* selezionati non hanno prodotto risultati statisticamente diversi dallo stesso Len, indicando che probabilmente in queste condizioni ambientali, i microrganismi presenti nel Len hanno avuto un effetto predominante in questa miscela.

Uno dei principali meccanismi, che i microrganismi benefici utilizzano per proteggere le piante ospite è l'induzione di resistenza sistemica. Questo meccanismo è ben noto per i funghi del genere *Trichoderma* (Woo et al., 2006; Harman et al., 2004; Lorito et al., 2010; Shores et al., 2010) che attraverso la produzione di una serie di molecole effettrici (MAMPs) (metaboliti secondari, idrofobine, proteine tipo expansine etc), elicitano le risposte di difesa della pianta che risponde attivando una cascata di reazioni enzimatiche attraverso la produzione di proteine di difesa (PR-proteins) e attivano reazioni coinvolte nel pathway biosintetico del metabolismo secondario della pianta (Shores et al. 2010; Lorito et al. 2010). L'acido salicilico è uno degli ormoni chiave coinvolto nell'induzione di resistenza sistemica della pianta ed è uno dei primi prodotti del pathway biosintetico dei fenilpropanoidi. I fenilpropanoidi sono una classe di molecole polifenoliche, antiossidanti chiamate anche fitoalessine che sono prodotte dalla pianta con la funzione di proteggerla e ridurre lo stress ossidativo provocato dalla produzione di ROS (reactive oxygen species) in seguito agli stress subiti da agenti biotici o abiotici (Dixon e Paiva 1995; Hammerschmidt, 1999).

La stessa funzione nella pianta è svolta anche da un'altra classe di molecole antiossidanti che sono i carotenoidi. Il primo enzima del pathway biosintetico dei carotenoidi è la phytoene sintasi. (Giuliano et al., 1993). L'acido abscissico (ABA) è un altro fito-ormone coinvolto nelle risposte della pianta a stress biotici e abiotici (Apel e Hirt, 2004; Fujita et al., 2006). È stato dimostrato come la biosintesi di ABA derivi dal pathway biosintetico dei carotenoidi e come la produzione di queste molecole sia una risposta diretta agli stress subiti dalla pianta (Nambara e Marion-Poll, 2005).

Licopene e  $\beta$ -carotene sono tra i principali carotenoidi antiossidanti presenti nei frutti di pomodoro; il loro incremento ed il conseguente aumento dell'attività antiossidante totale dei frutti di pomodoro è stato già riportato in letteratura come conseguenza a stress biotici e abiotici (Pane et al., 2010; Borghesi et al., 2011; Vallverdú-Queralt et al., 2012). In letteratura sono riportate evidenze che mostrano come anche la simbiosi delle piante con funghi micorrizici o PGPR stimoli il metabolismo coinvolto nelle risposte a stress ossidativo e più in particolare la produzione di carotenoidi antiossidanti come licopene e  $\beta$ -carotene (Latef e Chaoping, 2011; Hart et al., 2015; Fester et al., 2002).

Un maggiore contenuto di licopene e  $\beta$ -carotene, così come l'aumento dell'attività antiossidante è stata riscontrata anche nei frutti prodotti nell'esperimento in campo come diretta conseguenza

dei trattamenti effettuati. Infatti l'analisi dei frutti ha mostrato come tutti i trattamenti hanno prodotto un incremento dei parametri presi in esame. In particolar modo, il trattamento più efficace è stato la miscela di Len+T22 in maniera statisticamente significativa rispetto all'applicazione del prodotto commerciale da solo, per quanto riguarda il contenuto dei due carotenoidi ma non statisticamente significativa per l'attività antiossidante. Anche il trattamento Tab non ha prodotto risultati statisticamente diversi da quelli ottenuti dall'applicazione delle nuove miscele di Tab. Questi risultati indicano che il Micosat Tab ha avuto un effetto predominante all'interno delle nuove miscele in termini sia di attività antiossidante che di contenuto di carotenoidi. Il Len invece ha avuto un effetto predominante soprattutto in termini di attività antiossidante ma la miscela Len+T22 ha mostrato un effetto sinergico dei due componenti in termini di contenuto di licopene e  $\beta$ -carotene. Questa differenza suggerisce che probabilmente il trattamento con il solo Micosat Len ha avuto un effetto maggiore anche su altre specie antiossidanti prodotte dalla pianta durante l'interazione con i microrganismi benefici applicati.

Un aumento della produzione di carotenoidi come conseguenza dell'attivazione delle vie biosintetiche di difesa della pianta è anche evidenziata da un'induzione della resistenza sistemica dimostrata da un maggiore controllo di agenti patogeni.

I risultati relativi al biocontrollo infatti mostrano come i trattamenti effettuati hanno indotto una maggiore resistenza all'attacco naturale di *Alternaria solani* sui frutti di pomodoro. Tutti i trattamenti hanno indotto una riduzione dell'incidenza della malattia e i risultati migliori sono stati ottenuti dall'applicazione dei soli prodotti commerciali Tab e Len. E' interessante notare che le nuove miscele messe a punto non hanno prodotto differenze significative in termini di resistenza al patogeno, indicando che i prodotti commerciali in questo caso sono stati la componente predominante responsabile dei risultati ottenuti.

Il saggio di interazione con la pianta parassita *Phelipanche ramosa* ha indicato che i trattamenti effettuati hanno stimolato la germinazione e crescita delle *Phelipanche*. L'unico trattamento in cui non è stato riscontrato quest'effetto è stato l'applicazione del Micosat Len da solo che non ha prodotto una differenza significativa nel numero di tubercoli e di turioni emersi rispetto alle piante controllo inoculate con *Phelipanche*.

Le *Phelipanche* sono piante parassite che non hanno la possibilità di fotosintetizzare e che dipendono totalmente dal loro ospite per i loro bisogni nutrizionali (Parker, 2009; Cardoso et

al.,2011). Per questo motivo la germinazione dei semi di queste piante parassite avviene solo se esposti a specifiche molecole segnale (presenti negli essudati radicali) prodotte dalle piante ospiti che quindi ne inducono la germinazione (Parker, 2009; Cardoso et al.,2011). Queste molecole appartengono alla classe degli strigolattoni e sono in grado di stimolare la germinazione delle piante parassite anche a concentrazioni molto basse. Queste molecole prendono origine dalla via biosintetica dei carotenoidi (Matusove et al., 2005) e appartengono ad una specifica classe che prende il nome di apocarotenoidi. Il 9-*cis*- $\beta$ -carotene è stato identificato come substrato per la sintesi dello strigolattone. I principali enzimi coinvolti nella sintesi dello strigolattone sono i *Carotenoid cleavage dioxygenase 7* e *Carotenoid cleavage dioxygenase 8* (CCD7, CCD8) (Alder et al., 2012; Vogel et al., 2010; Kohlen et al., 2012).

Kohlen et al., (2012) hanno dimostrato che il silenziamento del gene *SICCD8* in pomodoro ha ridotto del 90% la germinazione di *Phelipanche ramosa*.

Lo strigolattone, oltre che essere una molecola segnale per la germinazione di *Phelipanche ramosa* è anche un fattore di stimolazione della divisione ifale delle micorrize arbuscolari e la sua produzione nella pianta è incrementata da particolari condizioni di stress abiotico come la carenza di acqua o di nutrienti (Mosse e Hepper, 1975; Giovannetti et al., 1994; López -Ráez, 2008; Yoneyama et al., 2007). Questo è uno dei principali meccanismi di riconoscimento pianta-micorrize e che conduce al successo della colonizzazione delle radici da parte del fungo simbionte (Buee et al., 2000; Nagahashi e Douds, 2000; Giovannetti e Sbrana, 1998). Le *Phelipanche*, così come le piante parassite appartenenti ai generi *Orobanca* e *Striga* hanno probabilmente hanno sviluppato un meccanismo di riconoscimento delle molecole segnale simile a quello tra pianta ospite e micorrize per riconoscere a loro volta la presenza della pianta ospite e poter quindi germinare e attivare i processi di parassitismo (Cardoso et al., 2010).

È stato riportato che in pomodoro la simbiosi con le micorrize arbuscolari ha ridotto la germinazione dei semi e il parassitismo di *Phelipanche ramosa*. Successive analisi hanno anche mostrato una minore concentrazione di strigolattone negli essudati radicali delle piante colonizzate da micorrize (López-Ráez 2011). Questi risultati suggeriscono una maggiore resistenza della pianta ospite nei confronti della pianta parassita. Tuttavia i meccanismi con cui si attua questa riduzione del parassitismo non sono ancora del tutto chiari e non è da escludere un maggiore assorbimento di strigolattone da parte del fungo simbionte o una minore produzione della molecola segnale da parte della pianta ospite nel momento in cui migliorano le condizioni nutrizionali della pianta. Altri dati invece dimostrano che una delle molecole intermedie nella via

biosintetica dello strigolattone viene convertita in micorradicina, che è un apocarotenoide che si accumula nelle radici micorrizzate. Queste due vie biosintetiche probabilmente competono tra loro portando a una minore produzione di strigolattone (Walter et al., 2010; Lendzemo et al., 2005).

L'aumento della germinazione e dell'attacco da parte di *Phelipanche ramosa* nel saggio effettuato è riconducibile probabilmente ad un aumento della biosintesi dei carotenoidi indotta dai trattamenti con gli agenti di bio-controllo e dimostrata anche dall'analisi effettuata sui frutti raccolti. Diversamente dai dati riportati in letteratura, i trattamenti con micorrize arbuscolari non hanno diminuito l'incidenza dell'infestazione. Questo dato probabilmente è attribuibile alla presenza di molti microrganismi all'interno delle miscele di trattamento di cui, ad oggi non si conosce l'interazione specifica che si determina tra loro, le piante ospiti e le piante parassite.

I ceppi "K" appartenenti al genere *Trichoderma*, utilizzati per la formulazione delle nuove miscele con i prodotti commerciali Micosat, sono stati completamente caratterizzati per la produzione di metaboliti secondari. I composti rilasciati dai ceppi "K" nel mezzo di crescita sono: (1) il 6-pentil-a-pirone (6-Pentyl-pyran-2-one); (2) l'harzianolide (4-Hexa-2,4-dienyl-3-(2-hydroxy-propyl)-5H-furan-2-one); (3) il deidro-harzianolide (4-Hexa-2,4-dienyl-3-propenyl-5H-furan-2-one).

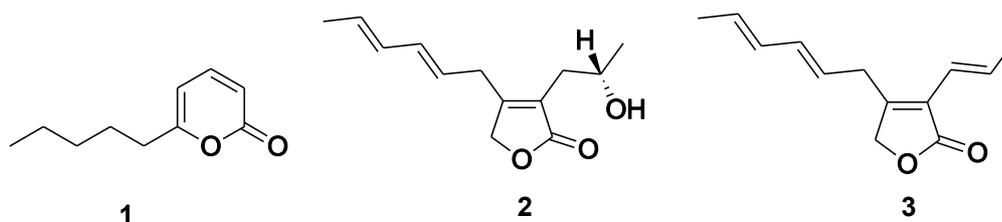


Figura 4-1: Formule di struttura delle molecole isolate dai ceppi "K" (1) 6PP; (2) harzianolide; (3) deidro-harzianolide

Harzianolide e deidroharzianolide, entrambi prodotti dai ceppi "K2" e "K3", sono stati isolati e caratterizzati per la prima volta da Almassi et al., (1991) da un ceppo selezionato di *Trichoderma harzianum* in grado di promuovere la crescita di grano e di controllare *Gaeumannomyces graminis* var. tritici (Ghisalberti et al., 1990). Queste molecole appartengono alla classe dei butenolidi e idrossi-lattoni (Vinale et al., 2014). La produzione di questi metaboliti è stata riscontrata in diversi ceppi di *Trichoderma harzianum* (Vinale et al., 2011; Vinale et al., 2006; Claydon et al., 1991; Ordentlich et al., 1992) e sono state più volte isolate per la loro attività

antibiotica *in-vitro*, di biocontrollo e di induzione di resistenza, contro diversi agenti patogeni (Vinale et al., 2008a; Vinale et al., 2006; Ordentlich et al., 1992; Ghisalberti et al., 1990).

Il 6-pentil- $\alpha$ -pirone (6PP), prodotto dai ceppi “K3”, “K4” e “K5” è una molecola appartenente alla classe dei pironi isolata per la prima volta da Collin e Halim da un brodo di coltura di *T. viride* (1972). Da allora la sua produzione è stata riportata per molte specie di *Trichoderma* ed è stata caratterizzata la sua attività antibiotica *in-vitro*, la sua attività di bio-controllo e di induzione di resistenza *in-vivo* nei confronti di numerosi agenti fitopatogeni (Scarselletti e Faull, 1994; Parker et al., 1997; Vinale et al., 2008a; Vinale et al., 2008b; Arjona-Girona et al., 2014). Inoltre la capacità di biocontrollo di diversi ceppi di *Trichoderma koningii* è stata direttamente correlata alla produzione di questa molecola (Worasatit et al., 1994).

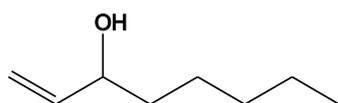
I metaboliti secondari isolati dai ceppi “K”, harzianolide e 6PP, sono anche noti per la loro capacità di promuovere la crescita delle piante. Vinale et al. (2008) mostrano come le applicazioni esogene di harzianolide e 6PP promuovano la crescita di germogli di grano, pomodoro e colza soprattutto a basse concentrazioni (1 ppm). Inoltre, irrorazioni fogliari su piantine di pomodoro per 21 giorni inducono un incremento del vigore della pianta e soprattutto delle radici, in particolar modo per le piante trattate con 6PP quando applicato alla concentrazione 1 $\mu$ M. Cai et al (2013) riportano ulteriori evidenze dell'effetto di harzianolide sulla promozione della crescita di piante di pomodoro e di induzione di resistenza attraverso l'attivazione delle vie biostintetiche di acido salicilico, jasmonato ed etilene. Vinale et al. (2008a) ipotizzano che il 6PP promuove la crescita delle piante con un meccanismo di azione simile a quello dell'auxina e di composti auxino-simili, promuovendo la crescita delle piante a basse concentrazioni ed inibendola ad alte concentrazioni. Garnica-Vergara et al. (2015) hanno dimostrato come 6PP stimoli la crescita di radici laterali in *Arabidopsis* soprattutto a basse concentrazioni e correlano questa risposta fenotipica ad una sovra espressione dei geni responsabili del trasporto di auxina.

Nel presente lavoro, i metaboliti di *Trichoderma* 6PP, acido harzianico e 1-octen-3-olo, sono stati selezionati per la formulazione di nuove miscele con i prodotti Micosat.

L'acido harzianico isolato dal ceppo di *Trichoderma harzianum* M10 è noto per la sua attività antibiotica *in vitro* nei confronti di diversi agenti patogeni e di promozione della crescita di piante (Vinale et al. 2009). È stata dimostrata inoltre la sua capacità di chelare il ferro in maniera stabile e di aumentarne la biodisponibilità per le piante (Vinale et al. 2013).

L' 1-octen-3-olo (Figura 4.2), è uno dei più comuni metaboliti secondari volatili di origine fungina. I composti volatili organici (VOC) sono molecole volatili capaci di esistere in forma gassosa alle normali condizioni di pressione atmosferica e temperatura (Morath et al., 2001). Queste sostanze naturali possono essere prodotte da molti organismi viventi (piante, microrganismi ecc.) ed hanno un ruolo importante nella comunicazione tra i diversi organismi, grazie alla loro capacità di diffondere a grande distanza per via atmosferica, anche attraverso vie tortuose come la struttura porosa del suolo (Wheatly, 2002; Aochi and Farmer, 2005). I VOC possono avere un ruolo anche nel controllo biologico. Minerdi et al., (2009) riportano il ruolo dei composti volatili di un *Fusarium oxysporum* che, in associazione con il suo consorzio microbico e senza contatto diretto fra i microorganismi, sono capaci di controllare lo sviluppo di un ceppo patogeno di *Fusarium*.

Figura 4-2: Formula di struttura del 1-octen-3-olo o oct-1-en-3-ol



Lutz et al., (2004) hanno dimostrato che alcuni composti volatili di *T. atroviride* hanno la capacità di incidere positivamente nell'interazione con un ceppo benefico di *Pseudomonas fluorescens*, aumentando l'espressione di geni direttamente correlati alla sua capacità di biocontrollo. I VOC di origine fungina possono anche spiegare un ruolo nell'interazione benefica pianta-microorganismi, promuovendo la crescita delle piante e attivando le risposte di difesa (Morath et al., 2001). I VOC prodotti da un ceppo di biocontrollo di *Fusarium* in associazione con il suo consorzio batterico hanno mostrato la capacità di inibire la crescita di un ceppo patogeno di *Fusarium oxysporum* ed in più di promuovere la crescita di piante di lattuga grazie al contributo del  $\beta$ -caryophyllene. Negli esperimenti di questo lavoro l'1-octen-3-olo ha indotto una sovrpressione dei geni correlati alla resistenza sistemica delle piante, appartenenti alla via biosintetica del jasmonato e dell'etilene, e ha quindi stimolato la resistenza all'attacco di *Botrytis cinerea*.

Gli esperimenti condotti utilizzando le associazioni di metaboliti secondari con il prodotto commerciale Micosat Tab hanno mostrato che l'unico trattamento che ha indotto un incremento del peso fresco del fusto, statisticamente significativo rispetto al controllo è stato quello con

Tab+6PP. Questo trattamento comunque non ha prodotto risultati significativamente diversi dall'applicazione del solo 6PP indicando che l'effetto positivo ottenuto è attribuibile principalmente al metabolita secondario. Diversamente l'unico incremento statisticamente significativo in queste associazioni è stato ottenuto dall'applicazione del solo Tab che non ha comunque prodotto differenze significative rispetto all'applicazione dei metaboliti secondari da soli.

Un risultato interessante è stato ottenuto dalle associazioni del Micosat Len con i metaboliti secondari di *Trichoderma*. L'incremento più consistente del peso fresco del fusto è stato ottenuto dall'associazione di Len+1-octen-3-olo. Questo trattamento ha prodotto un risultato significativamente diverso da tutti gli altri trattamenti effettuati, suggerendo un'interazione sinergica tra i due componenti della miscela. Non sono stati indagati i meccanismi che determinano questa sinergia ma si possono ipotizzare sia un effetto benefico del VOC sui microrganismi presenti nel prodotto commerciale, come già riportato nel lavoro di Lutz et al. (2004), sia un effetto mediato dalla pianta, in cui una sovraespressione delle risposte di difesa, come riportato da Kioshimoto et al. (2006) potrebbe portare ad una specifica produzione di essudati radicali che rappresentano molecole segnale per micorrize e altri microrganismi benefici (Berg, 2009; Lugtenberg and Kamilova, 2009; Bais et al., 2006; Buee et al., 2000).

Lo studio del secretoma è lo studio di un particolare sottoinsieme del proteoma che comprende solo le proteine secrete, ovvero quelle con il peptide segnale di secrezione. Le proteine secrete sono al centro del dialogo molecolare tra i funghi e le loro piante ospiti (Lamdant et L., 2015).

In questo lavoro è stata focalizzata l'attenzione sulla caratterizzazione di un particolare sottoinsieme delle proteine secrete da *Trichoderma*: le Small Secreted Cysteine-rich Proteins, (SSCPs) ovvero, piccole proteine secrete ricche di residui cisteinici (Druzhinina et al., 2012).

Le proteine in questione sono tutte accomunate da caratteristiche fisico-chimiche simili:

- i) sono anfipatiche;
- ii) hanno residui idrofobici e idrofili;
- iii) e sono capaci di cambiare la polarità della soluzione in cui sono immerse.

Queste caratteristiche forniscono a questo gruppo di proteine la capacità di auto-assemblaggio all'interfaccia aria-liquido e la capacità di formare bio-film (Gaderer et al., 2014; Linder et al., 2009; Wosten et al., 1993). Le caratteristiche comuni hanno consentito l'utilizzo di un metodo di estrazione semplice e selettivo realizzato per raccolta della schiuma prodotta all'interfaccia aria-

liquido. La schiuma si produce nel corso della crescita in agitazione del fungo in substrato liquido per incorporazione di aria all'interno del bio-film che si forma durante l'auto-assemblaggio (Wosten et al., 1993).

In questo grande gruppo di proteine di *Trichoderma* sono state identificate tutte le proteine secrete con un numero di amminoacidi  $\leq$  a 300 (Martin et al., 2008) e con almeno 4 residui di cisteina (Kubicek et al., 2011). L'analisi di similarità di sequenza ha permesso di suddividere ulteriormente questo gruppo in altri 4 sottogruppi. Le più note tra queste sono le idrofobine (Druzhinina et al. 2012).

Queste proteine anfipatiche, caratterizzate dall'aver un motivo spazialmente conservato di 8 cisteine, sono presenti sulla superficie esterna della parete cellulare di ife e conidi dei funghi che le producono e grazie alla loro capacità di abbassare la tensione superficiale dell'acqua o del liquido in cui sono presenti permettono a questi una vita aerea e quindi di sopravvivere ed adattarsi all'ambiente (Linder et al., 2005; Druzhinina et al., 2012). Inoltre, grazie alla capacità di essere fortemente adesive è stato dimostrato il loro ruolo nell'interazione di *Trichoderma* con la pianta ospite permettendo l'adesione delle ife alle radici (Viterbo and Chet, 2006).

Ruocco et al., (2014) hanno isolato e caratterizzato una idrofobina da un ceppo di *Trichoderma longibrachiatum* particolarmente attivo in termini di biocontrollo e promozione di crescita delle piante. L'attività di questo ceppo è stata fortemente compromessa in seguito a knockout del gene dell'idrofobina ed inoltre è stata anche dimostrata l'attività diretta su pianta della proteina isolata sia in termini di promozione di crescita sia di induzione di resistenza.

La seconda famiglia di proteine, appartenenti al gruppo delle SSCPs, sono le proteine con dominio conservato di cerato-platanine. A questa famiglia, appartiene la proteina Sm1 isolata da *T. virens* e la sua ortologa, Epl1 isolata da *T. atroviride*. È stato dimostrato che queste due proteine hanno un ruolo nell'interazione pianta-*Trichoderma*. Djonovic et al. (2007 a,b) hanno dimostrato come la proteina Sm1 svolga un ruolo chiave nell'induzione di resistenza in piante di cotone e mais, attivando anche la via biosintetica dell'acido jasmonico. La proteina Epl1 è stata caratterizzata per la prima volta da Seidl et al., (2006) che ha anche ipotizzato una similarità con le idrofobine per la presenza contemporanea di domini idrofobici e idrofili. Recentemente, Vieira Gomes et al. (2015) hanno dimostrato come la proteina Epl1 è coinvolta sia nel meccanismo di interazione con la pianta, permettendo il riconoscimento del *Trichoderma* come simbionte, sia nella espressione di geni del micoparassitismo e di induzione di resistenza in pianta.

All'interno di questo gruppo di proteine sono inoltre presenti anche proteine con dominio CFEM o sequenze consenso per glicosil-fostatidil-inositolo (GPI anchors). Non è possibile predire la funzione di queste proteine, ma la forte conservazione di geni che codificano per queste proteine suggerisce una loro funzione come proteine di superficie cellulare con un importante ruolo nell'interazione con altri microrganismi, come avviene in *Candida albicans* (Druzhinina et al., 2012; Perez et al., 2011).

Un ultimo gruppo di SSCP è quello costituito da piccole proteine di circa 150 amminoacidi con 18 residui cisteinici. Questo gruppo di proteine è stato riscontrato in maniera più o meno abbondante in tutti i ceppi di *Trichoderma* analizzati, tranne che nelle proteine estratte dal ceppo K5. Non è ancora nota la funzione di questo gruppo di proteine, ma è stata trovata una sovra-espressione del gene che codifica per la proteina EHK19462.1 (JGI ID) in *Trichoderma* quando cresciuto in un substrato arricchito di parete cellulari di *Fusarium solani*. La proteina codificata da questo gene è quella che ha mostrato la maggiore similarità con la proteina hypothetical protein THAR02\_00961 [*Trichoderma harzianum*] 2::gil818167537 (NCBI ID) isolata dal ceppo K3.

I risultati ottenuti dall'applicazione delle miscele proteiche isolate dai diversi ceppi di *Trichoderma* confermano il ruolo che queste hanno nell'interazione pianta-*Trichoderma* e mostrano come l'applicazione esogena può rappresentare una valida alternativa all'utilizzo dei microrganismi vivi.

Gli esperimenti condotti non hanno permesso di attribuire direttamente un effetto ad una determinata proteina ma è verosimile che le differenze ottenute potrebbero essere riconducibili alla diversa abbondanza relativa delle famiglie proteiche rappresentate negli estratti. Queste famiglie infatti, anche se hanno caratteristiche simili tra loro, presentano comunque delle differenze. Le idrofobine e le cerato-platanine, per esempio, hanno una diversa solubilità e una opposta capacità di cambiare la polarità della soluzione in cui sono disciolte (Gaderer et al., 2014). Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che le piante trattate con gli estratti proteici dei ceppi K2 e K3, che condividono la maggior parte delle proteine più abbondanti, hanno prodotto delle differenze in termini di promozione di crescita delle piante, con un andamento simile tra loro, mostrando un incremento della crescita direttamente proporzionale alla dose utilizzata.

La migliore miscela proteica in termini di promozione di crescita in tutti i parametri considerati, è stata quindi selezionata per creare una nuova formulazione costituita dalla combinazione delle

proteine estratte dal ceppo K5, utilizzate alla concentrazione di 0,1 ppm, con i prodotti commerciali Micosat Tab e Len.

I risultati ottenuti mostrano che il trattamento più efficace è stato l'applicazione delle proteine da sole e non sono state ottenute differenze significative quando applicate in miscela con il Micosat Tab. Questo indica che l'effetto della nuova miscela è attribuibile principalmente all'applicazione delle proteine. Diversamente, la combinazione delle proteine con il Micosat Len ha prodotto un effetto negativo rispetto all'applicazione dei due singoli componenti indicando quindi un loro probabile reciproco effetto inibitorio.

## 5 Conclusioni

Le nuove formulazioni messe a punto, costituite dai ceppi di *Trichoderma* selezionati e da Micosat Tab e Len, hanno migliorato l'efficacia dei prodotti commerciali, soprattutto in termini di promozione di crescita, sia in serra sia in pieno campo, senza mostrare differenze significative rispetto all'applicazione individuale dei ceppi di *Trichoderma*. Inoltre, i risultati nelle due diverse condizioni adottate (serra e pieno campo) hanno evidenziato una significativa variabilità, probabilmente dovuta alle diverse condizioni ambientali in cui sono stati condotti gli esperimenti. Le nuove miscele hanno mostrato una buona capacità di biocontrollo di *Alternaria solani* in pieno campo anche se non significativamente diversa da quella dell'applicazione individuale dei due prodotti commerciali. In generale, anche se non sono stati rilevati effetti sinergici evidenti rispetto ai due componenti singoli, le miscele hanno migliorato le produzioni in quasi tutti i casi analizzati, confermando l'ipotesi che l'aggiunta di un ceppo di *Trichoderma* appositamente selezionato consente di ottenere risultati più consistenti.

La caratterizzazione metabolomica e proteomica dei ceppi di *Trichoderma* rappresenta uno strumento importante per l'isolamento di sostanze naturali bioattive e per la comprensione dei meccanismi di interazione tra i componenti delle interazioni complesse (tra i ceppi, ceppi/piante ceppi/altri microrganismi componenti della miscela, etc.). Questa caratterizzazione ha consentito di progettare e realizzare prodotti innovativi contenenti componenti aggiuntivi (le molecole purificate) e valutando i meccanismi di azione dei singoli composti. Queste valutazioni sono frutto di esperimenti preliminari che vale la pena di approfondire, aumentando per esempio lo spettro delle molecole da saggiare e trasportando le osservazioni su una scala di pieno campo

## 6 Bibliografía

1. Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th eds.
2. Abeysinghe, S. (2009). Effect of Combined Use of *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RUOI on Biological Control of *Rhizoctonia satani* on *Solanum melongena* and *Capsicum annuum*. *Plant Pathology Journal*, 8(1), 9-16.
3. Adams, P., De-Leij, F. A. A. M., & Lynch, J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecology*, 54(2), 306-313.
4. Ahmad, J. S., & Baker, R. (1988). Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(3), 229-234.
5. Alabouvette, C., & Lemanceau, P. (1999). Joint action of microbials for disease control. *Biopesticides: Use and Delivery*, 117-135.
6. Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., Ghisla, S., Bouwmeester, H., Beyer, P. and Al-Babili, S., 2012. The path from  $\beta$ -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*, 335(6074), pp.1348-1351.
7. Almassi, F., Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J. and Sivasithamparam, K., 1991. New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 54(2), pp.396-402.
8. Alström, S. (1991). Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 37(6), 495-501.
9. Aochi, Y. O., & Farmer, W. J. (2005). Impact of soil microstructure on the molecular transport dynamics of 1, 2-dichloroethane. *Geoderma*, 127(1), 137-153.
10. Arjona-Girona, I., Vinale, F., Ruano-Rosa, D., Lorito, M., & López-Herrera, C. J. (2014). Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot. *European Journal of Plant Pathology*, 140(2), 385-397.
11. Bailey, K. L., Boyetchko, S. M., & Längle, T. (2010). Social and economic drivers shaping the future of biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological Control*, 52(3), 221-229.
12. Bais, H. P., Park, S. W., Weir, T. L., Callaway, R. M., & Vivanco, J. M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in plant science*, 9(1), 26-32.
13. Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
14. Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
15. Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8), 1225-1228.

16. Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.
17. Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.
18. Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R. A., Ulrich, A., & Hallmann, J. (2005b). Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), 215-229.
19. Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., & Smalla, K. (2006). The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 250-261.
20. Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A., & Smalla, K. (2002). Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied and environmental Microbiology*, 68(7), 3328-3338.
21. Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A., & Smalla, K. (2002). Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied and environmental Microbiology*, 68(7), 3328-3338.
22. Björkman, T., Blanchard, L. M., & Harman, G. E. (1998). Growth enhancement of shrunken-2 (sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(1), 35-40.
23. Bonfante, P., & Anca, I. A. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual review of microbiology*, 63, 363-383.
24. Bonfante, P., & Genre, A. (2008). Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in plant science*, 13(9), 492-498.
25. Borghesi, E., González-Miret, M. L., Escudero-Gilete, M. L., Malorgio, F., Heredia, F. J., & Meléndez-Martínez, A. J. (2011). Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(21), 11676-11682.
26. Brewer, D., Mason, F. G., & Taylor, A. (1987). The production of alamethicins by *Trichoderma* spp. *Canadian journal of microbiology*, 33(7), 619-625.
27. Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., & Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant physiology*, 147(2), 779-789.
28. Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S., & Kubicek, C. P. (2003). The NagI N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current genetics*, 43(4), 289-295.
29. Buee, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R., & Bécard, G. (2000). The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(6), 693-698.
30. Cai, F., Yu, G., Wang, P., Wei, Z., Fu, L., Shen, Q., & Chen, W. (2013). Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant physiology and biochemistry*, 73, 106-113.
31. Calvet, C., Pera, J. and Barea, J.M., 1993. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil*, 148(1), pp.1-6.

32. Cappellazzo, G., Lanfranco, L., Fitz, M., Wipf, D., & Bonfante, P. (2008). Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*, *147*(1), 429-437.
33. Cardoso, C., Ruyter-Spira, C., & Bouwmeester, H. J. (2011). Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Plant Science*, *180*(3), 414-420.
34. Cattelan, A. J., Hartel, P. G., & Fuhrmann, J. J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*, *63*(6), 1670-1680.
35. Champigny, M.J., Shearer, H., Mohammad, A., Haines, K., Neumann, M., Thilmony, R., He, S.Y., Fobert, P., Dengler, N. and Cameron, R.K., 2011. Localization of DIR1 at the tissue, cellular and subcellular levels during Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis using DIR1: GUS and DIR1: EGFP reporters. *BMC plant biology*, *11*(1), p.125.
36. Chang, Y. C., CHANG, Y. C., Baker, R., Kleifeld, O., & Chet, I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant disease*, *70*(2), 145-148.
37. Chen, J., Harman, G. E., COMIS, A., & CHENG, G. W. (2005). Proteins Related to the Biocontrol of Pythium Damping - off in Maize with *Trichoderma harzianum* Rifai. *Journal of integrative plant biology*, *47*(8), 988-997.
38. Chernin, L., Chet, I., Burns, R. G., & Dick, R. P. (2002). Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*, 171-226.
39. Chet, I., & Chernin, L. (2002). Biocontrol, microbial agents in soil. *Encyclopedia of environmental microbiology*.
40. Chet, I., Harman, G. E., & Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*, *7*(1), 29-38.
41. Claydon N, Hanson JR, Truneh A, Avent AG. Harzianolide, a butenolide metabolite from cultures of *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry* 1991; 30: 3802- 3.
42. Coakley, S. M., Scherm, H., & Chakraborty, S. (1999). Climate change and plant disease management. *Annual review of phytopathology*, *37*(1), 399-426.
43. Collins, R. P., & Halim, A. F. (1972). Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *20*(2), 437-438.
44. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, *71*(9), 4951-4959.
45. Conn, K. L., & Lazarovits, G. (2000). Soil factors influencing the efficacy of liquid swine manure added to soil to kill *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *22*(4), 400-406.
46. Cooke, R. C., & Rayner, A. D. (1984). *Ecology of saprotrophic fungi*. Longman.
47. Cordier, C., Gianinazzi, S., & Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant and Soil*, *185*(2), 223-232.
48. Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, *61*, 401-422.
49. Datnoff, L.E., Nemecek, S. and Pernezny, K., (1995). Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological Control*, *5*(3), pp.427-431.

50. de Boer, W., Folman, L. B., Summerbell, R. C., & Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 795-811.
51. De Jaeger, N., Ivan, E., de Boulois, H.D. and Declerck, S., 2011. *Trichoderma harzianum* might impact phosphorus transport by arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS microbiology ecology*, 77(3), pp.558-567.
52. de Souza, J. T., de Boer, M., de Waard, P., van Beek, T. A., & Raaijmakers, J. M. (2003). Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7161-7172.
53. Degenhardt, J., Gershenzon, J., Baldwin, I. T., & Kessler, A. (2003). Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. *Current opinion in biotechnology*, 14(2), 169-176.
54. Demmig, B., & Björkman, O. (1987). Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O<sub>2</sub> evolution in leaves of higher plants. *Planta*, 171(2), 171-184.
55. Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.
56. Djonovic, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., & Kenerley, C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 838-853.
57. Djonović, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A., & Kenerley, C. M. (2007a). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology*, 145(3), 875-889.
58. Djonović, S., Vittone, G., Mendoza -Herrera, A. Z. U. C. E. N. A., & Kenerley, C. M. (2007b). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing  $\beta$ -1, 3- and  $\beta$ -1, 6- glucanase genes. *Molecular plant pathology*, 8(4), 469-480.
59. Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current opinion in plant biology*, 7(5), 547-552.
60. Druzhinina, I. S., Shelest, E., & Kubicek, C. P. (2012). Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS microbiology letters*, 337(1), 1-9.
61. Duffy, B. K. (2001). Competition, p. 243-244. In Maloy, O. C., & Murray, T. D. *Encyclopedia of plant pathology*. Wiley.
62. Duffy, B. K., & Défago, G. (2000). Controlling Instability in *gacS-gacA* Regulatory Genes during Inoculant Production of *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3142-3150.
63. Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Cordier, C., Gianinazzil, S., & Gianinazzi-Pearson, V. (2000). *Modulation of host defence systems* (pp. 173-200). Springer Netherlands.
64. Dunne, C., Moëne -Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D. N., & O'Gara, F. (1998). Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of Pythium-mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathology*, 47(3), 299-307.
65. Ehlers, R. U. (2006). Einsatz der Biotechnologie im biologischen Pflanzenschutz. *Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft eV*, 8, 17-31.
66. Elad, Y. and Stewart, A., 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. In 'Botrytis: biology, pathology and control'. (Eds Y

67. Elad, B Williamson, P Tudzynski, N Delen) pp. 223-241.
68. Elad, Y., Chet, I., & Henis, Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(7), 719-725.
69. Elad, Y., Gullino, M.L., Shtienberg, D. and Aloï, C., 1995. Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. *Crop Protection*, 14(2), pp.105-109.
70. Elad, Y., Zimand, G., Zags, Y., Zuriel, S. and Chet, I., 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology*, 42(3), pp.324-332.
71. Emmert, E. A., & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology letters*, 171(1), 1-9.
72. Fester, T., Schmidt, D., Lohse, S., Walter, M.H., Giuliano, G., Bramley, P.M., Fraser, P.D., Hause, B. and Strack, D., 2002. Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta*, 216(1), pp.148-154.
73. Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., & Bahl, H. (2001). Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology*, 176(6), 421-426.
74. Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu, A. and Dag, A., Shafir, S., Elad, Y., 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 110(4), pp.361-370.
75. Frey -Klett, P., Garbaye, J. A., & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New phytologist*, 176(1), 22-36.
76. Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjær, M. F., Thordal-Christensen, H., & Pons-Kühnemann, J. (2006). Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza*, 16(6), 413-419.
77. Fűrnkranz, M., Müller, H., & Berg, G. (2009). Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia/Charakterisierung pflanzenwachstumsfördernder Bakterien von Kulturpflanzen in Bolivien. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 149-155.
78. Gaderer, R., Bonazza, K., & Seidl-Seiboth, V. (2014). Cerato-platanins: a fungal protein family with intriguing properties and application potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 4795-4803.
79. Gams, W., & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. *Trichoderma and Gliocladium*, 1, 3-34.
80. García -Garrido, J. M., & Ocampo, J. A. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of experimental Botany*, 53(373), 1377-1386.
81. Gardener, B. B. M., & Fravel, D. R. (2002). Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA. *Plant Health Progress*, 10.
82. Garnica -Vergara, A., Barrera -Ortiz, S., Muñoz -Parra, E., Raya -González, J., Méndez -Bravo, A., Macías -Rodríguez, L., Ruiz -Herrera, L.F. and López -Bucio, J., (2015). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*. 209: 1496–1512
83. Gerdemann, J. W. (1968). Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual review of phytopathology*, 6(1), 397-418.

84. Ghisalberti, E. L., Narbey, M. J., Dewan, M. M., & Sivasithamparam, K. (1990). Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant and Soil*, *121*(2), 287-291.
85. Giovannetti, M., & Sbrana, C. (1998). Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. *Mycorrhiza*, *8*(3), 123-130.
86. Giovannetti, M., Sbrana, C., & Logi, C. (1994). Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, *127*(4), 703-709.
87. Giuliano, G., Bartley, G. E., & Scolnik, P. A. (1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell*, *5*(4), 379-387.
88. Gomes, E. V., do Nascimento Costa, M., de Paula, R. G., de Azevedo, R. R., da Silva, F. L., Noronha, E. F., ... & Silva, R. N. (2015). The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific reports*, *5*.
89. Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*(3), 395-412.
90. Guether, M., Balestrini, R., Hannah, M., He, J., Udvardi, M. K., & Bonfante, P. (2009). Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist*, *182*(1), 200-212.
91. Guether, M., Neuhäuser, B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U., & Bonfante, P. (2009). A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, *150*(1), 73-83.
92. Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y. and Dinooor, A., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, *91*(7), pp.621-627.
93. Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E. and Dinooor, A., 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*, *92*(9), pp.976-985.
94. Gullino, M. L. (1992). Chemical control of *Botrytis* spp. In *10. International Botrytis Symposium: Recent Advances in Botrytis Research, Heraklion, Crete (Greece), 5-10 Apr 1992*. Pudoc.
95. Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M. R., & Konradsen, F. (2007). The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC public health*, *7*(1), 1.
96. Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(4), 307-319.
97. Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, *43*(10), 895-914.
98. Hallmann, J., Rodriguez-Kábana, R., & Kloepper, J. W. (1999). Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry*, *31*(4), 551-560.
99. Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: what have we learned after 60 years?. *Annual review of phytopathology*, *37*(1), 285-306.
100. Hammerschmidt, R., Métraux, J. P., & Van Loon, L. C. (2001). Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology*, *107*(1), 1-6.

101. Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84(4), 377-393.
102. Harman, G. E., Björkman, T., Ondik, K., & Shores, M. (2008). Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks on Pest Management*, 19(1), 24.
103. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
104. Harrison, M. J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 19-42.
105. Hart, M., Ehret, D. L., Krumbein, A., Leung, C., Murch, S., Turi, C., & Franken, P. (2015). Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves the nutritional value of tomatoes. *Mycorrhiza*, 25(5), 359-376.
106. Hoffland, E., Pieterse, C. M. J., Bik, L., & Van Pelt, J. A. (1995). Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46(4), 309-320.
107. Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.
108. Huang, H. C., Bremer, E., Hynes, R. K., & Erickson, R. S. (2000). Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 18(3), 270-276.
109. Inbar, J., & Chet, I. (1995). The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 141(11), 2823-2829.
110. Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., & Mann, M. (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(9), 1265-1272.
111. Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
112. Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(10), 1121-1126.
113. Kerry, B. R., & Bourne, J. M. (1996). The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes—a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science*, 47(1), 69-75.
114. Khaosaad, T., Garcia-Garrido, J. M., Steinkellner, S., & Vierheilig, H. (2007). Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(3), 727-734.
115. Kloepper, J. W., Rodriguez-Kabana, R., Zehnder, A. W., Murphy, J. F., Sikora, E., & Fernandez, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, 28(1), 21-26.
116. Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259-1266.
117. Kubicek, C. P., & Harman, G. E. (1998). *Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis Ltd.

118. Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K., & Lorito, M. (2001). Trichoderma: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 11-23.
119. Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K. and Mukherjee, M., 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. *Genome biology*, 12(4), pp.1-15.
120. Lamdan, N. L., Shalaby, S., Ziv, T., Kenerley, C. M., & Horwitz, B. A. (2015). Secretome of Trichoderma interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(4), 1054-1063.
121. Larkin, R. P., Roberts, D. P., & Gracia-Garza, J. A. (1998). Biological control of fungal diseases. *Fungicidal activity, chemical and biological approaches*.
122. Latef, A. A. H. A., & Chaoxing, H. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 228-233.
123. Leach, A. W., & Mumford, J. D. (2008). Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environmental pollution*, 151(1), 139-147.
124. Leonardi, C., Ambrosino, P., Esposito, F., & Fogliano, V. (2000). Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4723-4727.
125. Lenzemo, V. W., Kuyper, T. W., Kropff, M. J., & van Ast, A. V. (2005). Field inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi reduces *Striga hermonthica* performance on cereal crops and has the potential to contribute to integrated *Striga* management. *Field Crops Research*, 91(1), 51-61.
126. Linder, M. B. (2009). Hydrophobins: proteins that self assemble at interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(5), 356-363.
127. Liu, J., Blaylock, L. A., Endre, G., Cho, J., Town, C. D., VandenBosch, K. A., & Harrison, M. J. (2003). Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell*, 15(9), 2106-2123.
128. Lo, C. T., Nelson, E. B., Hayes, C. K., & Harman, G. E. (1998). Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology*, 88(2), 129-136.
129. López-Ráez, J. A., Charnikhova, T., Fernández, I., Bouwmeester, H., & Pozo, M. J. (2011). Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of plant physiology*, 168(3), 294-297.
130. López -Ráez, J.A., Charnikhova, T., Gómez -Roldán, V., Matusova, R., Kohlen, W., De Vos, R., Verstappen, F., Puech -Pages, V., Bécard, G., Mulder, P. and Bouwmeester, H., 2008. Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist*, 178(4), pp.863-874.
131. 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, 395-417.
132. Lucic, E., Fourrey, C., Kohler, A., Martin, F., Chalot, M., & Brun -Jacob, A. (2008). A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 180(2), 343-364.

133. Lugtenberg, B. J., Chin-A-Woeng, T. F., & Bloemberg, G. V. (2002). Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *81*(1-4), 373-383.
134. Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, *63*, 541-556.
135. Lutz, M. P., Wenger, S., Maurhofer, M., Défago, G., & Duffy, B. (2004). Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS microbiology ecology*, *48*(3), 447-455.
136. Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., & Cameron, R. K. (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature*, *419*(6905), 399-403.
137. Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D.,
138. Zheng, C., Bryant, S. H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, *43*(Database issue), D222.
139. Mark, G. L., & Cassells, A. C. (1996). Genotype-dependence in the interaction between *Glomus fistulosum*, *Phytophthora fragariae* and the wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant and Soil*, *185*(2), 233-239.
140. Martinez, A., Obertello, M., Pardo, A., Ocampo, J. A. and Godeas, A., 2004. Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza*, *14*(2), pp.79-84.
141. Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F. W., Franssen, M. C., Beale, M. H., & Bouwmeester, H. J. (2005). The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant physiology*, *139*(2), 920-934.
142. McAllister, C. Á., Garcia-Romera, I., Godeas, A., & Ocampo, J. A. (1994a). Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*, *26*(10), 1363-1367.
143. McAllister, C. B., Garcia-Romera, I., Godeas, A., & Ocampo, J. A. (1994b). In vitro interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*. *Soil Biology and Biochemistry*, *26*(10), 1369-1374.
144. Metcalf, D. A., & Wilson, C. R. (2001). The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology*, *50*(2), 249-257.
145. Meyer, S. L., & Roberts, D. P. (2002). Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of nematology*, *34*(1), 1.
146. Miller, S. A., Beed, F. D., & Harmon, C. L. (2009). Plant disease diagnostic capabilities and networks. *Annual review of phytopathology*, *47*, 15-38.
147. Minerdi, D., Bossi, S., Maffei, M. E., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2011). *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. *FEMS microbiology ecology*, *76*(2), 342-351.
148. Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, *26*(2), 73-83.
149. Morrissey, J. P., Dow, J. M., Mark, G. L., & O'Gara, F. (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production?. *EMBO reports*, *5*(10), 922-926.

150. Mosse, B. (1973). Plant Growth Responses To Vesicular - Arbuscular Mycorrhiza. *New Phytologist*, 72(1), 127-136.
151. Mosse, B., & Hepper, C. (1975). Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiological Plant Pathology*, 5(3), 215-223.
152. Mosse, B., Powell, C., & Hayman, D. S. (1976). Plant Growth Responses To Vesicular - Arbuscular Mycorrhiza. *New Phytologist*, 76(2), 331-342.
153. Müller, H., Westendorf, C., Leitner, E., Chernin, L., Riedel, K., Schmidt, S., ... & Berg, G. (2009). Quorum - sensing effects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO - C48. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(3), 468-478.
154. Nagahashi, G., & Douds, D. D. (2000). Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research*, 104(12), 1453-1464.
155. Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 165-185.
156. Navazio, L., Baldan, B., Moscatiello, R., Zuppini, A., Woo, S. L., Mariani, P., & Lorito, M. (2007). Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC plant biology*, 7(1), 41.
157. Nielsen, T. H., & Sørensen, J. (2003). Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*, 69(2), 861-868.
158. Nielsen, T. H., Sørensen, D., Tobiasen, C., Andersen, J. B., Christophersen, C., Givskov, M., & Sørensen, J. (2002). Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*, 68(7), 3416-3423.
159. Norman, J. R., Atkinson, D., & Hooker, J. E. (1996). Arbuscular mycorrhizal fungal-induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*. *Plant and Soil*, 185(2), 191-198.
160. Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
161. Ordentlich A, Wiesman Z, Gottlieb HE, Cojocar M, Chet I. Inhibitory furanone produced by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry* 1992; 31: 485-6.
162. Ordentlich, A., Elad, Y., & Chet, I. (1988). The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology (USA)*.
163. Ordookhani, K., Khavazi, K., Moezzi, A., & Rejali, F. (2010). Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. *African Journal of Agricultural Research*, 5(10), 1108-1116.
164. Oukarroum, A., El Madidi, S., Schansker, G., & Strasser, R. J. (2007). Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 438-446.
165. Ownley, B. H., Weller, D. M., & Alldredge, J. R. (1991). Relation of soil chemical and physical factors with suppression of take-all by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Bulletin OILB SROP (France)*.
166. Ozbay, N., & Newman, S. E. (2004). Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on T.

- 167.harzianum. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(4), 478-484.
- 168.Pajerowska-Mukhtar, K. M., Emerine, D. K., & Mukhtar, M. S. (2013). Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends in plant science*, 18(7), 402-411.
- 169.Pane, C., Parisi, M., Zaccardelli, M., Graziani, G., & Fogliano, V. (2010, July). Putative role of antioxidant activity of high pigment tomato cultivars in resistance against *Botrytis cinerea* post-harvest infection. In *III International Symposium on Tomato Diseases 914* (pp. 429-432).
- 170.Papavizas, G. C. (1985). Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology*, 23(1), 23-54.
- 171.Parker, C. (2009). Observations on the current status of Orobanche and Striga problems worldwide. *Pest management science*, 65(5), 453-459.
- 172.Parker, S. R., Cutler, H. G., Jacyno, J. M., & Hill, R. A. (1997). Biological activity of 6-pentyl-2 H-pyran-2-one and its analogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2774-2776.
- 173.Paulitz, T.C. and Bélanger, R.R., 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual review of phytopathology*, 39(1), pp.103-133.
- 174.Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition*, 133(9), 2812-2819.
- 175.Pierson, E. A., & Weller, D. M. (1994). Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology*, 84(9), 940-947.
- 176.Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Hoffland, E., Van Pelt, J. A., & Van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell*, 8(8), 1225-1237.
- 177.Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52, 347-375.
- 178.Pieterse, C.M., Van Pelt, J.A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P. and Van Loon, L.C., (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), pp.123-134.
- 179.Pieterse, C.M., Van Wees, S.C., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. and Van Loon, L.C., (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(9), pp.1571-1580.
- 180.Pozo, M. J., Cordier, C., Dumas -Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J. M., & Azcón -Aguilar, C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of experimental botany*, 53(368), 525-534.
- 181.Rai, M. K., Shende, S., & Strasser, R. J. (2008). JIP test for fast fluorescence transients as a rapid and sensitive technique in assessing the effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in *Zea mays*: Analysis of chlorophyll a fluorescence. *Plant Biosystems*, 142(2), 191-198.
- 182.Raupach, G. S., & Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11), 1158-1164.
- 183.Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., & Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89-123.

184. Ross, A. F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, *14*(3), 340-358.
185. Rovira, A. D. 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **19**:241-266.
186. Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Woo, S. L., Vinale, F., Marra, R., ... & Turrà, D. (2015). Multiple roles and effects of a novel Trichoderma hydrophobin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*(2), 167-179.
187. Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L., & Lorito, M. (2009). Identification of a new biocontrol gene in Trichoderma atroviride: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular plant-microbe interactions*, *22*(3), 291-301.
188. Sahai, A. S., & Manocha, M. S. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host—parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*, *11*(4), 317-338.
189. Scarselletti, R., & Faull, J. L. (1994). In vitro activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of Trichoderma harzianum, in the inhibition of Rhizoctonia solani and Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. *Mycological Research*, *98*(10), 1207-1209.
190. Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G., & Kubicek, C. P. (2006). Epl1, the major secreted protein of Hypocrea atroviridis on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *Febs Journal*, *273*(18), 4346-4359.
191. Shaul, O., Galili, S., Volpin, H., Ginzberg, I., Elad, Y., Chet, I., & Kapulnik, Y. (1999). Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *12*(11), 1000-1007.
192. Shores, M., & Harman, G. E. (2008). The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to Trichoderma harzianum T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiology*, *147*(4), 2147-2163.
193. Shores, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, *48*, 21-43.
194. Shores, M., Yedidia, I., & Chet, I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by Trichoderma asperellum T203. *Phytopathology*, *95*(1), 76-84.
195. Shtienberg, D. and Elad, Y., 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of Botrytis cinerea. *Phytopathology*, *87*(3), pp.332-340.
196. Simard, S. W., Perry, D. A., Jones, M. D., Myrold, D. D., Durall, D. M., & Molina, R. (1997). Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature*, *388*(6642), 579-582.
197. Singh, P. P., Shin, Y. C., Park, C. S., & Chung, Y. R. (1999). Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, *89*(1), 92-99.
198. Sivan, A., & Chet, I. (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of Trichoderma harzianum. *Microbiology*, *135*(3), 675-682.
199. Sivan, A., & Harman, G. E. (1991). Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of Trichoderma harzianum. *Microbiology*, *137*(1), 23-29.
200. Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1998). Secondary metabolism in Trichoderma and Gliocladium. *Trichoderma and Gliocladium basic biology taxonomy and genetics*, *1*, 139-191.

201. Slezacek, S., Dumas-Gaudot, E., Paynot, M., & Gianinazzi, S. (2000). Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), 238-241.
202. Smith, K. P., Handelsman, J., & Goodman, R. M. (1999). Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 4786-4790.
203. Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). Arbuscular mycorrhizas. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3, 11-145.
204. Stirling, G. R. (1991). *Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects* (No. QL386. S84 1991.). Wallingford: CAB International.
205. Sung, K. C., & Chung, Y. R. (1997). Enhanced suppression of rice sheath blight using combination of bacteria which produce chitinases or antibiotics. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects*. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan, 370-372.
206. Tarantino, E., Lops, F., Disciglio, G., Carlucci, A., Gatta, G., Frabboni, L. (2015) Contenere *Pheliphanche ramosa* su pomodoro da industria. *Informatore Agrario - Difesa delle colture*. 33:68-71
207. Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194-208.
208. Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current opinion in immunology*, 13(1), 63-68.
209. Thompson, J. N., & Cunningham, B. M. (2002). Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection. *Nature*, 417(6890), 735-738.
210. Thrane, C., Tronsmo, A., & Jensen, D. F. (1997). Endo-1, 3- $\beta$ -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 103(4), 331-344.
211. Vallverdú-Queralt, A., Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Lamuela-Raventós, R. M., Martín-Belloso, O., & Elez-Martínez, P. (2013). Metabolite profiling of phenolic and carotenoid contents in tomatoes after moderate-intensity pulsed electric field treatments. *Food chemistry*, 136(1), 199-205.
212. Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, 36(1), 453-483.
213. Van Hulst, M., Pelsler, M., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M., & Ton, J. (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14), 5602-5607.
214. Van Peer, R., Niemann, G. J., & Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, 81(7), 728-734.
215. Vargas, W. A., Djonović, S., Sukno, S. A., & Kenerley, C. M. (2008). Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), 19804-19815.
216. Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., and Ryals, J., (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *The Plant Cell*, 6(7), pp.959-965.
217. Vinale, F., Girona, I.A., Nigro, M., Mazzei, P., Piccolo, A., Ruocco, M., Woo, S., Rosa, D.R., Herrera, C.L. and Lorito, M., 2011. Cerinolactone, a hydroxy-lactone derivative from *Trichoderma cerinum*. *Journal of natural products*, 75(1), pp.103-106.

218. Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E. L., Lorito, M., and Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 143-148.
219. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
220. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008b). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
221. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., ... & Manganiello, G. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
222. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L. and Lorito, M., 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1), pp.80-86.
223. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S. Manganiello, G. and Lorito, M. 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
224. Viterbo, A. D. A., & CHET, I. (2006). TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular plant pathology*, 7(4), 249-258.
225. Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L., & Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 549-556.
226. Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.
227. Vogel, J.T., Walter, M.H., Giavalisco, P., Lytovchenko, A., Kohlen, W., Charnikhova, T., Simkin, A.J., Goulet, C., Strack, D., Bouwmeester, H.J. and Fernie, A.R., 2010. SICCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal*, 61(2), pp.300-311.
228. Walter, M. H., Floss, D. S., & Strack, D. (2010). Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta*, 232(1), 1-17.
229. Wei, G., Kloepper, J. W., & TuZun, S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81(11), 1508-1512.
230. Welbaum, G. E., Sturz, A. V., Dong, Z., & Nowak, J. (2004). Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(2), 175-193.
231. Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256.
232. Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens 1. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 309-348.
233. Wheatley, R. E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 357-364.
234. Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl 1), 487-511.

235. Whipps, J. M., & Lumsden, R. D. (2001). Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*, 9-22.
236. Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96(2), 181-185.
237. Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., & Rowland, C. (1994). Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research*, 98(12), 1357-1363.
238. Wosten, H. A., De Vries, O. M., & Wessels, J. G. (1993). Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *The Plant Cell*, 5(11), 1567-1574.
239. Xu, X.M., Jeffries, P., Pautasso, M. and Jeger, M.J., 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, 101(9), pp.1024-1031.
240. Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1061-1070.
241. Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and soil*, 235(2), 235-242.
242. Yoneyama, K., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., & Sekimoto, H. (2007). Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta*, 225(4), 1031-1038.
243. Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., ... & Kubicek, C. P. (1999). Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host. *Fungal Genetics and Biology*, 26(2), 131-140.
244. Zhao, Y., & Lin, Y. H. (2010). Whole-cell protein identification using the concept of unique peptides. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 8(1), 33-41.
245. Zhou, W.J., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Iso, S., Rungmekarat, S., Chae, S.H., Sato, D. and Joel, D.M., (2004). In vitro infection of host roots by differentiated calli of the parasitic plant *Orobanche*. *Journal of Experimental Botany*, 55(398), pp.899-907.
246. Zhu, H. H., & Yao, Q. (2004). Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Phytopathology*, 152(10), 537-542.