

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DIPARTIMENTO DI AGRARIA

Dottorato di ricerca in Scienze Agrarie e Agroalimentari

XXX Ciclo

**Metaboliti di origine fungina per il controllo
degli insetti dannosi in agricoltura**

Relatore

Prof. Matteo Lorito

Candidata

Federica Lacatena

Correlatori

Prof.ssa Sheridan Lois Woo

Prof. Francesco Vinale

Anno Accademico 2017/2018

1.	INTRODUZIONE	
1.1	Protezione delle colture	
1.1.1	Avversità delle colture	4
1.1.2	Importanza dei parassiti entomopatogeni	8
1.2	Metodi di difesa contro gli insetti	9
1.2.1	Agronomico	9
1.2.2	Chimico	9
1.2.3	Fisico	10
1.2.4	Lotta biologica e biotecnologica	10
1.2.5	Lotta integrata (IPM)	11
1.3	Agricoltura sostenibile	12
1.3.1	Legislazioni agricole per ridurre l'impiego di prodotti chimici di sintesi	12
1.3.2	Metodi alternativi per la difesa delle colture	13
1.4	Microrganismi benefici per le piante	14
1.4.1	Funghi entomopatogeni e nematopatogeni	18
1.4.2	<i>Metarhizium</i> spp.	20
1.4.3	<i>Beauveria</i> spp.	20
1.4.4	<i>Pochonia</i> spp.	21
1.4.5	<i>Paecilomyces</i> spp.	22
1.5	Gli antagonisti del genere <i>Trichoderma</i>	22
1.6	Composti naturali bioattivi di origine microbica	23
2.	SCOPO DELLA TESI	25
3.	MATERIALI E METODI	26
3.1	Isolamento e identificazione dei ceppi fungini	26
3.2	Allevamento di insetti (<i>Acyrtosiphon pisum</i>) in condizioni controllate	27
3.3	Saggi di attività nei confronti di <i>Acyrtosiphon pisum</i>	27

3.4	Estrazione di metaboliti secondari da filtrati colturali fungini	30
3.5	Isolamento e caratterizzazione di metaboliti dotati di attività insetticida	31
3.5.1	Derivati acetilati	33
3.5.2	LC-MS q-TOF	33
3.5.3	NMR	34
3.6	Co-culture di funghi per stimolare la produzione di composti utili	35
3.7	Produzione di metaboliti attivi in substrati diversi	36
4.	RISULTATI	
4.1	Allestimento di una collezione di ceppi microbici ed ottenimento di estratti organici	37
4.2	Attività insetticida degli estratti organici da filtrati colturali	40
4.3	Isolamento e caratterizzazione degli estratti purificati	42
4.4	Attività insetticida di metaboliti puri e miscele isolate da ceppi microbici benefici	58
4.5	Attività dei derivati acetilati	63
5.	Produzione di metaboliti in co-culture	64
5.1	Analisi LC-MS q-TOF	64
5.2	Analisi NMR	68
5.3	Saggio di attività insetticida dell'acido harziafilico	75
6.	Prove di produzione di metaboliti attivi in diversi substrati	75
7.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	77
8.	BIBLIOGRAFIA	89
9.	RINGRAZIAMENTI	102

INTRODUZIONE

1.1 Protezione delle colture

1.1.1 Avversità delle colture

La malattia in pianta può essere definita come una “condizione di sofferenza derivante da un’alterazione dei normali processi fisiologici della pianta” (Belli, 2007).

Esistono essenzialmente due categorie di malattia in pianta, quelle abiotiche e quelle biotiche. Le prime, definite così in quanto costituiscono le alterazioni non parassitarie dello stato di salute delle piante, sono ascrivibili agli inquinanti ambientali ed a condizioni estreme come caldo, siccità, freddo, gelo, anossia, fotoossidazione, esposizione ai raggi ultravioletti, e carenze nutrizionali. In linea del tutto generale la sintomatologia ascrivibile ai fattori abiotici può essere molto simile o indistinguibile da quella causata da fattori biotici, laddove infatti, non si ritrova l’agente patogeno che ha causato il danno, le cosiddette “sindromi” su pianta dovute ad agenti abiotici possono essere anche di difficile determinazione. Pertanto, in assenza di un preciso agente eziologico rilevato attraverso un’attenta analisi, o di un preciso danno di un determinato patogeno, diagnosticare una malattia non parassitaria può essere complesso.

Le patologie biotiche sono determinate da un organismo vivente, agente di danno, e derivano dalla formazione di un’infezione per l’insediarsi di un patogeno nei tessuti dell’ospite. In questo caso si definisce la malattia come infettiva o dovuta ad un parassita (organismo che vive a carico di un altro essere vivente) ed è potenzialmente trasmissibile da un organismo infetto ad uno sano (Belli, 2007).

Un’infezione parassitaria può essere localizzata, cioè limitata al punto di infezione, ad un settore o a pochi organi della specie vegetale, o sistemica, se utilizzando i fasci interni della pianta, invade quest’ultima dalle radici alle foglie. Quando si tratta di malattia infettiva, la quantità di sofferenza che la pianta subisce può essere determinata dalla presenza di tre fattori principali: 1) la suscettibilità dell’ospite, ossia la sua predisposizione a contrarre la malattia; 2) la patogenicità dell’agente infettivo, cioè la sua capacità di determinare la malattia; 3) e i fattori ambientali in cui essa si sviluppa (es. temperatura e umidità).

Esistono moltissimi organismi definiti come patogeni o parassiti di piante. Tra questi possiamo annoverare soprattutto organismi come virus, batteri, cromisti, funghi e insetti (Tabella 1).

Tabella 1. Esempi di agenti che causano danni alle colture agricole.

Agente patogeno	Pianta ospite principale	Descrizione del danno/sintomo della malattia
TMV (<i>Tobacco Mosaic Virus</i>) - virus del mosaico del tabacco	Barbabietola da zucchero; cetriolo; mais; patata; pisello; pomodoro; tabacco	Chiazze di colore giallo o verde su foglia; increspamento o deformazione; distruzione dei cloroplasti; trasmissione per contatto, assenza di vettori.
CTV (<i>Citrus tristeza Virus</i>) – tristezza degli agrumi (Closterovirus)	Arancio	Riduzione dello sviluppo e disseccamento dei rami fino a morte; diffusione a causa di innesti o di afidi come <i>Toxoptera citricidus</i> .
<i>Xylella fastidiosa</i> (batterio)	Olivo	Vivendo nei vasi xilematici provoca disseccamento dei rami fino a morte.
<i>Erwinia amylovora</i> (batterio)	Pomacee	Appassimento e necrosi di germoglio, fiori, foglie e frutti; diffusione attraverso pioggia; insetti o uccelli.
<i>Phytophthora infestans</i> (Oomicete)	Patate, pomodoro, melanzana	Necrosi di tutte le parti della pianta fino al disseccamento.
<i>Armillaria mellea</i> (basidiomicete)	Parassita di piante arboree	Marciume radicale fibroso.
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (ascomicete)	Piante erbacee, ortaggi, succulente, fiori	Attacca in genere i tessuti giovanili a partire dal colletto provocando marciume.
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (insetto)	Fabacee	Si nutre di sostanze elaborate dal floema, è un fitomizo, arreca danno all'intera pianta provocandone l'avvizzimento.
<i>Dryocosmus kuriphilus</i> (insetto)	Castagno	Forma galle sulla pianta ospite

La perdita di produzione agricola a livello mondiale causata da microrganismi patogeni può essere stimata tra il 25 ed il 30% del raccolto mondiale, mentre le perdite di prodotto causate da agenti patogeni quali insetti sono stimate intorno al 45% (Belli, 2007). In figura 1 sono riportate le perdite produttive dovute all'azione degli agenti.

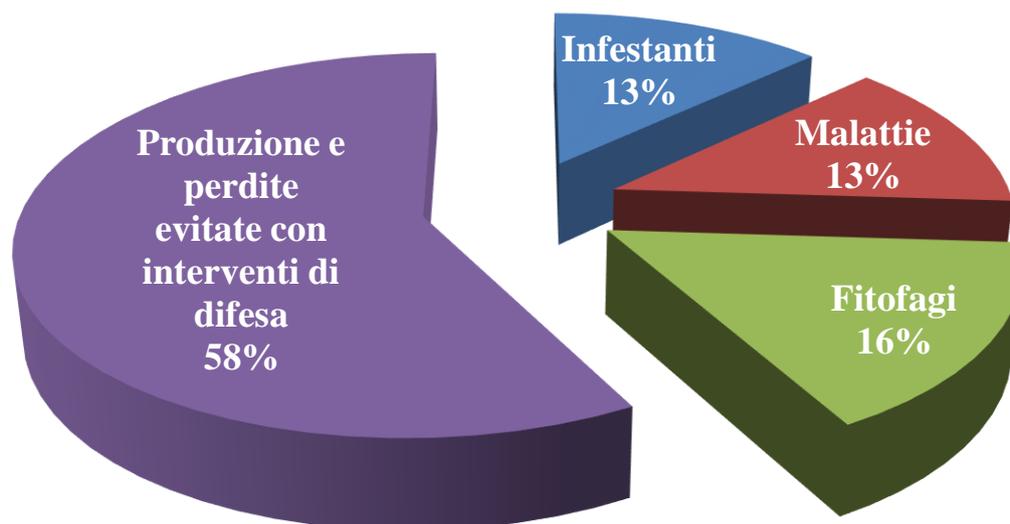


Figura 1. Perdite produttive dovute ad agenti patogeni (EPPO-*European and Mediterranean Plant Protection Organization*)

Tra le numerose tipologie di patogeni vegetali, gli insetti entrano in gioco in moltissime fitopatologie. Esistono infatti, virus, batteri, micoplasmi, funghi, protozoi e nematodi il cui vettore principale è costituito da un insetto. Questi agenti patogeni possono essere trasmessi da insetti con due modalità principali: attraverso trasmissione meccanica, oppure attraverso la trasmissione biologica, cioè l'incubazione del patogeno da parte dell'insetto (persistenza) e la successiva trasmissione circolativa del virus, batterio o fitoplasma alla pianta ospite (Harris e Maramorosch, 2014).

Tra le specie di insetti patogeni, gli Omotteri, soprattutto gli afidi, sono i principali vettori di virus (trasmettono circa 200 specie di virus); seguono gli Aleurodidi (*Bemisia* e *Trialeurodes*) con circa 130 specie di virus trasmissibili in pianta. Le parti di pianta attaccate dagli insetti possono comprendere le radici, il fusto, le foglie e i frutti. Esistono anche danni indiretti, ad esempio la riduzione o la perdita di funzionalità dell'apparato radicale dovuta all'attacco di patogeni.

Gli afidi sono anche annoverati tra i maggiori agenti di danno meccanico alle specie vegetali. Infatti, essi sono provvisti di un apparato boccale pungente-succhiatore, grazie al quale perforano le parti verdi della pianta fino ad arrivare al floema e sottraggono linfa elaborata all'ospite. Attraverso questo meccanismo gli afidi possono provocare vistosi avvizzimenti generati dalla perdita di turgore delle foglie fino a portare la pianta a morte. Essi perforando i

tessuti dell'ospite, possono favorire l'ingresso di funghi che provocano ulteriore danno alla specie vegetale.

Esistono diverse specie di insetti in grado di produrre notevoli perdite economiche per importanti colture mondiali (Tabella 2).

Tabella 2. Esempi di insetti che arrecano maggior danno alle colture mondiali

Insetto	Danno su pianta	Perdite economiche (% - EPPO Global Database)
<i>Aphis gossypii</i>	Avvizzimento e disseccamento di parti aeree e fotosintetiche, fiori e frutti dovuti alle punture di nutrizione (cucurbitacee, rutacee, malvacee); vettore di virus	40-50
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Avvizzimento e disseccamento di parti aeree e fotosintetiche dovuti alle punture di nutrizione (leguminose); vettore di virus	35-50
<i>Macrosiphon euphorbiae</i>	Avvizzimento e disseccamento di parti aeree e fotosintetiche, fiori e frutti dovuti alle punture di nutrizione (melanzana, patata, peperone, pomodoro) vettore di virus	40-50
<i>Thrips tabaci</i>	Deformazioni su organi vegetali, depigmentazioni, punteggiature argentate o necrosi (cucurbitacee, asteracee, leguminose, melanzana, solanacee); vettore di virus	60-90
<i>Bemisia tabaci</i>	Ingiallimenti e deformazioni fogliari dovute alle punture di nutrizione (cavolo, cucurbitacee, fagiolo, melanzana, patata, peperone, pomodoro); vettore di virus	45-80
<i>Tuta absoluta</i>	Danni ai frutti e alle foglie, gallerie profonde dovute alla nutrizione soprattutto degli stadi larvali (pomodoro e altre solanacee)	50-100

Il monitoraggio dello sviluppo di insetti dannosi è fondamentale per una corretta gestione dei prodotti agricoli. Di importanza essenziale è l'acquisizione di informazioni, anche da aziende private, riguardanti l'ingresso di nuovi agenti patogeni o l'instaurarsi di condizioni favorevoli per l'insorgere di malattie precedentemente ritenute sotto controllo. Esistono delle soglie di intervento che permettono di gestire al meglio le emergenze. Esse, a seconda della specie e del danno previsto, possono essere costituite da un limite numerico di individui presenti sul territorio (uova, larve e adulti) o dal calcolo degli organi della pianta attaccati.

1.1.2 Importanza dei parassiti entomopatogeni

Gli insetti sono spesso attaccati da vari nemici naturali, tra cui, funghi, virus, batteri, nematodi e altri insetti. I competitori degli insetti si possono dividere in due categorie principali: predatori e parassitoidi. I primi si alimentano, durante la loro vita, di individui ospiti in tutti o quasi gli stadi di sviluppo (a seconda delle diverse specializzazioni). Essi hanno spesso dalla loro parte un'elevata mobilità che gli consente di cacciare attivamente le prede (Strand e Obrycki, 1996). I parassitoidi hanno stadi larvali o comunque giovanili che vivono in genere a carico di altri insetti e completano il loro sviluppo portando a morte l'unico ospite. Possiamo distinguere parassiti idiobionti e coinobionti, i primi provocano una morte molto rapida delle loro vittime, mentre i secondi consentono ai loro ospiti di continuare a svilupparsi in concomitanza dei loro stadi larvali. Il rapporto ospite-parassita si conclude, anche in questo caso, con la morte della vittima. Di fatto i parassitoidi possono nutrirsi delle loro vittime sia dall'esterno (ectoparassitoidi), che dal loro interno (endoparassitoidi) in uno specifico stadio dell'individuo ospite (Strand e Obrycki, 1996).

Molti insetti sono vittime di infezioni micotiche che spesso ne provocano la morte. La prima scoperta di funghi agenti di malattia negli insetti risale al XIX secolo. Infatti Agostino Bassi nel 1835 individuò come responsabile del mal del calcino nel baco da seta, il fungo *Beauveria bassiana*, oggi ampiamente utilizzato in bio-formulati per la lotta biologica (Daniel *et al.*, 2017). Tra gli organismi entomopatogeni esistono i baculovirus, parassiti obbligati specie-specifici che in genere non hanno impatto negativo su altri organismi. Essi danno origine alle poliedrosi nucleari, dalla forma dei viriodi che è possibile osservare al microscopio. Molti baculovirus sono alla base di importanti bio-insetticidi impiegati in agricoltura.

Tra gli entomopatogeni esistono anche nematodi la cui azione letale dipende da batteri endosimbionti. Essi sono ubiquitari nei suoli e possono agire penetrando attraverso il tegumento degli insetti o perforandone attivamente la cuticola e provocare setticemia come *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* (Owuama, 2001).

1.2 Metodi di difesa contro gli insetti

Attualmente la difesa delle colture dagli insetti può essere condotta con diversi metodi: agronomico, chimico, fisico, biologico e biotecnologico e quello della lotta integrata.

1.2.1 Agronomico

L'uomo ha sviluppato misure di difesa per combattere e prevenire la diffusione delle principali malattie in pianta, allo scopo di ridurre al minimo le perdite di raccolto. Pratiche agronomiche specifiche tradizionali come la rotazione colturale e l'ammendamento, mezzi fisici come la solarizzazione e il controllo sull'introduzione di materiale vegetale infetto contribuiscono alla realizzazione di una efficace protezione delle colture (Agrios, 2004). Come è noto, tradizionalmente l'attuazione di queste pratiche consente di prevenire la diffusione di patogeni vegetali come funghi, insetti e piante infestanti. L'adozione di pratiche agronomiche adeguate può, in molti casi, limitare al minimo o annullare completamente gli interventi fitosanitari.

1.2.2 Chimico

Fino ad una quindicina di anni fa la lotta agli insetti patogeni in agricoltura era affidata quasi esclusivamente all'impiego dei prodotti di sintesi nella produzione di numerose colture. Molti sono i prodotti chimici impiegati in agricoltura, essi possono essere classificati sia in base al principio attivo che al tipo di azione ottenuta. Ad esempio, i pesticidi da contatto agiscono molto velocemente aderendo e penetrando l'esoscheletro degli insetti. Quelli sistemici invece, sono assorbiti dall'individuo e possono raggiungere anche parti del corpo non trattate direttamente. Esistono poi, prodotti che possono agire disidratando il corpo degli insetti o interferendo con il processo di maturazione delle larve impedendo a queste di raggiungere la fase adulta. Molti pesticidi di sintesi sono selettivi, agendo soltanto su alcune specie, ed altri sono ad ampio spettro d'azione. Esistono infine, semplici repellenti che allontanano momentaneamente l'insetto dannoso ma non ne provocano la morte. I principali prodotti chimici impiegati in agricoltura, per alcuni dei quali non è più permesso l'utilizzo in alcuni paesi tra cui l'Europa (Regolamento quadro CE 1107/2009), sono: organofosfati, carbammati, composti organoclorurati, piretroidi e nicotinodi.

1.2.3 Fisico

Il metodo fisico o meccanico (spesso considerato una parte del metodo agronomico) include l'attuazione di alcune tecniche quali: solarizzazione e termoterapia che sono in grado di sfruttare il calore per rendere i patogeni più vulnerabili attuando una sorta di disinfezione del terreno. Ovviamente i trattamenti suddetti devono essere attuati in modo da ridurre le popolazioni di patogeni lasciando inalterate le colture da proteggere.

1.2.4 Lotta biologica e biotecnologica

La lotta biologica può essere definita come “l'utilizzo di organismi naturali o modificati, di geni o prodotti genici, atti a ridurre gli effetti degli organismi indesiderati, e per favorire quelli utili all'uomo, alle coltivazioni, agli animali e ai microrganismi simbiotici”, includendo in questa definizione anche l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare per l'ottenimento di nuove tecnologie (Accademia Nazionale della Scienza degli Stati Uniti -NAS, 1987). Questi metodi sono applicati in campo agrario sia per la difesa delle colture che in post raccolta. Nell'ultimo ventennio la definizione di lotta biologica è stata ampliata e modificata fino ad arrivare ad oggi, in cui essa comprende l'utilizzo di qualsiasi entità biologica o di un suo derivato che sia efficace nel contenimento di un patogeno o parassita. Vi si includono sia organismi come batteri, funghi, virus, nematodi, artropodi, vertebrati e protozoi, che una qualsiasi molecola da essi derivante. Tra i primi interventi in assoluto che diedero il via a questa tecnica, va ricordato l'esempio di controllo biologico della cocciniglia *Icerya purchasi* negli agrumeti californiani mediante il coccinellide predatore *Rodolia cardinalis* (Battilani, 2016). Senza dubbio le tecniche molecolari sviluppate negli ultimi anni sono state utilissime ai fini dello sviluppo della lotta biologica, in particolar modo per le conoscenze acquisite sui meccanismi di interazione tra gli organismi patogeni e/o parassiti ed i loro ospiti, tra gli insetti entomofagi e le loro prede. Ciò espande la varietà ed il numero di agenti efficaci che possono essere identificati in natura e introduce anche una opportunità di sviluppare nuove biotecnologie per il controllo dei patogeni, degli insetti fitofagi e degli organismi nocivi, in generale basate sull'uso di agenti vivi, dei loro metaboliti e dei loro geni e/o prodotti genici.

Lo sviluppo di biotecnologie è incrementato moltissimo negli ultimi quindici anni attraverso le applicazioni di geni e sostanze naturali in grado di contrastare gli agenti patogeni. Ad esempio, attraverso l'utilizzo di composti bioattivi provenienti da agenti microbici. Alcuni esempi in

merito sono costituiti da prodotti a base di feromoni di insetti, capaci di attirare o confondere gli individui di alcune specie, riuscendo a proteggere le colture ospiti.

Un'altra tipologia di biotecnologia utilizzata nella lotta biologica è realizzata mediante porzioni di DNA (“RNA *interference*”) che sono in grado di interferire con l'espressione genica dell'organismo patogeno, in modo da attivare/disattivare alcune funzioni fondamentali nel processo di infezione in pianta (es. riconoscimento dell'ospite; penetrazione; ecc.)

1.2.5 Lotta integrata (IPM)

Con la diffusione dell'*Integrated Pest Management* (IPM) c'è stato un notevole incremento dell'impiego dei sistemi di controllo biologico efficaci contro i patogeni in agricoltura. La difesa integrata ha rivalutato l'impiego dei mezzi agronomici, i quali, pur non essendo in molti casi risolutivi, possono diminuire notevolmente il rischio di diffusione di alcune malattie in pianta. L'obiettivo principale dell'IPM è quello di ridurre al minimo i rischi di inquinamento ambientale e per la salute umana dovuto all'uso eccessivo di prodotti chimici di sintesi, riuscendo tuttavia a minimizzare o annullare le perdite di raccolto dovute alla diffusione degli organismi agenti di danno nelle principali colture di interesse agrario e forestale. La lotta integrata è una strategia basata sulla comprensione e lo studio delle principali funzionalità degli ecosistemi che si attua con la prevenzione del danno a lungo termine attraverso l'impiego di diverse tecniche e loro combinazioni. Alcune delle quali sono: il controllo biologico; la modifica dell'habitat senza arrecare danno alle specie pre-esistenti; l'impiego di pratiche agricole sostenibili; l'utilizzo di varietà resistenti; la realizzazione e l'impiego di mezzi meccanici di controllo (reti; trappole ecc.); l'utilizzo di materiale di propagazione sano e controllato e la combinazione di approcci diversi, come l'impiego integrato di tecniche di lotta biologica e chimica. Quest'ultimo punto è realizzato riducendo al minimo possibile l'utilizzo di prodotti chimici grazie all'integrazione di tecniche di lotta biologica in grado di colmare ampiamente ed efficacemente il *gap* lasciato dal mancato impiego di alti dosaggi dei prodotti di sintesi, limitando al massimo i danni da essi arrecati all'uomo e agli ecosistemi naturali

1.3 Agricoltura sostenibile

A partire dagli anni '70 l'utilizzo di prodotti chimici in agricoltura ha provocato numerosi danni. L'impiego di quantità sempre maggiori di pesticidi ha aumentato il rischio di contaminazione dei prodotti agricoli, a danno della salute umana e dell'ambiente. Molto spesso il reiterato impiego di prodotti di sintesi ha selezionato popolazioni di insetti, funghi, batteri e virus resistenti ai principi attivi, con la conseguenza inevitabile di doverne incrementare le dosi per ottenere un effetto di contenimento. Nella maggior parte dei casi i principi attivi dei prodotti fitosanitari hanno causato inquinamenti profondi delle matrici ambientali (aria, acqua e suolo), con gravi conseguenze per tutti gli esseri viventi. Infine, anche la qualità nutrizionale e organolettica dei prodotti si è modificata con gli anni, portando a prodotti agricoli poco nutrienti e insapori a causa dell'impoverimento minerale dei suoli. I prodotti fitosanitari infatti, molto spesso riducono le popolazioni di organismi patogeni ma, simultaneamente, abbassando la carica microbica totale del suolo, ciò causa una sensibile riduzione anche dei microrganismi benefici (funghi, batteri ecc.). Inoltre, la produzione intensiva agricola danneggia la struttura e la composizione chimica del terreno, e in combinazione con la riduzione dei microbi nel suolo, produce un effetto negativo sull'assimilazione di composti utili in pianta (micro e macro elementi) che influenzano le proprietà organolettiche e nutrizionali dei prodotti agricoli.

In questo scenario l'ultima rivoluzione verde ha reso possibile lo sviluppo di tecniche agricole alternative ecosostenibili grazie alle quali, in molti paesi, si è riusciti ad aumentare notevolmente la qualità dei prodotti agricoli e a diminuire drasticamente l'inquinamento ambientale.

1.3.1 Legislazioni agricole per ridurre l'impiego di prodotti chimici di sintesi

Con la Direttiva europea 2009/128/CE tutti i paesi membri si sono impegnati a ridurre al minimo l'impiego di pesticidi e promuovere le tecniche di lotta a basso impatto ambientale e di lotta integrata (*Integrated Pest Management* - IPM). Nel 2015 il Ministero delle Politiche Agricole, Ambientali e Forestali ha realizzato il "Piano Strategico Nazionale per lo Sviluppo

del Sistema Biologico”, con il quale si rafforza un settore che è diventato importante per la produzione agricola italiana, ossia quello dell’agricoltura biologica e della promozione della ricerca scientifica e dell’innovazione tecnologica. Ogni paese membro dell’Unione europea ha realizzato linee guida nazionali e regionali d’intervento attraverso le quali riuscire al meglio a realizzare l’obiettivo comune (Young, 2017; MIPAF-Decreto Dirigenziale n. 43, 2017). Nel Piano Strategico “Piano per la ricerca e l’innovazione in agricoltura biologica” (Azione 10) si intende sostenere la ricerca scientifica per le produzioni tecnologiche con un approccio multidisciplinare che garantisce l’ingresso dell’innovazione nei sistemi produttivi.

La Direttiva Europea 2009/128/CE, recepita in Italia con il D.L. n. 150 del 14 agosto 2012, ha realizzato un quadro d’intervento comunitario per l’impiego ridotto di pesticidi e l’utilizzo di metodologie di lotta alternative, introducendo l’uso di agenti di controllo biologico e dei loro prodotti come alternativa all’impiego di prodotti di sintesi. Il nuovo regime di produzione IPM, obbligatorio dal 1° gennaio 2014, è stato accompagnato dalla disponibilità sul mercato mondiale di qualche centinaio di prodotti a base di insetti, batteri, funghi o lieviti antagonisti legalmente registrati ed utilizzabili anche in agricoltura biologica.

La Commissione Europea nel giugno del 1991 con il Reg. n. 2092/91 approva il metodo di produzione biologico dei prodotti derivanti dall’agricoltura, dettando le norme di produzione, individuando i sistemi di controllo e stabilendo le modalità di etichettatura, i prodotti ammessi per i trattamenti fitosanitari e le concimazioni. Da quel momento in poi tutte le aziende che vorranno produrre con il metodo biologico dovranno comunicare l’inizio dell’attività alle regioni di appartenenza e agli organismi di controllo. Questi rilasciano, dopo esito favorevole delle ispezioni, un attestato di conformità di produzione che andrà riconfermato anno dopo anno. Alla suddetta normativa ne sono poi seguite altre aventi lo scopo di chiarire, completare e modificare quanto già specificato nel Reg. 2092 del 1991 (vedi Regg. n. 1488/97, 1073/2000, 436/2001, 473/2002).

1.3.2 Metodi alternativi per la difesa delle colture

I metodi alternativi per la difesa delle colture prevedono la realizzazione e l’impiego di nuove biotecnologie, metodologie che si servono di organismi viventi o di sostanze e/o metaboliti da questi prodotti, dei loro geni e/o prodotti genici (Lorito e Cervone, 2004). Questo concetto amplia notevolmente quello già vasto di lotta biologica contro i parassiti dannosi alle produzioni agricole e prevede: i) l’utilizzo di sistemi quali l’impiego di feromoni prodotti da insetti a scopo

di monitoraggio, allontanamento o cattura massale; ii) la realizzazione di prodotti derivanti da organismi viventi, come metaboliti ad azione insetticida; iii) la applicazione di metaboliti secondari antibiotici di origine fungina; iv) l'uso di organismi viventi impiegati tal quali; v) l'utilizzo di organismi viventi modificati attraverso l'impiego di raggi x e gamma o di sostanze chemiosterilizzanti (maschiosterilità; auticidio); vi) l'impiego di meccanismi di resistenza indotti alle piante (Berasategui *et al.*, 2016).

Si definisce controllo biologico o lotta biologica, la tecnica che sfrutta le caratteristiche di alcuni agenti di biocontrollo o nemici naturali per ridurre le popolazioni di specie dannose. I vantaggi dell'impiego di tecniche alternative, oltre al raggiungimento di un'elevata qualità ambientale e dei prodotti, sono, in molti casi, costituiti dalla selettività degli agenti di controllo (es. predatori o parassitoidi) che agiscono esclusivamente controllando la diffusione delle loro prede.

La lotta biologica si realizza attraverso: 1) il metodo propagativo che prevede l'introduzione nell'ecosistema di uno o più nemici naturali del patogeno in modo da contrastarne la diffusione e lo sviluppo nella pianta ospite; 2) il metodo inondativo che consiste nell'inserimento di un numero molto elevato di individui antagonisti o predatori dell'organismo patogeno in modo da alterare sensibilmente l'equilibrio numerico tra i due a favore dell'antagonista; 3) il metodo inoculativo che prevede la liberazione periodica di una specie autoctona o introdotta da molti anni allo scopo di ripopolare l'ambiente con organismi antagonisti capaci di controllare le popolazioni di patogeni. La differenza principale tra quest'ultima tecnica ed il metodo propagativo consiste nell'impiego, nel primo caso, di specie che sono presenti negli ecosistemi già da lungo tempo, a differenza della tecnica propagativa che può prevedere anche l'utilizzo di specie alloctone ottenute per riproduzione massale (Dasrat *et al.*, 1997).

L'utilizzo di agenti biologici nei processi di lotta riveste un'importante azione di controllo di numerosi patogeni in agricoltura. Nella definizione di agente biologico si tende a comprendere organismi, anche appartenenti a diversi generi, capaci di produrre effetti benefici in pianta e di ridurre l'incidenza di fitopatie. Tra questi annoveriamo parassitoidi, funghi, batteri, virus, protozoi e nematodi.

1.4 Microrganismi benefici per le piante

La comunità microbica del terreno è un elemento fondamentale per la salute e la crescita delle piante ed è costituita da rappresentanti di diversi gruppi tassonomici i quali esplicano importanti funzioni per gli ecosistemi (Giri *et al.*, 2005).

I microrganismi benefici appartengono a diverse classi e sono in grado di produrre effetti benefici in pianta attraverso vari meccanismi d'azione. Sono capaci di generare associazioni simbiotiche con le radici, promuovere la mineralizzazione dei nutrienti e la loro disponibilità per le piante e produrre ormoni stimolanti per la crescita di numerose specie vegetali. Inoltre, è oramai ben nota la proprietà dei microrganismi benefici di incrementare la capacità delle piante di resistere e tollerare meglio stress biotici e abiotici. Ad esempio, Ruiz-Lozano *et al.* (2006) hanno dimostrato come la simbiosi tra piantine di soia e micorrize è capace di indurre l'espressione di geni di resistenza della pianta, che sono specificatamente attivati in condizioni di stress idrico. Soprattutto nel bacino del Mediterraneo esistono diversi luoghi dove l'unica fonte idrica è costituita da acqua proveniente dalle zone di retro spiaggia, e quindi leggermente salmastra: diversi studi hanno dimostrato come trattamenti al terreno con consorzi microbici di organismi benefici rendevano le colture altamente resistenti alla eccessiva salinità delle acque (Rietz e Haynes, 2003).

Batteri dei generi *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, e *Rhizobium* sono ben noti per aumentare la resistenza a stress abiotici in pianta e favorirne la crescita (Chatterjee *et al.*, 2017). Questi organismi hanno la capacità di attivare la produzione di fitormoni, ACC deaminasi ed esopolisaccaridi, fissare l'azoto atmosferico e rendere solubile il fosforo promuovendo la crescita delle piante. In particolare, è noto come la maggior parte degli stress sia responsabile di un'elevata produzione di etilene in pianta, i batteri appartenenti ai generi sopracitati riducono il quantitativo di etilene prodotto attraverso la deaminasi, che converte l'ACC in α -ketobutyrate ed ammonio, offrendo un notevole vantaggio alla pianta (Chatterjee *et al.*, 2017).

Altri microrganismi che instaurano un'interazione benefica con la pianta sono i PGPR (*Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria*), ovvero batteri benefici, non simbiotici, che vivono nella rizosfera. Con questo termine vengono di solito identificati alcuni batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Bacillus*. I PGPR sono stati classificati in due gruppi distinti: biofertilizzanti e agenti di biocontrollo.

Tra i principali effetti benefici che i microrganismi apportano alla pianta ospite vanno riportati effetti diretti e indiretti come: la promozione della crescita vegetale ed una migliore tolleranza agli stress idrici; la maggiore mobilizzazione ed assorbimento dei nutrienti, in particolare il fosforo; la disponibilità di minerali normalmente insolubili come il ferro; la modifica dell'interazione pianta-patogeni, dal momento che viene limitata la diffusione di questi ultimi grazie all'incremento della resistenza sistemica acquisita dalla pianta (*Induced acquired systemic resistance*), la quale è in grado di rispondere più prontamente all'ingresso dei patogeni. Questo effetto benefico indiretto di protezione verso la pianta può dipendere strettamente

dell'alterazione degli essudati radicali o da una barriera fisica che si forma in seguito alla crescita del micelio attorno alle radici (Linderman, 1988).

Anche il contributo alla formazione e alla stabilità del suolo da parte della componente microbica della rizosfera (in particolare batteri e funghi saprofiti/micorrizici) è stato frequentemente dimostrato (Miller e Jastrow, 1990). Infatti, le particelle di suolo sono tenute insieme in aggregati e le ife di alcuni funghi terricoli possono penetrare nel terreno molto più profondamente rispetto alle radici delle piante, dato che il loro diametro è inferiore a quello dei peli radicali. I funghi quindi, possono accedere più profondamente negli spazi interstiziali e conferire una maggiore stabilità al terreno aumentando di molto la superficie di assorbimento delle radici (Miller e Jastrow, 1990). Grazie a questa azione benefica dei microrganismi del suolo ne è stato più volte proposto l'impiego per limitare i fenomeni di erosione superficiale, provocati, tra le tante cause, anche dall'aumento dei processi di desertificazione e degradazione dei suoli (Requena *et al.*, 2001). Svolgendo la doppia funzione di strutturazione del suolo e di ausilio per l'alimentazione delle piante, i microrganismi benefici esercitano un'influenza diretta sullo sviluppo e la stabilità delle associazioni vegetali e degli ecosistemi, garantendo così una protezione duratura della vegetazione.

Tra i microrganismi che popolano la rizosfera ricoprono un ruolo di notevole importanza anche i decompositori, funghi o batteri che sono in grado di portare a degradazione i residui vegetali portando a termine il ciclo dei nutrienti. Alcuni funghi possono degradare anche composti vegetali ritenuti molto resistenti, come le emicellulose e la cellulosa (Alexander, 1971). Questi organismi sono detti anche saprofiti, essi sono fondamentali nelle reti trofiche degli ecosistemi poiché contribuiscono a decomporre le sostanze organiche in elementi inorganici o comunque meno complessi rendendoli biodisponibili per le piante.

I meccanismi e processi principali che sono coinvolti nella lotta biologica contro gli agenti fitopatogeni comprendono: antibiosi, parassitismo e competizione. L'antibiosi è la capacità che hanno alcuni microorganismi di produrre metaboliti secondari in grado di inibire la crescita e lo sviluppo di molti patogeni. Il parassitismo è uno dei processi più importanti utilizzati nell'antagonismo e rappresenta una forma di interazione di tipo nutrizionale che si instaura mediante una forte associazione tra l'antagonista e l'ospite. L'interazione specifica tra antagonista e fungo è detta micoparassitismo e si realizza attraverso la lisi delle pareti cellulari del patogeno grazie alla produzione di enzimi degradativi (CWDEs) anche in sinergia con metaboliti antifungini (Lorito *et al.*, 2006).

Infine, la competizione è un meccanismo di biocontrollo che può instaurarsi per lo spazio e le sostanze nutritive necessarie al patogeno per l'attacco parassitario o per il suo sviluppo.

I funghi sono tra i microorganismi entomopatogeni più usati per il controllo biologico (Lacey *et al.*, 2015). Alcuni di loro sono endofiti, antagonisti anche di alcuni patogeni fungini, colonizzatori della rizosfera e promotori della crescita delle piante (Lacey *et al.*, 2015). La loro principale caratteristica che li porta ad essere gli agenti microbici più utilizzati a livello mondiale, risiede nell'ampia varietà di metaboliti secondari che sono in grado di produrre, la maggior parte dei quali ancora poco conosciuti. Tali metaboliti possono avere numerose funzioni e caratteristiche e possono essere molto efficaci se impiegati nella lotta di numerose fitopatie.

Moltissimi microrganismi benefici o composti bioattivi sono commercializzati come biofertilizzanti e/o biopesticidi. Alcuni prodotti migliorano la capacità del suolo di autodepurarsi e di decomporre la sostanza organica, favoriscono la permeabilità del terreno e lo rendono migliore per la penetrazione delle radici (Jilani *et al.*, 2007). I biopesticidi sono costituiti da tutti i prodotti e le molecole di origine naturale utilizzati per contrastare gli agenti di danno in agricoltura (Chandler *et al.*, 2011). Per la maggioranza degli stati membri dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico), il termine biopesticida non può includere gli organismi geneticamente modificati. La classificazione comune per i biopesticidi include:

- biochimici (metaboliti secondari prodotti da organismi viventi);
- semiochimici (segnali molecolari prodotti da organismi che possono determinare una variazione del comportamento negli individui della stessa specie o di specie diverse; es. feromoni);
- microrganismi (Chandler *et al.*, 2011).

Diversamente da un prodotto realizzato con un microorganismo nel quale, per raggiungere uno sviluppo commerciale e una buona efficacia, un ceppo antagonista deve soddisfare diversi criteri (assenza di tossicità e incapacità di produrre effetti collaterali indesiderati, adattamento all'ambiente e persistenza in campo almeno per una stagione produttiva, efficacia in diverse aree geografiche, stabilità genetica e biologica, preparazione facile ed economica, ecc. (Lorito *et al.*, 2006), i metaboliti secondari hanno la capacità di avere effetto sinergico con vari fungicidi di sintesi (Fogliano *et al.*, 2002) e sono maggiormente stabili soprattutto se applicati al terreno. Inoltre, non presentano tutte le problematiche che riguardano i microrganismi vivi, ossia la conservazione pre – trattamento. Per questi motivi, le sostanze naturali del metabolismo secondario possono essere utilizzate sia tal quali come fungicidi biologici, sia come coadiuvanti di principi chimici di sintesi, permettendo di ridurre significativamente le concentrazioni di anticrittogamici chimici.

1.4.1 Funghi entomopatogeni e nematopatogeni

Numerosi microrganismi fungini sono patogeni di molte specie di insetti e nematodi e sono in grado di controllare le popolazioni naturali di questi limitandone la diffusione. Esistono più di 1.000 specie che infettano e parassitizzano insetti e sono distribuiti nei *Phyla*: *Entomophthoromycota*, *Blastocladiomycota*, *Microsporidia*, *Basidiomycota*, *Ascomycota* (Vega *et al.*, 2012). I funghi entomopatogeni si sono evoluti in eterogenei stili di vita, le loro fasi sessuali sono molto rare da ritrovare in campo e notevolmente difficili da allevare in laboratorio. I funghi che parassitizzano un solo ospite, come *Ophiocordyceps unilateralis* (Figura 2) ne possono alterare il comportamento inducendolo a posizionarsi lontano dal suolo per favorire la diffusione delle spore (Shang *et al.*, 2015; de Bekker *et al.*, 2015).



Figura 2. Un Formicidae parassitizzato dal fungo *O. unilateralis* (<https://nootriment.com/cordyceps-unilateralis/>).

I funghi entomopatogeni seguono la tipica sequenza di interazione/infezione dell'ospite propria dei patogeni. All'inizio dell'infezione il riconoscimento dell'ospite e l'attivazione dei *pathways* per la differenziazione delle strutture di infezione sono regolati dai recettori accoppiati a proteine G – GPCRs. I GPCR sono costituiti da una catena polipeptidica singola che può essere formata anche da 1100 residui, la caratteristica principale è rappresentata da 7 α -eliche transmembrana molto simili a quelle che si trovano nei canali ionici, essi controllano diversi aspetti delle funzioni cellulari tra cui la funzionalità dei canali calcio e potassio (Xiao *et al.*, 2012). I funghi codificano una serie di Pth11-like GPCRs con ruoli ben precisi nell'innesco della patogenesi (Xue *et al.*, 2008). Quando le spore aderiscono alla cuticola dell'insetto germinano formando una struttura di infezione, l'appressorio. Poi la secrezione di enzimi litici passa dal conidio madre all'appressorio. Si genera un'elevata concentrazione di glicerolo che aumenta il turgore dell'appressorio così da rompere la cuticola dell'insetto. Durante questo processo, e dopo aver raggiunto l'emocele, le cellule del fungo modificano la struttura della

loro parete cellulare e producono effettori proteici e metaboliti secondari per evadere la risposta immunitaria dell'ospite. Per colonizzare con successo l'ospite, il fungo si diffonde formando ife che gli consentono di crescere velocemente e sottrarre nutrienti all'insetto (Ownley *et al.*, 2010).

Esistono alcune specie fungine che si sono specializzate nel parassitizzare i nematodi: gli *Hyphomycetes*, ad esempio, adottano una serie di comportamenti per parassitizzarli, che includono i meccanismi di cattura, la formazione di trappole e la colonizzazione delle uova attraverso la penetrazione delle ife (Bordallo *et al.*, 2002). Moltissimi prodotti per l'agricoltura sono realizzati da bioformulati costituiti da funghi parassiti di insetti o nematodi. I generi a cui appartengono le specie entomopatogene e nematopatogene più utilizzate in agricoltura sono: *Metarhizium* spp.; *Beauveria* spp., *Pochonia* spp., *Paecilomyces* spp.

1.4.2 *Metarhizium spp.*

Un gran numero di specie sono state identificate nel genere *Metarhizium*, esse sono costituite prevalentemente da funghi entomopatogeni e sono ascrivibili agli ascomiceti. Molte specie sono adattate ad una notevole diversità di ospiti. Ad esempio, *M. acridum* e *M. album* sono specializzati nel parassitizzare ortotteri ed emitteri rispetto ad altre specie più generaliste, come *M. robertsii* e *M. anisopliae* (Wang *et al.*, 2012).

Studi sull'ecologia del suolo di *M. anisopliae* dimostrano che questa specie ha una notevole versatilità ecologica e metabolica; infatti è in grado di colonizzare la rizosfera, aderire alla superficie delle radici e parassitizzare gli insetti. Esistono studi controversi riguardo al fatto che queste specie di funghi possano vivere nel terreno anche per lunghissimi periodi rifugiandosi in esso in attesa dell'insetto ospite più adatto (Kramera e Muthukrishnanb, 1997). *M. anisopliae* è in grado di vivere come parassita di insetti, diffondersi nell'emolinfa e negli organi interni, e occupare la nicchia ecologica dei saprofiti del terreno. Inoltre, questa specie riesce, con molta efficacia, a trasferire l'azoto proveniente dalla degradazione del corpo degli insetti alle piante (Behie *et al.*, 2013).

1.4.3 *Beauveria spp.*

Tra i funghi patogeni di insetti, quelli appartenenti al genere *Beauveria* hanno assunto un ruolo fondamentale nella gestione e protezione delle colture. Tra essi in particolare la specie *Beauveria bassiana* è utilizzata in moltissimi bio-formulati come sospensione acquosa di conidi, per proteggere le colture e le specie forestali da artropodi dannosi.

Il fungo *Beauveria bassiana* è cosmopolita e adattato alla vita nel terreno, può essere però necrotrofo di moltissime specie di artropodi. Circa il 40 % dei mico-insetticidi in commercio sono basati su *Beauveria spp.* (Faria e Wraight, 2007).

Il fungo infetta il suo ospite attraverso il contatto dei conidi sul corpo dell'artropode. Successivamente esso secerne enzimi e sostanze litiche e applica pressione meccanica per riuscire a penetrare l'esoscheletro e diffondersi in esso. Una volta penetrato l'esoscheletro, il fungo è capace di differenziarsi in singole cellule (blastospore) che hanno la capacità di diffondersi molto velocemente nell'emolinfa e resistere al sistema immunitario dell'insetto

(Humber, 2008; Xiao *et al.*, 2012). Durante la colonizzazione dell'ospite vengono prodotti dal fungo una vasta gamma di metaboliti tossici specializzati nella soppressione del sistema immunitario dell'insetto e nella distruzione dei tessuti interni portando, infine, alla morte dell'individuo (Xiao *et al.*, 2012). Una volta sopraggiunta la morte dell'insetto, il fungo fuoriesce dal suo cadavere producendo conidi.

1.4.4 *Pochonia spp.*

I funghi del genere *Pochonia* sono noti da anni per avere spiccate proprietà di biocontrollo nei confronti di nematodi fitopatogeni. La specie *P. chlamydosporia* può colonizzare la rizosfera o vivere come organismo saprofita (Kerry, 1995). Essa parassitizza le masse d'uova dei nematodi galligeni o le femmine cisticole mature. Questa specie, a differenza di altre nematopatogene, non è in grado di produrre alcuna struttura adibita alla cattura di nematodi ma può solamente infettare le uova e le femmine nella fase sedentaria di alcune specie (Kerry, 1988).

Il fungo *P. chlamydosporia* può produrre strutture di resistenza, le chlamydospore, che ne permettono la sopravvivenza anche in assenza o scarsità di uova di nematodi. Quando le condizioni del terreno divengono più favorevoli, il fungo sporula e produce micelio che infetterà le masse di uova. *P. chlamydosporia* è parassita soprattutto dei nematodi appartenenti ai generi *Meloidogyne*, *Globodera* ed *Heterodera*, numerosi studi hanno dimostrato che esso può vivere come endofita in diverse specie vegetali (Fig. 3).

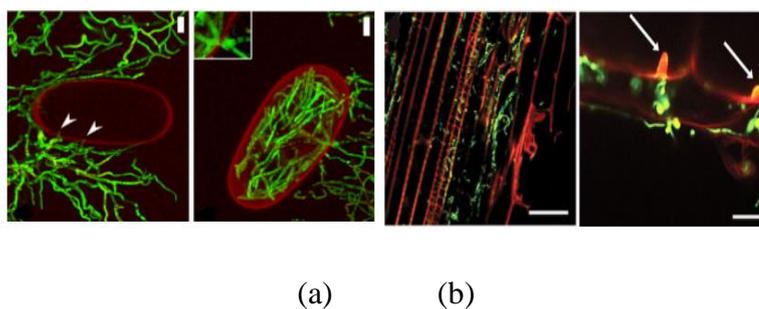


Figura 3. Il fungo nematopatogeno *P. chlamydosporia* [marcato con l'impiego di Green Fluorescent Protein (GFP)] che parassitizza uova di nematodi (a) e che cresce come endofita in pomodoro (b) (Escudero e Lopez-Llorca, 2012).

Durante la colonizzazione dei tessuti vegetali e delle uova di nematodi, questo Agente di Biocontrollo (BCA) produce un gran numero di metaboliti secondari ed enzimi tossici per tessuti e organi (Larriba *et al.*, 2014).

1.4.5 Paecilomyces spp.

I funghi del genere *Paecilomyces* si ritrovano in un gran numero di habitat, suoli coltivati e non, ecosistemi forestali, prati, pascoli, deserti e sedimenti di zone in estuario. In particolare, la specie *Paecilomyces lilacinus*, è uno dei più conosciuti parassiti di nematodi ed è usato, oramai da molti anni per il controllo di nematodi dannosi per l'agricoltura. Esso è in grado di infettare le uova e le femmine sedentarie di molte specie di nematodi, in particolare quelli galligeni. Questa specie è stata isolata, molto spesso, nella rizosfera di molte colture agricole ed è in grado di crescere su diversi substrati e in un *range* di temperatura e pH molto vari (Agrios, 2004).

La capacità di parassitizzare le uova di nematodi dannosi, dipende dalla caratteristica che ha *P. lilacinus* di produrre numerose molecole e moltissimi enzimi proteolitici, come leserina proteasi, che hanno un ruolo molto importante nell'idrolisi (Siddiqui e Mahmood, 1996).

1.5 Gli antagonisti del genere Trichoderma

I funghi del genere *Trichoderma* sono gli agenti di biocontrollo più studiati ed utilizzati a livello mondiale, essi producono effetti benefici in pianta che sono in grado di incrementare la produzione agricola fornendo grande sostentamento alla popolazione mondiale (Lorito *et al.*, 2010). Le specie del genere *Trichoderma* aiutano a mantenere la fertilità del suolo e sono in grado di offrire una protezione generale delle colture, insieme ad altri microrganismi, attraverso diversi meccanismi di azione. Moltissimi studi hanno dimostrato l'abilità di alcuni ceppi di produrre enzimi litici ed antibiotici e di innescare una risposta di difesa in pianta, attraverso la quale il "sistema immunitario" degli organismi vegetali è maggiormente allertato in risposta ad alcuni patogeni e a stress abiotici (Sanz *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 1993). Ciò rende il genere *Trichoderma* quello più utilizzato in assoluto a livello mondiale nei bio-formulati per la lotta biologica in agricoltura (Woo *et al.* 2014).

Diverse e molteplici sono le biomolecole ascrivibili al metabolismo secondario che questi BCAs producono in differenti condizioni di crescita. La produzione di metaboliti secondari da

parte dei funghi del genere *Trichoderma* è costituita da molecole appartenenti a diverse classi, inclusi gli antibiotici.

Esistono specie come *T. harzianum* ceppo M10, in grado di produrre metaboliti secondari come l'acido harzianico (HA) capace di promuovere la crescita in pianta e di agire come antifungino. Questa molecola è un acido tetramico che ha funzione di sideroforo (metabolita a basso peso molecolare che ha elevata affinità con il Fe^{3+}) rendendo biodisponibili i composti del ferro per l'assimilazione in pianta (Vinale *et al.*, 2013). Il 6-pentyl-2H-pyran-2-one prodotto dalle specie *T. viride*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii* è un metabolita con forte aroma di cocco e spiccate proprietà antifungine. *Trichoderma koningii* è nota anche per la produzione di koniginine, pironi con elevate proprietà antifungine nei confronti di molti patogeni vegetali (*Rhizoctonia solani*; *Phytophthora cinnamomi*; *Pythium middletonii*; *Fusarium oxysporum*). Le molecole viridina e viridiolo sono entrambe tipicamente prodotte da specie di *Trichoderma* e posseggono anch'esse elevate proprietà antifungine, bloccando la germinazione di spore di alcune specie patogene (*Botrytis allii*; *Penicillium expansum*; *Aspergillus niger*) (Vinale *et al.*, 2014).

1.6 Composti naturali bioattivi di origine microbica

I funghi sono in grado di produrre una vasta gamma di molecole prodotte dal metabolismo secondario. Queste si originano in particolari condizioni di crescita e non sono ritenute necessarie per la sopravvivenza del fungo ma ne possono migliorare la capacità competitiva (Bu'Lock, 1961). L'interesse per queste molecole è via via cresciuto negli anni. Esse, infatti, possono avere potenziali impieghi in molti campi: medicina, industria, agricoltura ecc. L'induzione della produzione di composti di questo tipo è, spesso, innescata da un *cross talk* che si instaura tra funghi di specie diverse o tra Taxa differenti, per cui, in un rapporto di parassitismo, competizione o antibiosi, una specie produce molecole in grado di “combattere” la diffusione dell'organismo che vive nella sue vicinanze (Ola *et al.*, 2013).

I funghi benefici sono capaci di produrre numerosi e diversi metaboliti secondari dotati di varie attività biologiche (Pusztahelyi *et al.*, 2015). La produzione di metaboliti secondari dipende dalla specie e dal singolo ceppo, dalla eventuale interazione con altri microrganismi (microbiota) e dalla fase di crescita (Vinale *et al.*, 2009) ed include sostanze appartenenti a diverse classi di composti chimici. La produzione di molecole a basso peso molecolare, non

polari e volatili (composti aromatici semplici, pironi, butenolidi e derivati isocianidrici) influenza la comunità microbica anche a lunga distanza. Al contrario, gli effetti a breve distanza possono essere associati alla produzione di antibiotici polari e peptaiboli che agiscono in prossimità delle ife. Metaboliti polari ad alto peso molecolare possono esprimere al meglio la loro attività in seguito a contatto fisico col patogeno (Vinale *et al.*, 2008).

Numerosi metaboliti secondari di origine microbica (in particolare da *Trichoderma* spp), oltre ad avere un effetto diretto contro gli agenti fitopatogeni, possono indurre resistenza sistemica nella pianta ospite. Inoltre, in alcuni casi ed a determinate concentrazioni, questi composti naturali possono promuovere la crescita ed aumentare le rese produttive (Vinale *et al.*, 2012).

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro è essenzialmente quello di selezionare specie fungine, nuove o già utilizzate in lotta biologica, per la produzione di metaboliti secondari attivi contro insetti agenti di danno in agricoltura. I principali obiettivi da raggiungere sono:

- realizzare una collezione di ceppi fungini da cui ottenere estratti utili o principi attivi per la realizzazione di formulati efficaci per la difesa delle colture da diversi tipi di patogeni o avversità;
- mettere a punto un metodo di selezione di sostanze naturali mediante un semplice e rapido saggio nei confronti di insetti dannosi;
- isolare nuove molecole da utilizzare per il potenziamento di formulati biologici, attraverso l'utilizzo di tecniche cromatografiche guidate dai biosaggi (*bioassay-guided chromatography*) su insetti dannosi per l'agricoltura;
- studiare i cambiamenti del metaboloma di funghi in co-coltura con specie fungine diverse anche modificando le condizioni di crescita, allo scopo di stimolare la produzione di metaboliti secondari potenzialmente utili.

La presente ricerca potrebbe incrementare le conoscenze necessarie a sviluppare nuovi formulati biologici a base di microrganismi vivi, singoli o in miscela e/o di metaboliti fungini secondari impiegabili per la lotta agli insetti patogeni in agricoltura.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Isolamento e identificazione dei ceppi fungini

Allo scopo di realizzare una collezione microbica utile alla ricerca di nuove molecole ad azione insetticida sono stati utilizzati diversi ceppi fungini isolati da varie fonti e/o già presenti nella collezione del Dipartimento di Agraria.

Alcune specie sono state isolate da campioni di terreno a diversa copertura vegetale: macchia mediterranea, bosco e pascolo. I campioni di suolo sono stati diluiti in acqua sterile (1:10; 1:100; 1:1000) e successivamente posti in piastre Petri contenenti Potato Dextrose Agar (PDA) (Sigma-Aldrich) addizionato con acido lattico 1% (v/v) (Sigma-Aldrich) per ridurre la crescita batterica e selezionare al meglio le colonie fungine. Sono state realizzate cinque repliche per ogni campione e tutte le piastre Petri sono state incubate a 25°C per 7 giorni. Ogni piastra è stata osservata per il monitoraggio della crescita fungina ed è stato verificato il numero di CFU (*Colony Forming Units*) (Maggi *et al.*, 2005). Successivamente le colonie singole sono state purificate mediante trasferimento in piastre di PDA e acido lattico (1%) e incubate alle condizioni precedenti. Una volta ottenuta una singola colonia fungina isolata, morfologicamente diversa dalle altre e ben visibile, ogni ceppo è stato inoculato in coltura liquida con 100 mL di Potato Dextrose Broth (Sigma-Aldrich) in beute da 250 mL, prelevando 2 *plug* da 33 mm di micelio dai margini più esterni della colonia. Ogni inoculo è stato realizzato in triplicato, e tutte le beute sono state incubate per 7 giorni a 25°C e 150 r.p.m. utilizzando un agitatore orbitale (Stuart SSL1).

Il micelio, ottenuto dopo filtrazione su carta Whatman No. 4 (Brentford, UK), è stato utilizzato per la classificazione molecolare della specie fungina attraverso estrazione e analisi del DNA ribosomiale (rDNA, de Graaff *et al.*, 1988). L'analisi del rDNA è stata effettuata attraverso PCR (*Polymerase Chain Reaction*) delle regioni ITS (*Internal transcribed Spacer*) utilizzando i *primers* ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Manter e Vivanco, 2007). I prodotti di PCR sono stati analizzati per elettroforesi su gel di agarosio e quantificati attraverso metodo fluorimetrico con il Qubit® 2.0. Gli amplificoni sono stati purificati impiegando il kit Invitrogen (PureLink® PCR Purification Kit), sequenziati ed analizzati su piattaforma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Altre specie fungine utilizzate erano già presenti nella collezione del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Il ceppo endofita F36CF, è stato isolato da un ramo di corbezzolo sull'isola di Favignana in Sicilia. L'isolamento del fungo è stato effettuato seguendo la procedura standard per i funghi endofiti descritta da Nicoletti *et al.* (2013). Il microrganismo è stato identificato come *Talaromyces pinophilus* seguendo le procedure sopra descritte ed analizzando la sequenza genica per la β -tubulina (Yilmaz *et al.* 2014).

Dopo l'identificazione molecolare, ogni specie è stata caratterizzata anche attraverso osservazioni morfologiche microscopiche e macroscopiche (Romano *et al.*, 2016). Tutte le specie fungine sono state successivamente conservate in monocultura. Il micelio allevato a 25 °C per 4 giorni su PDA è stato coperto con olio minerale sterile per la conservazione a lungo termine a temperatura ambiente.

3.2 Allevamento di insetti (Acyrtosiphon pisum) in condizioni controllate

È stato realizzato un allevamento di afide verde del pisello, *Acyrtosiphon pisum* (Harris), in condizioni controllate allo scopo di ottenere una popolazione di insetti per i successivi saggi di attività insetticida degli estratti fungini.

Gli insetti sono stati allevati su *Vicia faba* var. *aguadulce* in camera di crescita in condizioni controllate: 18/6 ore di luce/buio a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ di umidità relativa (De Feo *et al.*, 2009). In queste condizioni è stata ottenuta una popolazione di femmine partenogenetiche con un elevato tasso riproduttivo da utilizzare prontamente per i test. Le colonie di afidi sono state sincronizzate per i successivi saggi lasciando partorire le femmine su fava per 24 ore e, successivamente, rimuovendo solo gli adulti.

3.3 Saggi di attività nei confronti di Acyrtosiphon pisum

È stato messo a punto un metodo per verificare la potenziale attività insetticida di ogni estratto organico, frazione o molecola pura secondo quanto indicato in letteratura e presente nelle linee

guida della *Insecticide Resistance Action Committee* (www.iraac-online.org, metodo N° 019; Chandrasena *et al.*, 2011).

Dieci femmine adulte partenogenetiche di *A. pisum* sono state lasciate riprodurre in regime controllato (v. sopra) per 24 ore su piantine di *V. faba* var. *aguadulce* di 2 settimane. Successivamente, gli adulti sono stati rimossi utilizzando un piccolo pennello avendo cura di non danneggiarli. Piastre Petri da 90 mm sono state riempite con *water agar* all'1% (Sigma-Aldrich) e lasciate solidificare a temperatura ambiente. Il coperchio di ogni piastra Petri è stato forato (diametro = 5 cm) allo scopo di far fuoriuscire l'umidità in eccesso dopo i trattamenti con metaboliti fungini. Le soluzioni da saggiare sono state preparate sciogliendo il metabolita o la frazione organica nel minimo quantitativo possibile di acetato di etile, successivamente è stata prelevata la quantità opportuna di soluzione e portata a volume di 1 mL totale in acqua per raggiungere la concentrazione desiderata. Le soluzioni controllo sono state preparate sempre in acqua utilizzando lo stesso quantitativo di acetato di etile, per ottenere le stesse condizioni sperimentali dei trattamenti tranne che per la presenza dei metaboliti organici. Tutte le soluzioni, trattamento e controllo, sono state lasciate evaporare per 24 ore sotto cappa chimica in agitazione, per consentire l'allontanamento del solvente organico. Tutti i trattamenti ed i controlli sono stati effettuati in triplicato. Sono state testate diverse concentrazioni di estratti fungini e molecole pure.

Trascorse le 24 ore, 20 ninfe attere per ogni replica sono state utilizzate per i test. Esse sono state prelevate con delicatezza dalle piante utilizzando un piccolo pennello e poi riposte in un tubo Eppendorf da 1,5 mL. Due segmenti (3,5 cm) di foglia di fava di due settimane sono stati tagliati e riposti con la pagina inferiore aderente al *water agar* precedentemente versato. Al di sotto di ogni *plug* è stata posta una piccola goccia d'acqua per consentire al meglio l'adesione della foglia (*Insecticide Resistance Action Committee*, www.iraac-online.org, metodo N° 019). Gli afidi sono stati immersi nelle soluzioni da testare e lasciati a bagno per 10 secondi, poi riposti su carta da filtro per eliminare il liquido in eccesso. Ogni individuo è stato poi prelevato e posizionato sui segmenti di foglia precedentemente posti sul *water agar* (Chandrasena *et al.*, 2011). Le piastre Petri sono state richiuse inserendo, al di sotto del coperchio forato, un foglio di carta molto sottile per consentire così la fuoriuscita dell'umidità in eccesso evitando contaminazioni esterne (Fig. 4).



Figura 4. Esempio di piastra Petri preparata per effettuare test di attività insetticida su *A. pisum*.

Le piastre sono state incubate in camera di crescita alle stesse condizioni controllate di allevamento. Dopo 24, 48 e 72 ore è stata verificata l'attività insetticida di ogni estratto o molecola pura attraverso il conteggio degli insetti vivi e morti ed i valori sono stati elaborati con la formula di Abbott (Abbott, 1925) come sotto riportato:

$$\% = \left(1 - \frac{\text{n di vivi nel trattato}}{\text{n di vivi nel controllo}} \right) \times 100$$

n di vivi nel trattato = numero di insetti vivi presenti nella piastra trattata con la miscela da saggiare

n di vivi nel controllo = numero di insetti vivi presenti nella piastra trattata con il solo solvente in acqua (controllo).

Per ogni soluzione saggiata, e per i relativi controlli, è stata verificata la fitotossicità su pianta, utilizzando piante di *V. faba* di due settimane. Sulla pagina superiore di ogni foglia sono stati posti 10 µl di soluzione alla concentrazione utilizzata per il saggio di attività insetticida e lasciati asciugare. Ogni test è stato effettuato in triplicato. Le piantine così trattate sono state riposte in camera di crescita in condizioni controllate. Anche in questo caso, dopo 24 ore, e per le successive 72, sono stati effettuati controlli per verificare la presenza di eventuale necrosi fogliare.

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato e analizzati con *one-way* ANOVA ($p < 0,05$) con test *post hoc* LSD, utilizzando il *software* SPSS vers. 10.

3.4 Estrazione di metaboliti secondari da filtrati colturali fungini

Ogni ceppo è stato inoculato in piastre Petri contenenti PDA (Sigma-Aldrich) e incubato a 25°C per 7 giorni. Una volta verificate le condizioni di crescita del fungo in piastra e accertata la purezza delle colture, si è provveduto alla raccolta delle spore mediante filtrazione con lana di vetro sterile. Per ogni sospensione di spore così ottenuta è stata verificata la concentrazione utilizzando una camera contaglobuli di Burker.

Le colture liquide sono state ottenute inoculando 1 ml di una sospensione di spore alla concentrazione di 1×10^6 sp/mL in 2,5 L di PDB (Sigma-Aldrich) in beute da 5 L (Erlenmeyer). Tutte le colture sono state poste in condizioni di crescita statiche a 25 °C per 30 giorni (Vinale *et al.*, 2013). Successivamente il brodo di coltura è stato raccolto e filtrato sotto vuoto utilizzando della carta da filtro Whatman No. 4 (Brentford, UK), allo scopo di allontanarne il micelio. Il filtrato colturale ottenuto è stato estratto mediante estrazione liquido/liquido con solventi organici a differente polarità (acetato di etile, diclorometano/metanolo, metanolo/acqua) allo scopo di mettere a punto un metodo adatto all'estrazione di metaboliti secondari di tutti i ceppi utilizzati. È stato selezionato l'acetato di etile (EtOAc) quale solvente organico più adatto per l'estrazione esaustiva (valutata in termini di massimo contenuto in mg di estratto secco) dei metaboliti secondari di tutti i ceppi saggiati.

Gli estratti ottenuti dai filtrati colturali di ogni ceppo sono stati anidrificati con Na₂SO₄ anidro. Successivamente, il solvente è stato allontanato attraverso evaporazione a pressione ridotta ad una temperatura di 35° C impiegando un evaporatore rotante (Rotavapor RV 10 Ika®). Il residuo ottenuto dal filtrato colturale di ciascun ceppo fungino è stato ridisciolti nel minimo quantitativo possibile di acetato di etile e analizzato mediante TLC (Silica gel, Kieselgel 60, GF254 di 0,25 mm, Merck, Darmstadt; Germany) utilizzando i seguenti eluenti: diclorometano/metanolo 9:1; 8:2 (v/v); cloroformio/metanolo 9:1; 8:2 (v/v); acetato di etile/etere di petrolio 9:1; 8:2 (v/v). I composti contenuti in ogni estratto sono stati rilevati mediante esposizione ai raggi UV (254 o 366 nm) e spruzzando le lastre con una soluzione di H₂SO₄ al 5% in etanolo e successivo trattamento a 100 °C su piastra riscaldante.

3.5 Isolamento e caratterizzazione di metaboliti dotati di attività insetticida

Gli estratti organici sono stati sottoposti ad un frazionamento guidato dai saggi *in vivo* (*Bioassay-Guided Fractionation*) (Malherios *et al.*, 2005), per ottenere le singole molecole pure dotate di attività insetticida.

La separazione è stata realizzata attraverso cromatografia su colonna di gel di silice (Merck, 0.2-0.5 mm) a pressione atmosferica (diametro: 4 cm; lunghezza 1.30 m) i cui dettagli su eluenti e numero di frazioni totali raccolte sono riportati in Tabella 3. L'andamento cromatografico è stato monitorato mediante cromatografia su strato sottile (TLC Thin-Layer-Chromatography) come descritto precedentemente. I solventi ed i reattivi utilizzati sono tutti della Sigma-Aldrich se non altrimenti indicato.

Tutti gli estratti grezzi ottenuti, le frazioni intermedie (79 in totale) (Tabella 3) e le molecole pure sono state saggiate a diverse concentrazioni più volte su afidi per verificarne il mantenimento dell'attività insetticida con il progredire della purificazione.

Gli estratti grezzi e le frazioni ottenute sono state caratterizzate impiegando tecniche spettrometriche di seguito descritte.

Tabella 3: Specie fungine da cui sono stati ottenuti gli estratti grezzi, metodo di estrazione liquido/liquido e numero di frazioni ottenute per ciascuna specie (79 totali).

Specie	Metodo di frazionamento con colonna cromatografica con gel di silice 0,2-0,5 mm (Merck)	Numero totale di frazioni ottenute e analizzate
<i>Trichoderma tomentosum</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	3
<i>Chloridium virescens</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	4
<i>Trichoderma velutinum</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	5
<i>Penicillium restrictum</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	5
<i>Trichoderma harzianum</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	4
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	5
<i>Penicillium griseofulvum</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	8
<i>Penicillium chrysogenum</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	4
<i>Penicillium restrictum</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	4
<i>Penicillium decumbens</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	3
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	diclorometano/metanolo (90:10, v:v); la frazione 4 è stata ulteriormente purificata con PLC (20x20, 2 mm Merck) in diclorometano/metanolo (90:10, v:v)	5
<i>Trichoderma asperellum</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	6
<i>Beauveria bassiana</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	5
<i>Metarhizium anisopliae</i>	acetato di etile/etere di petrolio (90:10, v:v)	7
<i>Talaromyces pinophilus</i>	diclorometano/metanolo (98:2, v:v); la frazione 2 è stata ulteriormente purificata con TLC (20x20 cm 60 F254 Merck) in diclorometano/metanolo (98:2, v:v)	7
Co-coltura <i>Talaromyces pinophilus</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	separazione dell'esausto acquoso in acetonitrile/acqua (20/80; 90/10, v:v). Solventi acidificati con lo 0,1 % di acido formico. La frazione 4 è stata ulteriormente purificata con HPLC usando una colonna C18 (AgilentPoroshell, 2.7 µm, 100 x 2.1 mm) con un flusso di 1 mL/min utilizzando la precedente fase mobile	4

3.5.1 *Derivati acetilati*

Per confermare l'ipotesi di struttura di molecole potenzialmente nuove e per comprendere al meglio la relazione struttura/attività insetticida sono stati realizzati dei derivati acetilati come di seguito descritto.

Quaranta μl di anidride acetica $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ sono stati aggiunti a 2,5 mg di metabolita puro. La reazione è stata lasciata in agitazione sotto cappa chimica per circa 2 ore a 25 °C in modo da lasciar evaporare completamente il reagente. Successivamente, ogni molecola acetilata è stata purificata utilizzando una lastra preparativa PLC (2 mm-Merck), con eluente etere di petrolio/acetone (20:80, v/v), in una camera in vetro da 200 x 200 mm (Permax). La verifica della reazione è stata operata attraverso analisi LC-MS q-TOF. I composti acetilati sono stati saggiati su afidi come descritto precedentemente.

3.5.2 *LC-MS q-TOF*

Le analisi per la caratterizzazione chimica degli estratti organici ottenuti da colture fungine, delle frazioni e dei singoli composti, sono state condotte con un apparato LC-MS q-TOF (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry quadrupole-Time Of Flight) Agilent 6540 impiegando il *software* Mass Hunter data Acquisition B.05.01.

Gli spettri di massa in alta risoluzione ottenuti con questo metodo consentono di stabilire la composizione elementare, detta anche firma isotopica, di una molecola (Holčápek *et al.*, 2012). Dal confronto con una *library* di riferimento dei valori di massa/carica (m/z) ottenuti, si possono identificare le molecole presenti nel campione analizzato ottenendo informazioni aggiuntive sulla natura chimica (struttura molecolare; tempo di ritenzione; assorbanza-UV; formula bruta ecc.). La *library* utilizzata è stata ottenuta selezionando metaboliti secondari prodotti da specie microbiche diverse e inserendo nel software Mass Hunter data Acquisition B.05.01 i dati relativi alla formula bruta ed al peso molecolare di più di 4000 molecole derivanti dal metabolismo fungino. Essa è stata utilizzata come riferimento per analizzare i metaboliti contenuti negli estratti grezzi e nelle molecole pure ottenute dalle specie fungine selezionate. In tabella 4 è riportato il metodo utilizzato per analizzare i filtrati colturali, le frazioni e le molecole isolate.

Tabella 4: metodo LC-MS q TOF per l'analisi dei campioni di estratti organici da filtrati colturali fungini; il solvente A era costituito da acqua + 0,1 % (v/v) di acido formico ed il solvente B da acetonitrile + 0,1 % (v/v) acido formico. Per tutte le analisi è stata impostata una spettroscopia di UV-VIS da 210 a 360 nm ed un flusso d'iniezione di 0,600 mL/min.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	95	5
12	0	100
15	0	100
17	95	5
20	95	5

Due composti di massa molecolare nota sono stati usati come riferimento per realizzare la misura delle masse dei composti presenti negli estratti: una soluzione di purine ($C_5H_4N_4$ con m/z 121.050873, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 1H,1H, 3H-tetrafluoropentoxo-phosphazene, $C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$ con m/z 922.009798, $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Il capillare è stato impostato a 4000 V, e la frammentazione a 180 V. La temperatura del gas è stata impostata a 350°C durante tutte le corse, ed il nebulizzatore impostato a 45 psig. Il volume di campione iniettato, per ogni estratto, è stato di 5 μl .

3.5.3 NMR

La caratterizzazione strutturale univoca dei metaboliti secondari fungini dotati di attività insetticida è stata condotta mediante risonanza magnetica nucleare (NMR), utilizzando lo strumento Variant 400 a 400 (^1H) e 125 (^{13}C) MHz presente nel CERMNU (Centro di risonanza magnetica nucleare) dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Gli esperimenti NMR mono e bidimensionali realizzati sono i seguenti: ^1H , ^{13}C e DEPT 135, COSY e HSQC, HMBC (Wong, 2014). I solventi deuterati impiegati sono stati cloroformio, metanolo e dimetilsolfossido a seconda della polarità del campione da analizzare. Il segnale di questi solventi è stato utilizzato come riferimento per la interpretazione degli spettri e dei relativi *chemical shift*.

3.6 Co-culture di funghi per stimolare la produzione di composti utili

Allo scopo di stimolare la produzione di metaboliti secondari da parte delle specie fungine sono state realizzate delle co-culture in substrato liquido (Brakhage, 2013; Oh *et al.*, 2007). Sono state scelte in particolare le specie elencate di seguito in quanto, da studi in letteratura, erano considerate potenzialmente capaci di produrre una gran varietà di metaboliti secondari caratterizzati dal possedere diverse proprietà utili all'impiego in formulati per l'agricoltura e in altri ambiti.

Tre co-culture sono state realizzate con le seguenti specie:

1. *Pochonia chlamydosporia* (fungo nematopatogeno) + *Paecilomyces lilacinus* (fungo entomopatogeno, micoteca del Dipartimento di Agraria Università di Napoli Federico II);
2. *Pochonia chlamydosporia* + *Beauveria bassiana* (fungo entomopatogeno, micoteca del Dipartimento di Agraria Università Federico II di Napoli);
3. *Trichoderma harzianum* ceppo M10 (agente di biocontrollo isolato da corteccia) + *Talaromyces pinophilus* F36CF (fungo endofita isolato da corbezzolo).

Le co-culture liquide 1 e 2 sono state realizzate inoculando 100 µl di una sospensione di spore 1×10^6 sp/ml in 500 mL di PDB (Sigma-Aldrich), in beute Erlenmayer da 1 L poste in condizioni statiche di crescita a 25 °C. Dopo 21 giorni di incubazione, 1 mL di brodo di coltura è stato prelevato in sterilità e analizzato attraverso analisi LC-MS q-TOF.

Per la co-cultura 3, invece, sono stati prelevati due segmenti (7 mm²) di micelio fresco da piastre Petri con PDA (Sigma-Aldrich) contenenti la monocultura dei due ceppi, che sono stati inoculati in 100 mL di PDB (Sigma-Aldrich) in beute Erlenmayer da 500 mL. Le colture sono state poste in crescita a 25 °C in condizioni statiche. Dopo 21 giorni dall'inoculo un'aliquota di 1 mL di brodo di coltura è stata prelevata in sterilità da ciascun beuta, e analizzata con l'ausilio dello strumento LC-MS q-TOF per l'analisi metabolomica e quella delle componenti principali (*principal component analysis* - PCA) effettuata con il *software* Mass Hunter Profinder.

Tutte le co-culture sono state realizzate in triplice replica e, per ogni ceppo, è stata realizzata una monocultura il cui filtrato, analizzato come precedentemente descritto, è servito come controllo.

3.7 Produzione di metaboliti attivi in substrati diversi

La valutazione dei substrati ideali per la produzione di metaboliti insetticidi è stata effettuata mediante prove di crescita dei ceppi nei seguenti substrati:

1. Corn Meal Broth (Sigma-Aldrich, infuso di mais)
2. V8 (Sigma-Aldrich, estratto vegetale)
3. Yeast Mannitol Broth (Sigma-Aldrich, estratto di lievito con aggiunta di mannitolo)
4. PDB + Yeast 5g/L (Sigma-Aldrich, estratto di patata con aggiunta di lievito)
5. PDB (estratto di patata)

L'inoculo in substrato liquido (100 ml di substrato in beute Erlenmeyer da 250 mL) è stato effettuato prelevato due segmenti di micelio da piastre Petri con PDA in crescita a 25 °C da 7 giorni. Tutte le beute sono state incubate in condizioni statiche a 25 °C per 30 giorni. L'esperimento è stato svolto in triplicato per ogni inoculo. A partire dal 7° giorno successivo agli inoculi, 1 mL di brodo di coltura per ogni substrato è stato prelevato in sterilità e analizzato attraverso LC-MS q-TOF, allo scopo di verificare l'andamento della produzione metabolica. Questa operazione è stata effettuata una volta a settimana fino al 30° giorno successivo agli inoculi.

4. RISULTATI

4.1 Allestimento di una collezione di ceppi microbici ed ottenimento di estratti organici

I ceppi isolati da diverse matrici ed ottenuti in coltura axenica sono stati conservati a -20 °C fino alla successiva crescita in mezzo liquido. In tabella 5 sono riportati tutti i microrganismi utilizzati per le estrazioni di composti bioattivi utili. Tutte le colture sono state conservate su substrato di PDA, alla temperatura di 25°C e rinnovate mensilmente.

Tabella 5: Collezione di ceppi microbici utilizzata per le estrazioni dei composti. Sono indicate la provenienza, la categoria biologica di appartenenza e l'attività biologica nota del fungo

Specie	Ceppo	Provenienza	Categoria	Attività
<i>Trichoderma tomentosum</i>	F19	Querceta	Antagonista	Insetticida/Fungicida
<i>Cloridium virescens</i>	F57	Pascolo	Antagonista	Insetticida/Battericida
<i>Trichoderma velutinum</i>	F28	Querceta	Antagonista	Fungicida
<i>Penicillium restrictum</i>	F55	Macchia mediterranea	Antagonista	Fungicida
<i>Trichoderma harzianum</i>	F53	Macchia mediterranea	Antagonista	Biocontrollo di specie fungine, produzione di metaboliti e promozione di crescita
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	100379	Collezione del Dipartimento di Agraria	Antagonista	Nematocida
<i>Penicillium griseofulvum</i>	F11	Macchia mediterranea	Saprofita	Produzione di micotossine
<i>Penicillium chrysogenum</i>	F5	Macchia mediterranea	Antagonista	Insetticida/Battericida
<i>Penicillium decumbens</i>	F29	Macchia mediterranea	Saprofita	Citotossico/Antibiotico
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	B	Collezione del Dipartimento di Agraria	Antagonista	Nematocida

<i>Trichoderma asperellum</i>	CINO1	Collezione del Dipartimento di Agraria	Antagonista	Biocontrollo di specie fungine, produzione di metaboliti e promozione di crescita
<i>Beauveria bassiana</i>		Collezione del Dipartimento di Agraria	Antagonista	Insetticida
<i>Metarhizium anisopliae</i>		Collezione del Dipartimento di Agraria	Antagonista	Insetticida
<i>Talaromyces pinophilus</i>	F36CF	Corbezzolo isola di Favignana (Sicilia)	Endofita	Produzione di metaboliti ad azione antibatterica/antifungina
<i>Trichoderma harzianum</i>	M10	Collezione del Dipartimento di Agraria	Antagonista	Biocontrollo di specie fungine, produzione di metaboliti e promozione di crescita

Gli isolati sono stati allevati in mezzo liquido ed i filtrati colturali sono stati estratti con diversi solventi organici per valutarne il più efficiente in termini di resa di estrazione. Il solvente che ha dato i migliori risultati al termine della estrazione liquido/liquido è stato l'acetato di etile, sia in termini di quantità di estratto (Tabella 6) sia in termini di varietà di metaboliti estratti (dati non mostrati).

Tabella 6: Quantità di estratti organici ottenuti dalle rispettive specie fungine con diversi solventi di estrazione.

Specie	Metodo di estrazione	Quantità di estratto ottenuto (mg)
<i>T. tomentosum</i>	acetato di etile;	250
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	120
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	80
<i>C. virescens</i>	acetato di etile;	125
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	23
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	56
<i>T. velutinum</i>	acetato di etile;	360
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	130
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	200
<i>P. restrictum</i>	acetato di etile;	230
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	160
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	100
<i>T. harzianum</i>	acetato di etile;	340
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	200
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	100
<i>P. lilacinus</i>	acetato di etile;	430
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	260
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	120
<i>P. griseofulvum</i>	acetato di etile;	210
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	34
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	150
<i>P. chrysogenum</i>	acetato di etile;	200
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	34
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	65
<i>P. restrictum</i>	acetato di etile;	130
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	24
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	100
<i>P. decumbens</i>	acetato di etile;	370
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	120
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	89
<i>P. chlamydosporia</i>	acetato di etile;	380
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	240
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	189
<i>T. asperellum</i>	acetato di etile;	330
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	120
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	45
<i>B. bassiana</i>	acetato di etile;	420
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	238
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	120
<i>M. anisopliae</i>	acetato di etile;	460
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	123
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	100
<i>T. pinophilus</i>	acetato di etile;	346
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	200
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	123
Co-coltura <i>T. pinophilus</i> + <i>T. harzianum</i>	acetato di etile;	460
	diclorometano/metanolo (9:1, v/v);	100
	metanolo/acqua (9:1, v/v)	46

4.2 Attività insetticida degli estratti organici da filtrati colturali

I saggi di attività effettuati nei confronti di afidi della specie *A. pisum* hanno consentito di selezionare gli estratti organici da filtrati colturali microbici dotati di attività insetticida. In particolare, sono risultati attivi gli estratti delle specie *P. lilacinus*, *P. griseofulvum*, *P. chlamydosporia*, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *T. pinophilus* (Tabella 7). Tutte le altre specie fungine testate non hanno presentato attività insetticida significativa.

Tabella 7: Attività insetticida degli estratti grezzi ottenuti dalle diverse specie fungine; valori corretti con la formula di Abbott (%) (Abbott, 1925).

Ceppo	Specie	Attività insetticida dopo 72 h (% di mortalità alla concentrazione 10 mg/mL)	Dev. St.
F19	<i>T. tomentosum</i>	0	(± 0)
F57	<i>C. virescens</i>	0	(± 0)
F28	<i>T. velutinum</i>	0	(± 0)
F55	<i>P. restrictum</i>	0	(± 0)
F53	<i>T. harzianum</i>	0	(± 0)
100379	<i>P. lilacinus</i>	3,33	(± 1,1)
F11	<i>P. griseofulvum</i>	40	(± 2,3)
F5	<i>P. chrysogenum</i>	0	(± 0)
F1	<i>P. restrictum</i>	0	(± 0)
F29	<i>P. decumbens</i>	0	(± 0)
B	<i>P. chlamydosporia</i>	47	(± 1,4)
CINO 1	<i>T. asperellum</i>	0	(± 0)
-	<i>B. bassiana</i>	40	(± 3,4)
-	<i>M. anisopliae</i>	40	(± 2,2)
F36CF	<i>T. pinophilus</i>	35,7	(± 1,3)
M10	<i>T. harzianum</i>	0	(± 0)

Gli estratti organici grezzi attivi sono stati frazionati mediante cromatografia liquida a pressione atmosferica per ottenere singoli composti in purezza o miscele di molecole.

In Tabella 8 sono riportate tutte le frazioni pure e le miscele raccolte al termine delle separazioni cromatografiche.

Il ceppo di *P. chlamydosporia* ha prodotto un estratto particolarmente attivo che è stato frazionato mediante cromatografia in fase diretta ottenendo cinque frazioni di cui due, la 2 e la 4, dotate di elevata attività insetticida nei confronti di *A. pisum*. Quest'ultima è stata ulteriormente purificata attraverso cromatografia preparativa su strato sottile consentendo di ottenere un singolo composto (frazione 4.1) attivo (Figura 5).



Figura 5. PTLC (*Preparative-Thin-Layer-Chromatography*) della frazione pura 4.1 di *P. chlamydosporia* ottenuta con diclorometano/metanolo (9:1 v/v) come fase mobile. Il metabolita di colore giallo intenso è stato rilevato mediante esposizione a lampada UV a 254 nm e, data l'intensa colorazione, anche visionando la lastra cromatografica con luce naturale.

Tabella 8: Frazioni organiche dotate di attività insetticida purificate dai singoli estratti grezzi per ogni specie

Specie fungina	Frazione con attività insetticida
<i>P. lilacinus</i>	3
<i>P. griseofulvum</i>	7
<i>P. chlamydosporia</i>	4.1*
<i>B. bassiana</i>	3
<i>M. anisopliae</i>	4
<i>T. pinophilus</i>	2

*Sub-frazione della Frazione 4 di 5 totali

4.3 Isolamento e caratterizzazione degli estratti purificati

La caratterizzazione chimica è stata effettuata impiegando tecniche spettrometriche (LC-MS q-TOF e NMR) che hanno consentito la identificazione dei metaboliti responsabili dell'attività insetticida. La frazione attiva (3) della specie *P. lilacinus* è risultata essere costituita da una miscela di tre leucinostatine (A, B, e D, rispettivamente con formula bruta $C_{62}H_{111}N_{11}O_{13}$, $C_{61}H_{109}N_{11}O_{13}$, $C_{56}H_{101}N_{11}O_{11}$); (Fig. 25) nome IUPAC: **leucinostatina A** = (2S,4S)-N-[(2S,4S)-1-[[[(2S,3R)-1-[[1-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-[[1-[[1-[[3-[[[(2S)-1-(dimethylamino)propan-2-yl]amino]-3-oxopropyl]amino]-2-methyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-2-methyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-2-methyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-3-hydroxy-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-6-hydroxy-4-methyl-1,8-dioxodecan-2-yl]-4-methyl-1-[(E,4R)-4-methylhex-2-enoyl]pyrrolidine-2-carboxamide; **leucinostatina B** = N-[6-hydroxy-1-[[3-hydroxy-4-methyl-1-[[2-methyl-1-[[4-methyl-1-[[4-methyl-1-[[2-methyl-1-[[2-methyl-1-[[3-[1-(methylamino)propan-2-ylamino]-3-oxopropyl]amino]-1-oxopropan-2-yl]amino]-1-oxopropan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopropan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-4-methyl-1,8-dioxodecan-2-yl]-4-methyl-1-[(E)-4-methylhex-2-enoyl]pyrrolidine-2-carboxamide; **leucinostatina D** = (4R)-N-[1-[[3-hydroxy-4-methyl-1-[[2-methyl-1-[[4-methyl-1-[[4-methyl-1-[[2-methyl-1-[[2-methyl-1-[[3-[1-(methylamino)propan-2-ylamino]-3-oxopropyl]amino]-1-oxopropan-2-yl]amino]-1-oxopropan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopropan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]-4-methyl-1-[(E,4S)-4-methylhex-2-enoyl]pyrrolidine-2-carboxamide ; RT (*Retention Time*) = 10,351-14,574; Assorbanza UV-VIS = 210 nm. In figura 6 è riportato lo spettro di massa ottenuto mediante analisi LC-MS q-TOF della frazione attiva di *P. lilacinus*, che evidenzia la presenza nella miscela delle tre leucinostatine (peptidi di massa 1218.634 g/mol; 1204.607 g/mol; 1104.4799) e dei relativi addotti.

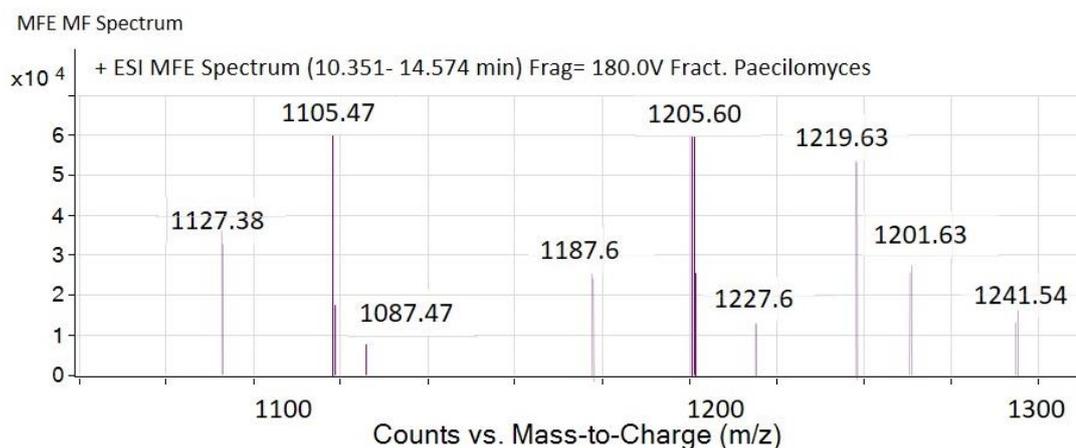


Figura 6. Spettro di massa della frazione 3 ottenuta dall'estratto organico di *P. lilacinus* corrispondente ad una miscela di Leucinostatine (A, B e D); m/z 1219,63 = [M+H]⁺; m/z 1241,63 = [M+Na]⁺; m/z 1201,63 = [M+ H-H₂O]⁺ (Leucinostatina A); m/z 1205,60 = [M+H]⁺; m/z 1227,6 = [M+Na]⁺; m/z 1187,6 = [M+ H-H₂O]⁺ (Leucinostatina B); m/z 1105,47 = [M+H]⁺; m/z 1127,47 = [M+Na]⁺; m/z 1087,47 = [M+ H-H₂O]⁺ (Leucinostatina D).

La frazione attiva dell'estratto ottenuto da *P. griseofulvum* è risultata essere costituita dalla griseofulvina (Fig. 25), una nota micotossina (Bhat *et al.*, 2005). Questo metabolita ha formula bruta C₁₇H₁₇ClO₆; nome IUPAC = (2S,6'R)-7-Chloro-2',4,6-trimethoxy-6'-methyl-3H,4'H-spiro[1-benzofuran-2,1'-cyclohex[2]ene]-3,4'-dione; RT = 9,950-10,049 min; UV-VIS = 291 nm; massa molecolare pari a 352.0713 Da (Figura 7). In figura 7 è riportato lo spettro di massa in cui si possono individuare: il picco ionico molecolare, alcuni prodotti di frammentazione e gli addotti della molecola.

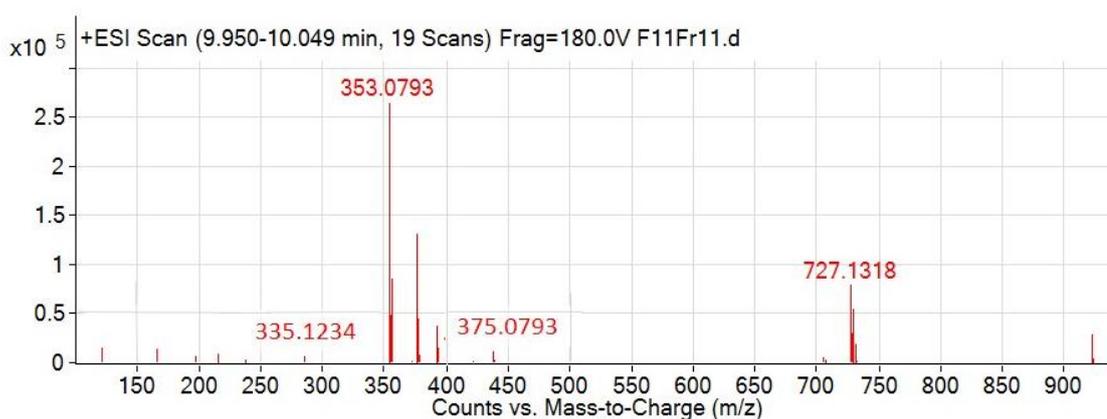
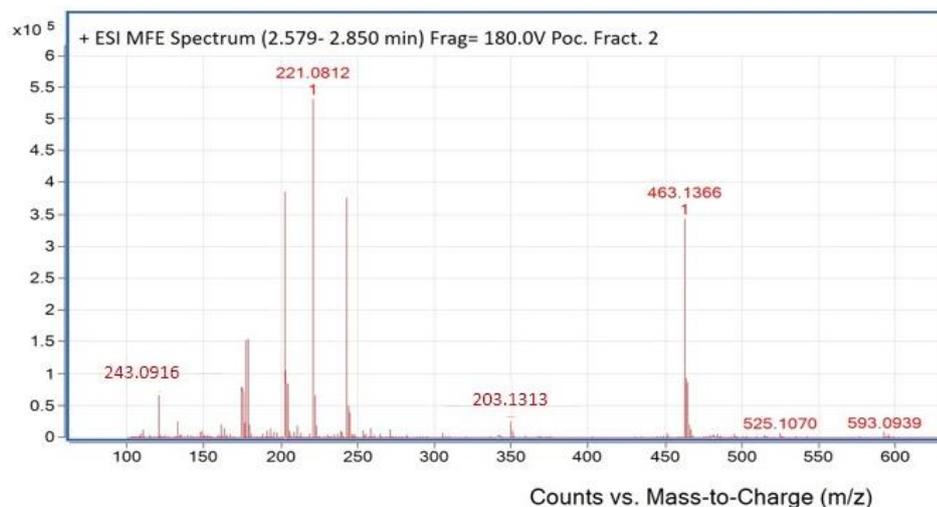
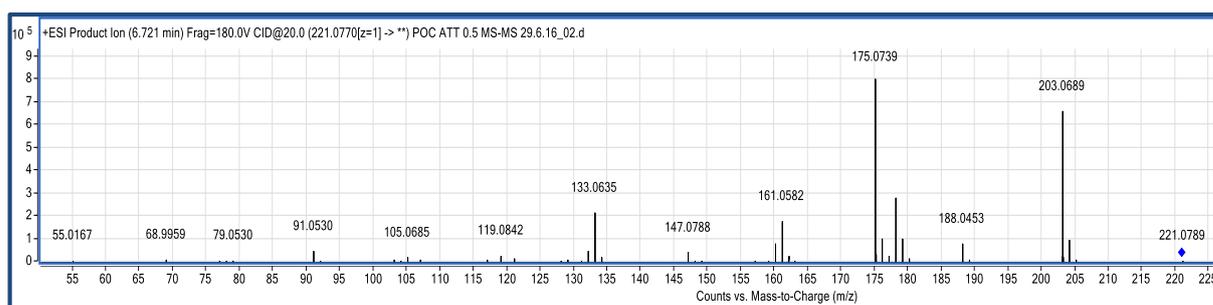


Figura 7. Spettro di massa della frazione 7 ottenuta dall'estratto organico di *P. griseofulvum* corrispondente alla griseofulvina m/z 335,1234 = [M + H - H₂O]⁺; m/z 353,0793 = [M+H]⁺; m/z 375,0793 = [M + Na]⁺; m/z 727,1318 = [M₂ + Na]⁺.

La frazione attiva (4.1) di *P. chalmydosporia* ottenuta mediante *bioassay-guided chromatography*, non presentava dati spettroscopici presenti in letteratura, evidenziando che la natura chimica di questo metabolita non è stata mai riscontrata da fonti naturali o ottenuta mediante sintesi. In figura 8 sono riportati lo spettro di massa (LC-MS q-TOF) e quello di frammentazione (MS/MS), ed in tabella 9 i dati NMR che hanno permesso di identificare un nuovo azafilone, che è stato denominato chlamyphilone (CH), con nome IUPAC 7-Hydroxy-3,4,7-trimethyl-isochromene-6,8-dione.



(A)



(B)

Figura 8. Spettro di massa (A) e di frammentazione (B) del chlamyphilone.

Gli spettri di massa in alta risoluzione hanno consentito di ricavare, grazie al software Mass Hunter data Acquisition B.05.01 della Agilent, la formula bruta della molecola isolata: $C_{12}H_{12}O_4$. Inoltre, sono stati rilevati: i) la massa, pari a 220.0814; ii) gli addotti a 463.1366 $[M_2+Na]^+$, a 243.0916 $[M+Na]^+$, a 221.0812 $[M+H]^+$; ii) i prodotti di deidratazione 203.1313

$[M+H-H_2O]^+$ (Fig. 8A). In figura 8B sono rappresentati tutti i frammenti della molecola chlamyphilone ottenuti dall'analisi di massa-massa, che sono:

$$188 = 203.1313 [M+H-H_2O]^+ - -CH_3$$

$$175 = 203.1313 [M+H-H_2O]^+ - -CH_3 - CH$$

$$161 = 203.1313 [M+H-H_2O]^+ - -CH_3 - CH - CH_2$$

$$147 = 203.1313 [M+H-H_2O]^+ - -CH_3 - CH - CH_2 - CH_2$$

$$133 = 203.1313 [M+H-H_2O]^+ - -CH_3 - CH - CH_2 - CH_2 - CH_2$$

La formula bruta del metabolita, $C_{12}H_{12}O_4$, presenta sette insaturazioni e la sua struttura è rappresentata in figura 9.

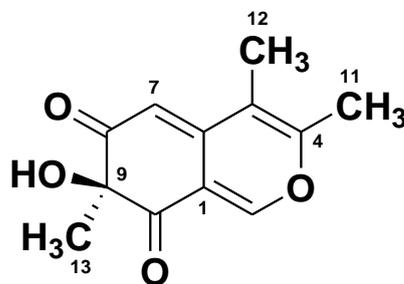


Figura 9. Struttura molecolare del chlamyphilone (CH).

Il chlamyphilone (CH) puro è un solido amorfo di colore giallo intenso i cui dati NMR sono riportati in tabella 9:

Tabella 9: Dati dell'analisi di Risonanza Magnetica Nucleare, protonico (^1H NMR) e carbonio 13 (^{13}C NMR) del chlamyphilone in cloroformio deuterato (CDCl_3), e *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC)

Chlamyphilone (CH)			
position	δ_{C} mult.	δ_{H} (J in Hz)	HMBC*
1	115.3 qC		
2	151.7 CH	7.91 d (1.37)	1, 10, 11
4	155.1 qC		
5	114.4 qC		
6	145.2 qC		
7	102.9 CH	5.55 d (1.37)	6, 9
8	196.3 qC		
9	83.1 qC		
10	196.5 qC		
11	17.5 CH_3	2.26 d (0.6)	2
12	12.7 CH_3	1.93 d (0.6)	4, 6
13	28.6 CH_3	1.55 s	9, 10, 8
OH		3.9	8

*tutte le correlazioni rappresentano 2 o 3 coppie di legami. Abbreviazioni, s: singoletto, d: doppietto.

In figura 10 è riportato lo spettro protonico di CH che presentava quattro doppietti a 7.91 ($J = 1.37$), 5.55 ($J = 1.37$), 2.26 ($J = 0.6$) e 1.93 ($J = 0.6$), e due singoletti a 1.55 e 3.9 (segnale *broad* per $-\text{OH}$).

Sei segnali di Carbonio a 102.9, 114.4, 115.3, 145.2, 151.7 e 155.1 ppm rivelavano tre doppi legami, mentre i segnali a 196.3 e 196.5 ppm indicavano la presenza di due chetoni (Fig. 11). Gli altri quattro segnali dello spettro del ^{13}C erano tutti spostati nel *range* di 12.7 – 83.11 ppm (Fig. 11).

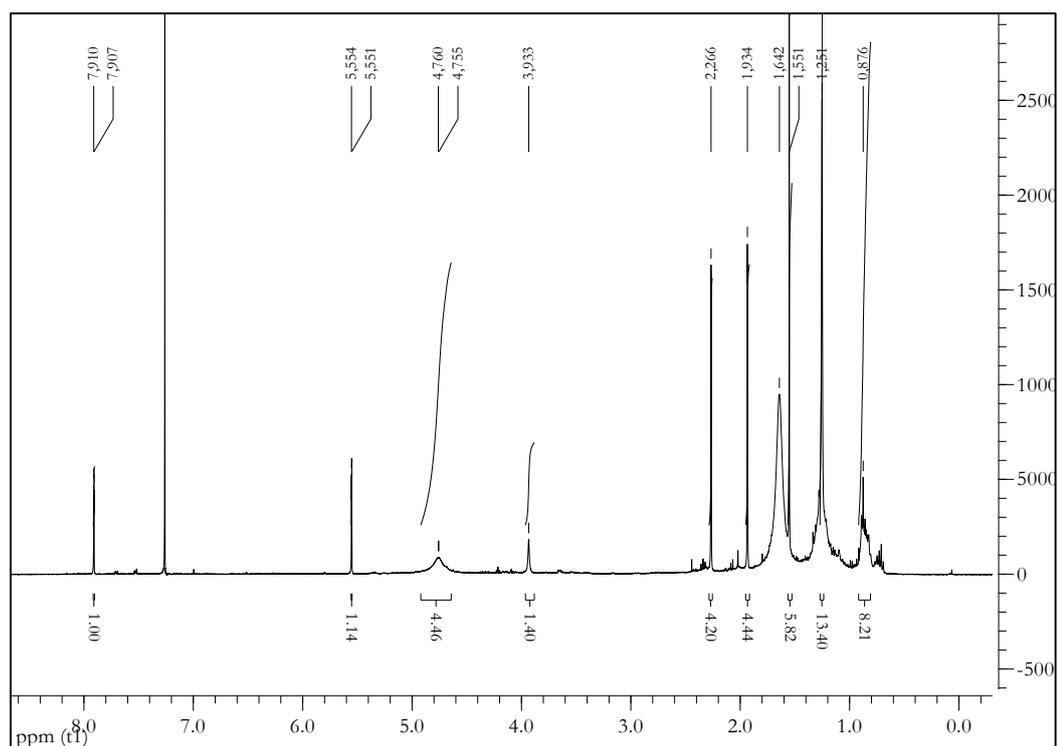


Figura 10. Spettro protonico (^1H NMR) del chlamyphilone; X = ppm; Y = segnali per ^1H .

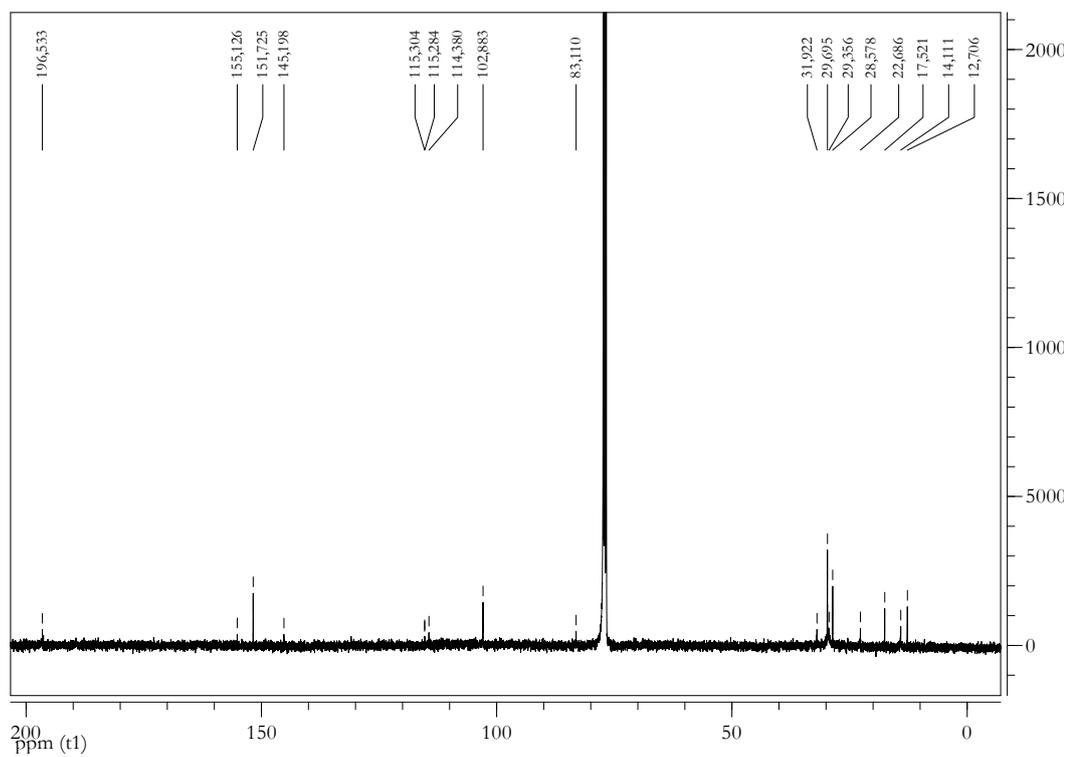


Figura 11. Spettro Carbonio 13 (^{13}C NMR) del chlamyphilone; X = ppm; Y = segnali per ^{13}C .

Il DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) ha dimostrato che uno dei protoni era legato all'ossigeno, e che nella molecola erano presenti 3CH₃, 2CH, e 7 atomi di carbonio completamente sostituiti (Fig. 12).

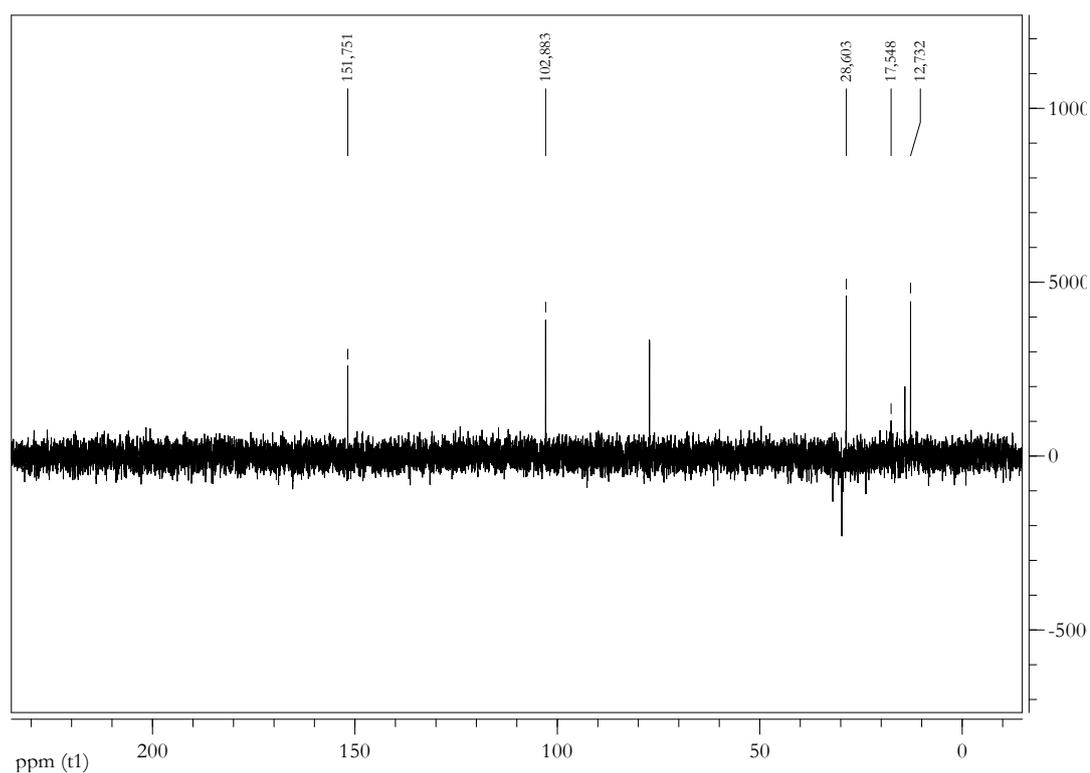


Figura 12. DEPT 135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) del chlamyphilone; X = ppm, Y = segnali per CH; CH₂; CH₃.

L'analisi ¹H-¹H COSY (*CORrelation SPECTROSCOPY*), HSQC (Fig. 13 e 14) e la valutazione dei *chemical shift* (Tabella 9) hanno consentito l'identificazione dei frammenti strutturali.

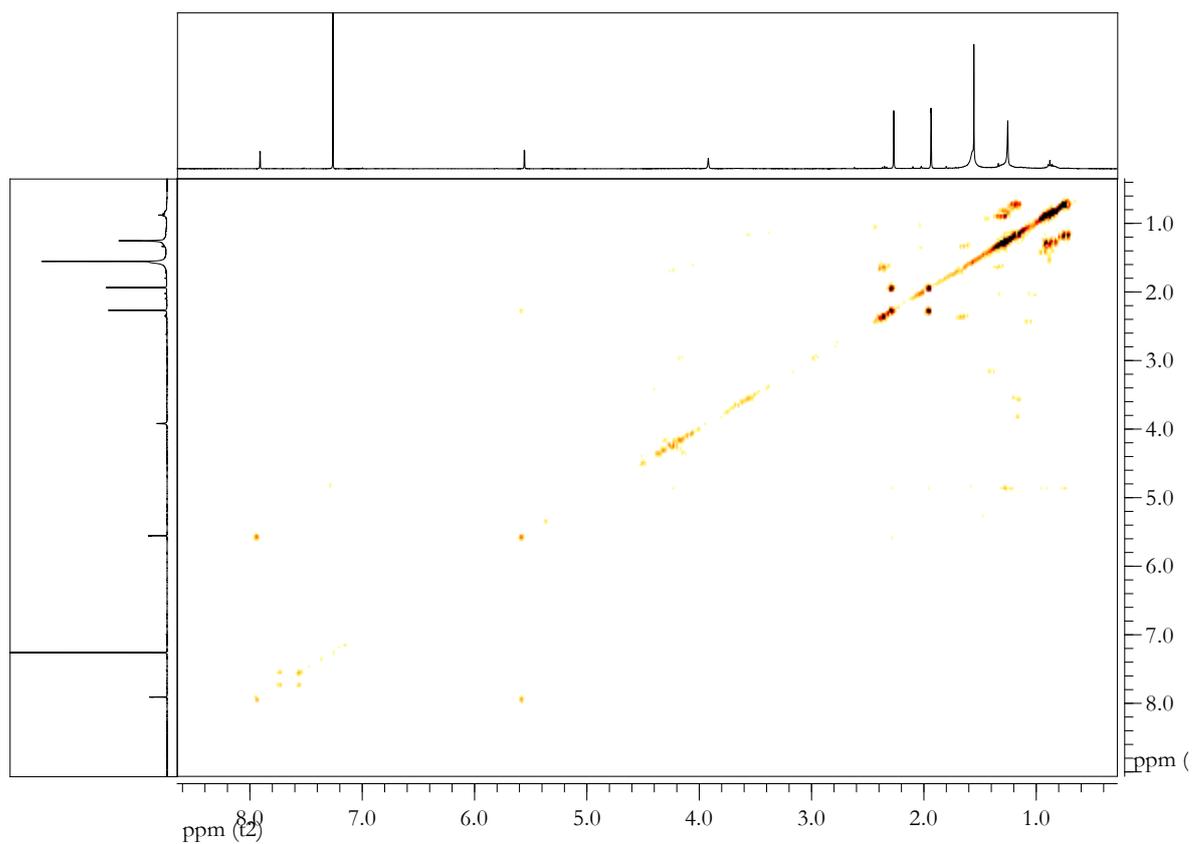


Figura 13. Analisi spettroscopica bidimensionale ^1H - ^1H COSY (*CO*rrelation *SP*ectroscop*Y*) del chlamyphilone.

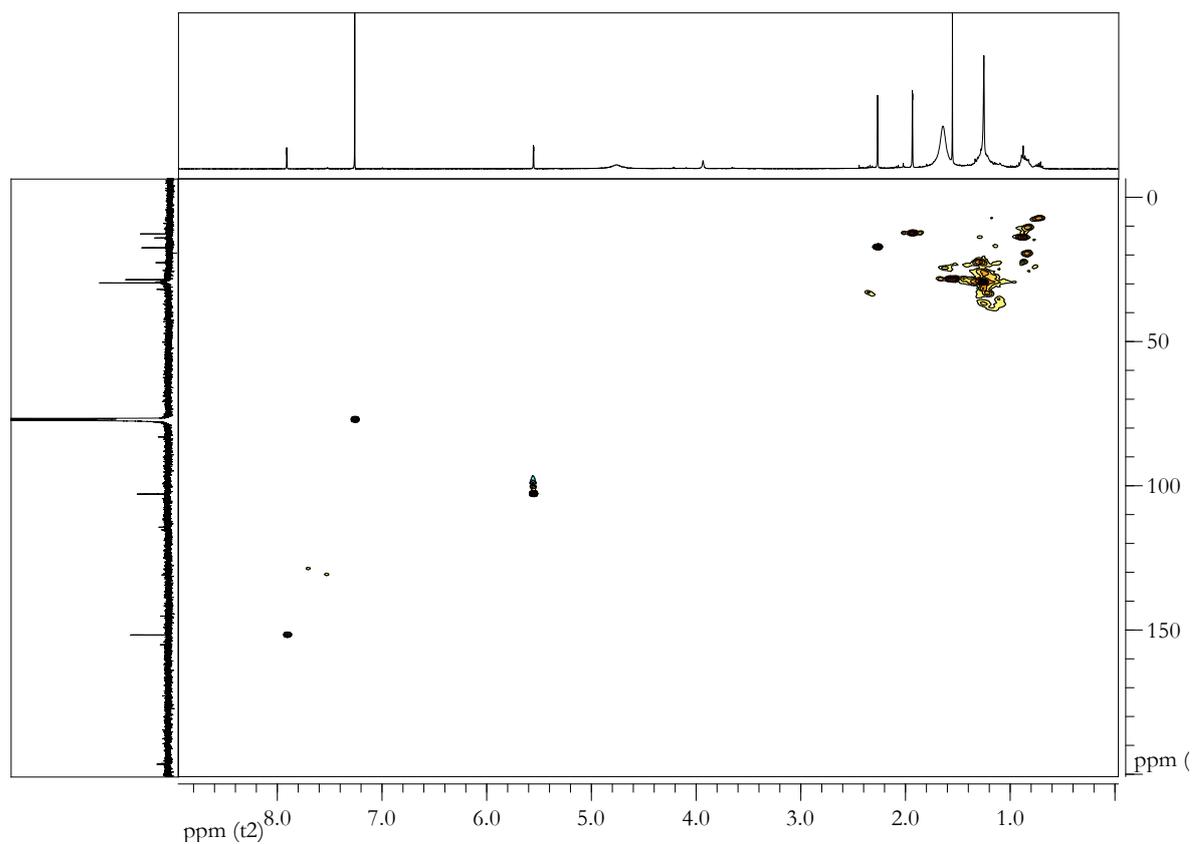


Figura 14. Analisi spettroscopica bidimensionale HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) del chlamyphilone.

L'analisi HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) ci ha permesso di dedurre la correlazione dei sistemi di spin (Fig. 15 e 16).

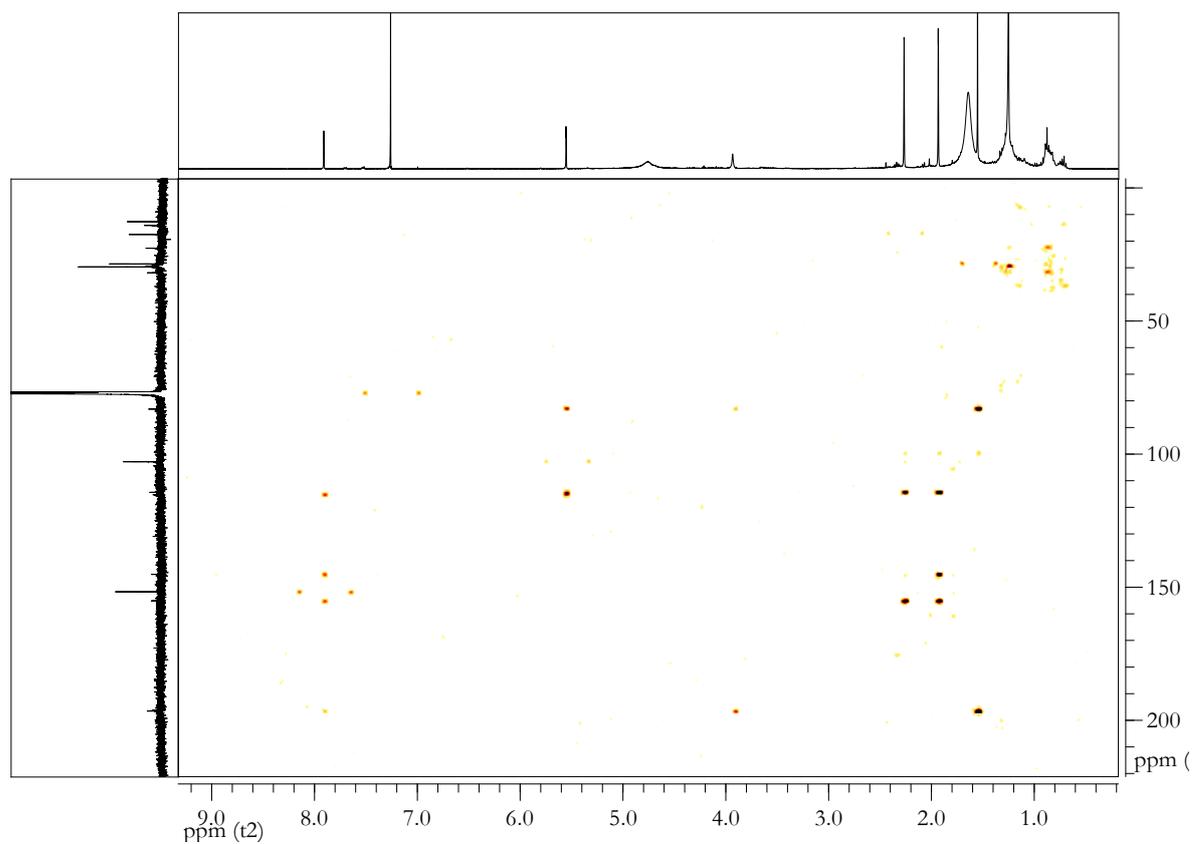


Figura 15. Analisi spettroscopica bidimensionale HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) del chlamyphilone.

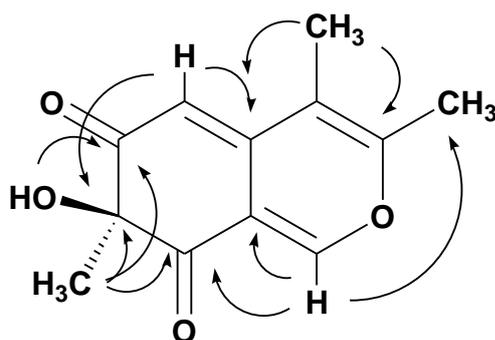


Figura 16. Correlazione dei sistemi di spin (HMBC) del chlamyphilone.

La configurazione stereochimica della molecola (Fig. 17) è stata determinata attraverso gli esperimenti di 2D NMR NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*).

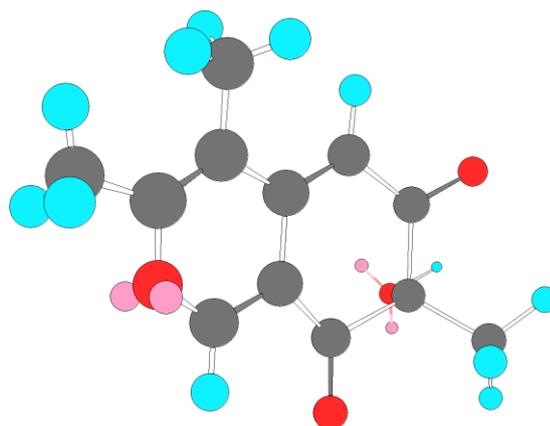


Figura 17. Modello conformazionale del chlamyphilone determinato attraverso NMR bidimensionale NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*). Azzurro = idrogeno; Rosso = ossigeno; Grigio = carbonio.

Dal ceppo selezionato di *P. chlamydosporia* sono stati purificati altri due metaboliti (denominati 4.1 A e B). Le tre molecole, il CH, la molecola 4.1A e 4.1B, risultavano le tre componenti principali dell'estratto. Il metabolita A aveva polarità molto vicina al chlamyphilone, ed entrambe le molecole, A e B avevano massa di 224 g/mol (Fig. 18) e formula bruta $C_{12}H_{16}O_4$. Le due molecole hanno lo stesso nome IUPAC ma differente stereochimica. L'analisi NMR delle due molecole ci ha mostrato la struttura delle 2 molecole ed una conseguente denominazione IUPAC 7,8-Dihydroxy-3,4,7-trimethyl-1,7,8,8a-tetrahydroisochromen-6-one (Fig. 19).

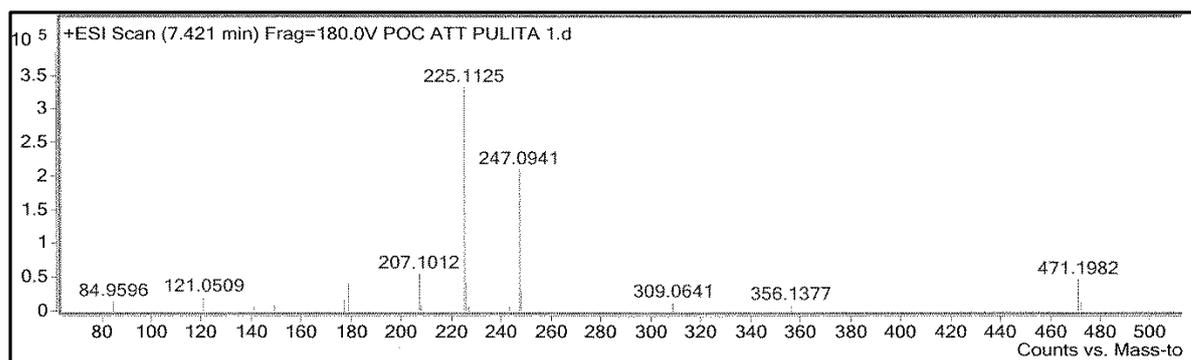


Figura 18. Spettro di massa dei metaboliti 4.1 A e B; m/z 225.1125 = $[M+H]^+$; m/z 247.0941 = $[M+Na]^+$; m/z 207.1012 = $[M+H-H_2O]^+$; m/z 471.1982 = $[M_2+Na]^+$.

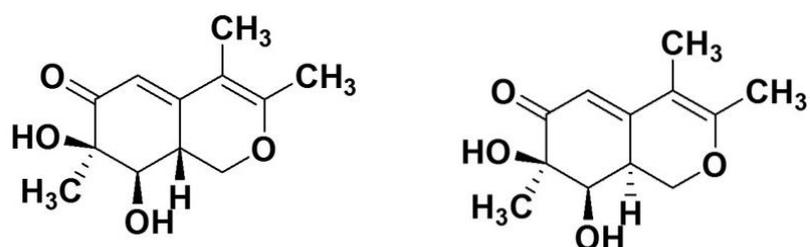


Figura 19. Metabolita A (sinistra) e metabolita B (destra) purificati dall'estratto grezzo della specie *P. chlamydosporia*.

Il metabolita denominato 4.1 A presenta gli stessi dati spettroscopici riportati in letteratura per il myxostiolo, un regolatore della crescita vegetale, molecola già nota in letteratura anche per la specie *P. chlamydosporia* (Hilarìo 2016; Kimura *et al.*, 2002). Il composto denominato 4.1 B è il rispettivo stereoisomero.

Per confermare la struttura del CH è stato realizzato un derivato acetilato impiegando anidride acetica (Fig. 20).

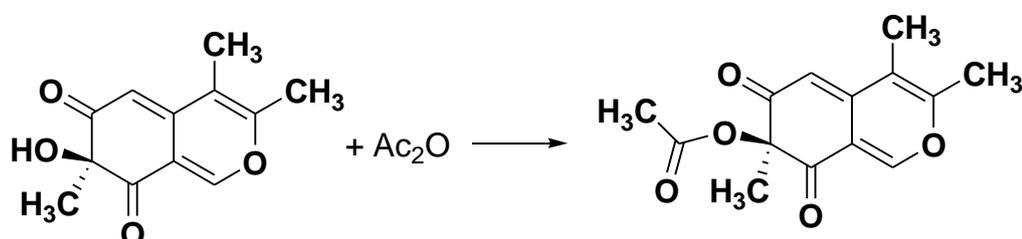


Figura 20. Acetilazione del chlamyphilone (CH). Sintesi ottenuta con anidride acetica in rapporto 40 μ l/2,5 mg di CH.

La nuova molecola di *P. chlamydosporia* acetilata è stata ottenuta con anidride acetica a temperatura ambiente ed è stata purificata con PLC (2 mm-Merck) utilizzando quale sistema eluente etere di petrolio/acetone 2:8 (v/v). L'acetilazione ha avuto una resa dell'85%. Il prodotto di reazione purificato è stato caratterizzato tramite LC-MS q-TOF e NMR.

In figura 21 è riportato lo spettro di massa del derivato acetilato, che ha confermato la acetilazione della molecola.

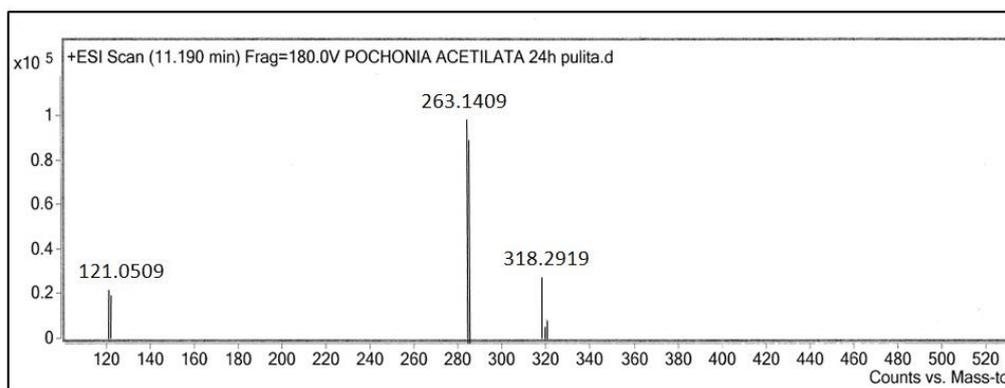


Figura 21. Spettro di massa del chlamyphilone acetilato, m/z 262.1409 = $[M+CH_3CO+H]^+$.

I dati 1H -NMR del derivato (acido acetico, 3,4,7-trimetil-6,8-dioxa-7,8-dihidro-6H-isocromene-7-yl estere) contengono i segnali relativi all'acetato, che conferma la presenza del legame idrossile al carbonio a 83.1 ppm. Lo spettro ^{13}C -NMR contiene un segnale aggiuntivo per la risonanza dell'acetile a 170.8 e del carbonio metilico dell'acetile a 18.4 ppm (dati non mostrati).

L'attività insetticida del ceppo di *Beauveria bassiana* è risultata dipendente dalla presenza di elevate concentrazioni di beauvericina (Fig. 25). In figura 22 è rappresentato lo spettro di massa della frazione 3 dell'estratto contenente beauvericina con i rispettivi addotti. Questo metabolita, un depsipeptide dotato di attività antibiotica ed insetticida (Daniel *et al.*, 2017), ha formula molecolare $C_{45}H_{57}N_3O_9$ e massa di 783,963 g/mol; nome IUPAC = (3S,6R,9S,12R,15S,18R)-3,9,15-tribenzyl-4,10,16-trimethyl-6,12,18-tri(propan-2-yl)-1,7,13-trioxa-4,10,16-triazacyclooctadecane-2,5,8,11,14,17-hexone; (RT = 7,278 min e spettro UV-VIS con massimo di assorbimento a 205 nm).

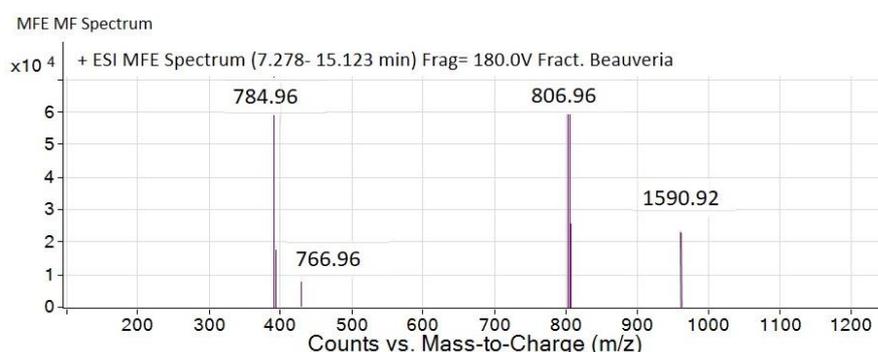


Figura 22. Spettro di massa della frazione 3 di *B. bassiana*; Beauvericina; m/z 784,96 = $[M+H]^+$; m/z 766,96 = $[M+H-H_2O]^+$; m/z 806,96 = $[M+Na]^+$; m/z 1590,92 = $[M_2+Na]^+$.

Dalle analisi effettuate sulla frazione 4 di *M. anisopliae* si evidenziava che l'attività insetticida era attribuibile alla presenza di una miscela di destruttine, ciclodepsipetidi già noti in letteratura (Soledade *et al.*, 2002). La frazione purificata era composta, prevalentemente, da Destruttina B2 (Fig. 25) di formula bruta $C_{29}H_{49}N_5O_7$ e massa di 578 g/mol; nome IUPAC = 10,11,14-trimethyl-3-(2-methylpropyl)-13,16-di(propan-2-yl)-4-oxa-1,8,11,14,17-pentazabicyclo[17.3.0]docosane-2,5,9,12,15,18-hexone; RT = 9,961-10,066 min; UV-VIS 210 nm. In Fig. 23 è riportato lo spettro di massa della Destruttina B2 contenuta nella frazione 4.

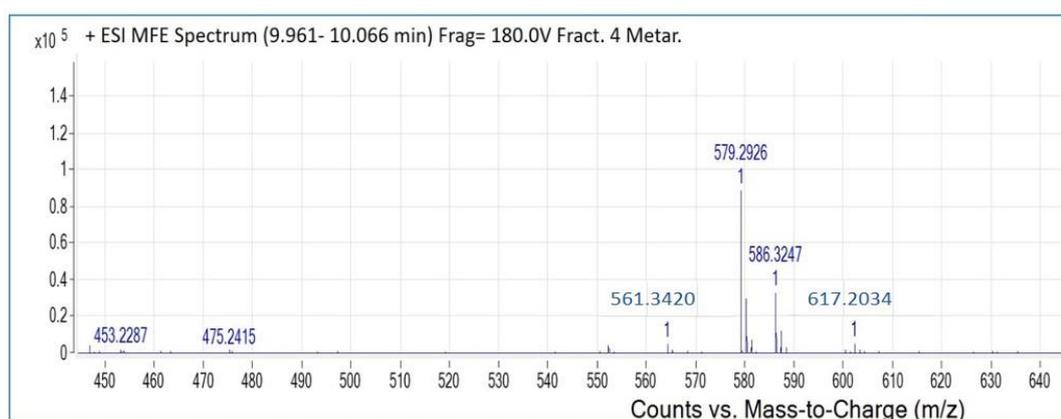


Figura 23. Spettro di massa per Destruttina B2; m/z 579,2926 = $[M+H]^+$; m/z 561,3420 = $[M+H-H_2O]^+$; m/z 617,2034 = $[M+K]^+$.

La frazione attiva del ceppo F36CF di *T. pinophilus* è risultata essere costituita dal 3-O-metilfunicone (Fig. 25), un derivato metilato del funicone, una molecola riportata in letteratura per le sue proprietà antibiotiche (De Stefano *et al.*, 1999), ma non nota per il potenziale insetticida. La sua formula molecolare è $C_{20}H_{20}O_8$ e la massa 388,1236 g/mol, come è mostrato in Figura 24 dall'analisi LC-MS q-TOF; IUPAC = (E)-3-methoxy-2-propenyl-5-(2'-carbomethoxy-4',6'-dimethoxybenzoyl)-4-pyrone; (RT = 6,152-6,732 min; UV-VIS 249, 293 nm).

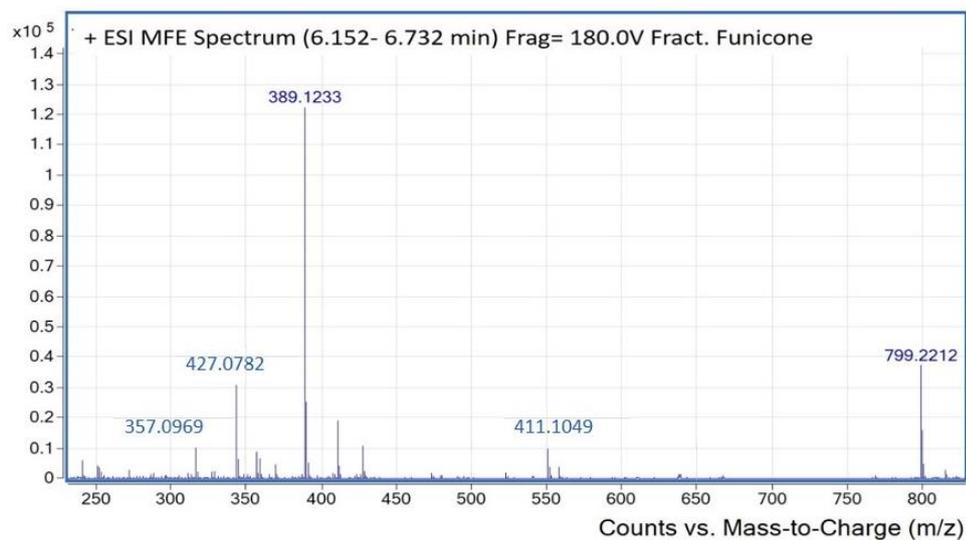


Figura 24. Spettro di massa del 3-O-metilfunicone; m/z 389,1233 = $[M+H]^+$; m/z 799,2212 = $[M_2+Na]^+$; m/z 427,0782 = $[M+K]^+$; m/z 411,1049 = $[M+Na]^+$; m/z 357,0969 = $[M-CO]^+$.

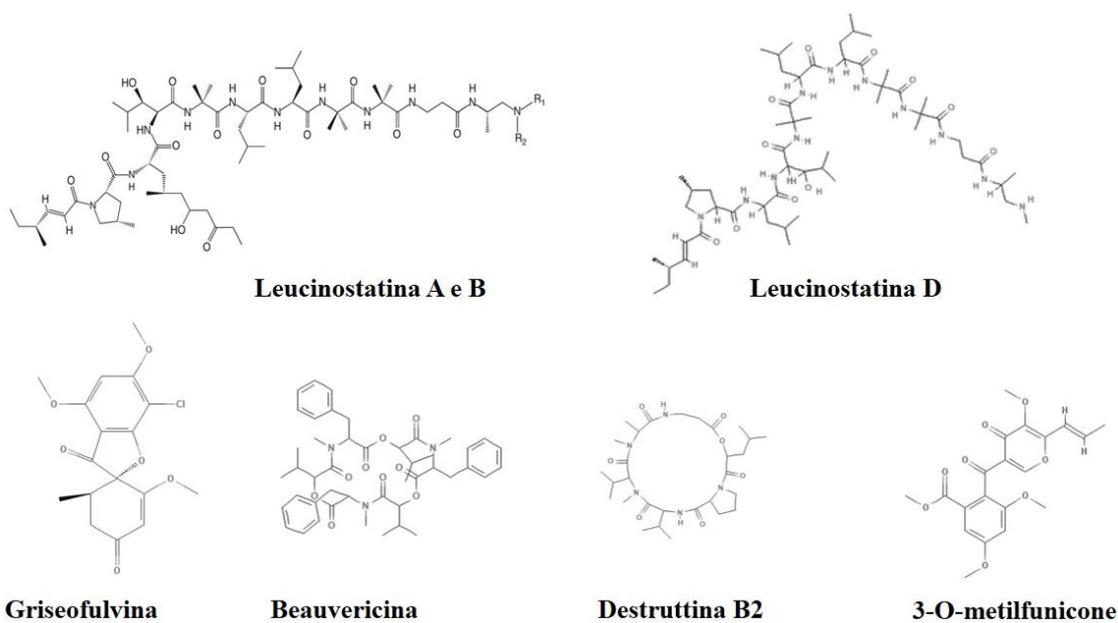


Figura 25. Struttura delle molecole già note in letteratura e dotate di attività insetticida su *A. pisum*.

4.4 Attività insetticida di metaboliti puri e miscele isolate da ceppi microbici benefici

Ogni metabolita purificato è stato testato nuovamente su *A. pisum* per confermare l'attività insetticida. In tabella 10 viene mostrata l'attività ottenuta per ogni frazione alla concentrazione di 0,5 mg/mL.

Tabella 10: Attività insetticida (a 24, 48 e 72 h) delle frazioni purificate per ogni specie fungina il cui estratto grezzo risultava attivo. Valori corretti con la formula di Abbott (%) (Abbott, 1925). Deviazione standard in parentesi tonda. Analisi statistica (*one-way*) ANOVA con test *post hoc* LSD. Le lettere indicano la differenza tra lo stesso trattamento in tempi diversi.

Specie	Frazione	Attività insetticida 0,5 mg/mL (Abbott %)		
		24 h	48 h	72 h
<i>P. lilacinus</i>	3	21,7 ^a (±7,6)	25,0 ^a (± 15)	30,0 ^a (±18,02)
<i>P. griseofulvum</i>	7	65,0 ^a (± 10)	73,3 ^a (± 7,63)	73,3 ^a (± 7,63)
<i>P. chlamydosporia</i>	4.1	95,0 ^a (± 0)	100,0 ^a (± 0)	100,0 ^a (± 0)
<i>B. bassiana</i>	3	6,7 ^a (± 5,77)	41,7 ^b (± 30,13)	40,0 ^b (± 22,91)
<i>M. anisopliae</i>	4	20,1 ^a (± 10)	33,3 ^a (± 15,27)	47,3 ^b (± 11,52)
<i>T. pinophilus</i>	2	13,9 ^a (± 11,78)	11,3 ^a (± 7,62)	26,2 ^a (± 9,80)

La frazione 4.1 di *P. chlamydosporia*, costituita da chlamyphilone puro, è stata utilizzata per valutare la attività a diverse concentrazioni al fine di rilevare il valore di LC₅₀ e la dose minima attiva (Tabella 11). Siccome questo metabolita era dotato di una attività insetticida particolarmente elevata sono state condotte ulteriori indagini sulle potenzialità della molecola. Ciò ha reso necessario un approfondimento della ricerca e nuovi test di attività insetticida impiegando il chlamyphilone anche a concentrazioni più basse (Tabella 11).

Tabella 11: Attività insetticida della frazione 4.1 (chlamyphilone) a diverse concentrazioni (72 h dopo il trattamento) purificata dall'estratto organico del filtrato colturale di *Pochonia chlamydosporia*. Valori corretti con la formula di Abbott (%) (Abbott, 1925).

Concentrazioni testate (mg/mL)	Attività insetticida a 72 h (%)
0,40	30
0,30	30,23
0,20	100
0,19	96,66
0,18	51,66
0,17	30,00
0,16	8,30
0,15	3,33

Il chlamyphilone ha mostrato un valore di LC₅₀ pari a 0,18 mg/mL, mentre la dose minima attiva era di 0,15 mg/mL (Tabella 11).

Questa molecola aveva attività insetticida pari al 100% di mortalità a 0,5 mg/mL già 48 h dopo il trattamento (Tabella 10) (valori corretti con la formula di Abbott). Di seguito sono riportati i valori di attività della molecola pura di *P. chlamydosporia* nel tempo (Fig. 26 e 27).

Attività insetticida della frazione 4.1 di *P. chlamydosporia* su *A. pisum* (0,5; 0,4 mg/ml)

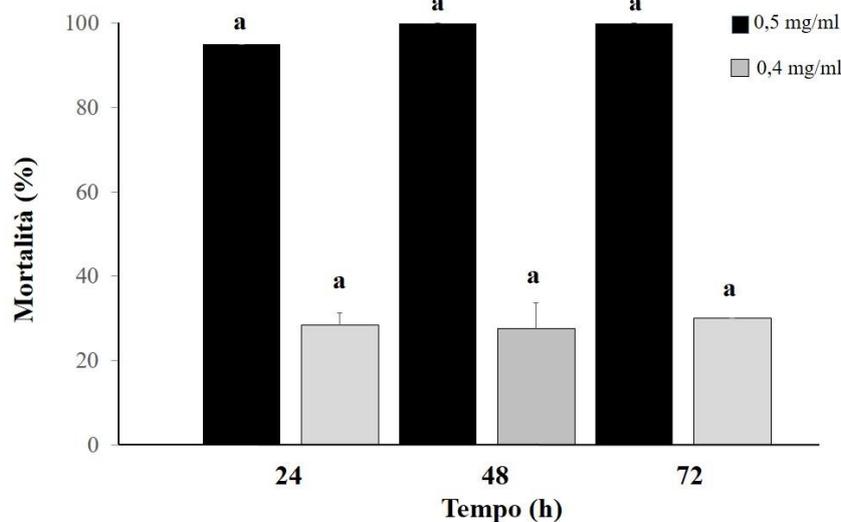
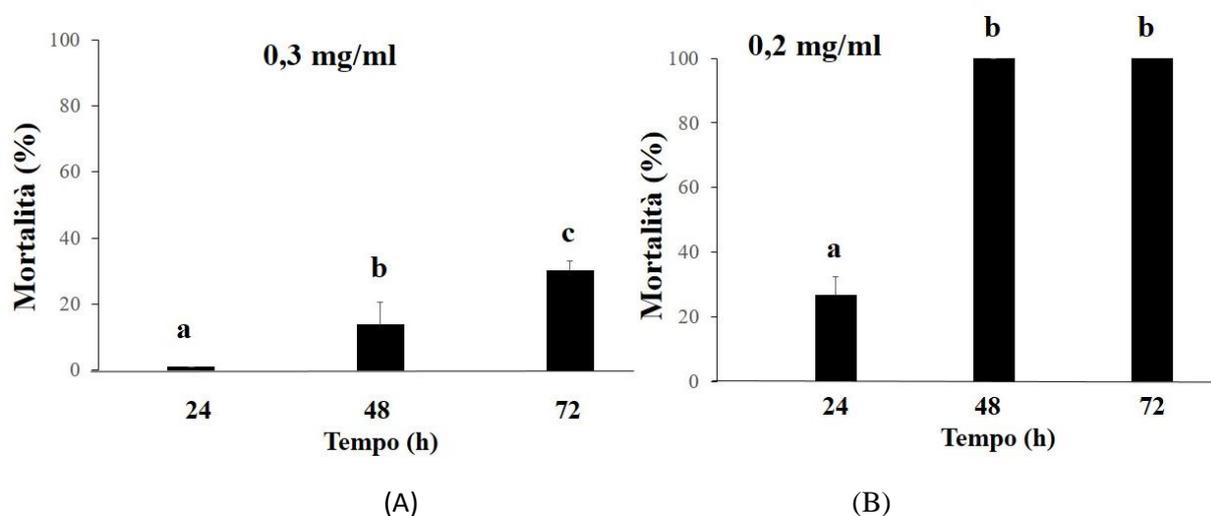
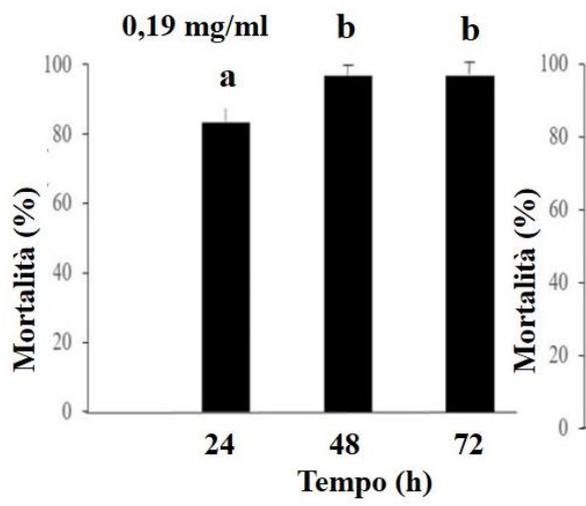


Figura 26. Attività insetticida del metabolita puro chlamyphilone (frazione 4.1) di *P. chlamydosporia* nel tempo su afidi a 0,5 mg/ml e 0,4 mg/ml. Le lettere indicano il confronto del trattamento in tempi diversi. Valori corretti con la formula di Abbott (%) (Abbott, 1925). Analisi statistica (*one-way*) ANOVA ($p < 0,05$) con test *post hoc* LSD.

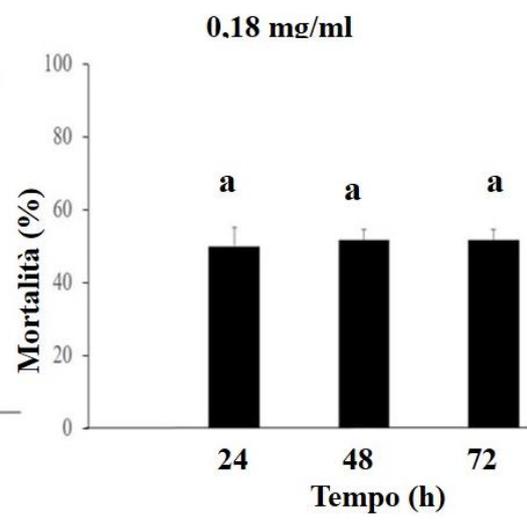
Alle concentrazioni di 0,4, 0,3, 0,2, 0,19, 0,18, 0,17, 0,16, 0,15 mg/mL la frazione 4.1 ha mostrato un'attività insetticida (% mortalità) rispettivamente di: 30; 30,23; 100; 96,66; 51,66; 30; 8,30; 3,33 % a 72 ore dal trattamento (Fig. 26 e 27).

Attività insetticida della frazione 4.1 di *P. chlamydosporia* su *A. pisum* (0,3; 0,2; 0,19; 0,18; 0,17; 0,16; 0,15 mg/ml)

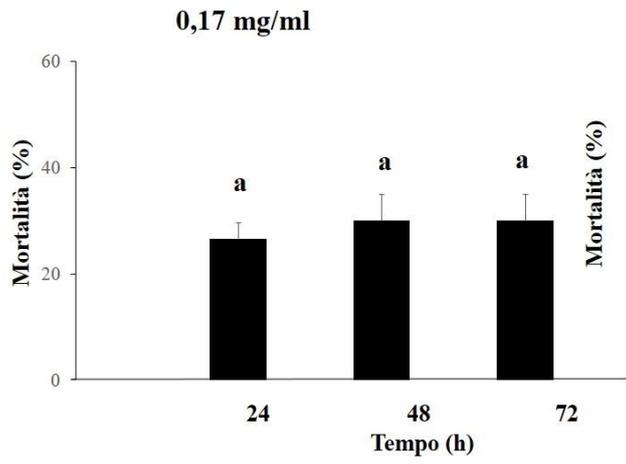




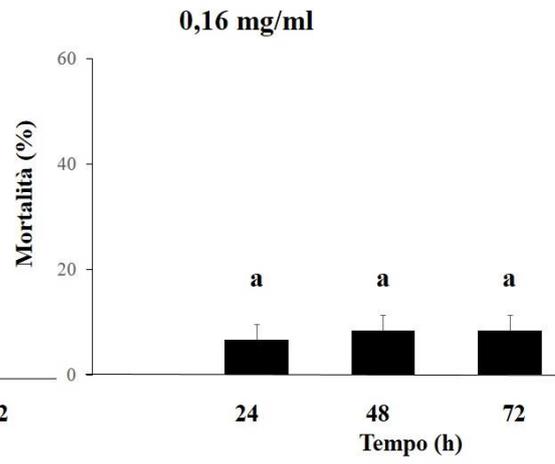
(C)



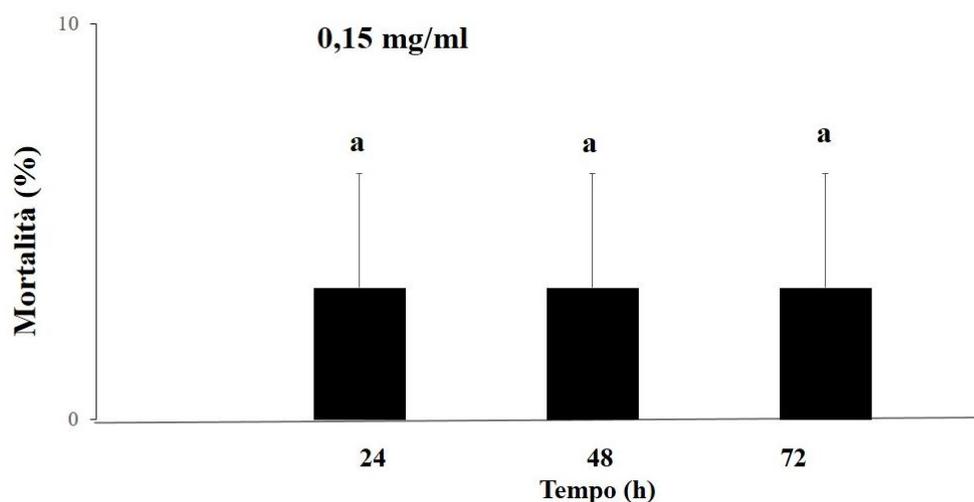
(D)



(E)



(F)



(G)

Figura 27. Attività insetticida del metabolita puro chlamyphilone (frazione 4.1) di *P. chlamydosporia* nel tempo su afidi a diverse concentrazioni: (A) 0,3 mg/mL; (B) 0,2 mg/mL; (C) 0,19 mg/mL; (D) 0,18 mg/mL; (E) 0,17 mg/mL, (F) 0,16 mg/mL; (G) 0,15 mg/mL. Le lettere indicano il confronto in tempi diversi per lo stesso trattamento. Valori corretti con la formula di Abbott (%) (Abbott, 1925).

Analisi statistica (*one-way*) ANOVA ($p < 0,05$) con test *post hoc* LSD.

Per le specie *P. lilacinus*, *P. griseofulvum*, *P. chlamydosporia*, *M. anisopliae*, il frazionamento ha prodotto un aumento in percentuale dell'attività insetticida a 72 h dal trattamento, cosa che non è accaduta per *B. bassiana* e *T. pinophilus* (Tabella 12).

Tabella 12: Attività insetticida a 72 h dell'estratto organico grezzo e delle rispettive frazioni purificate da ogni specie. Valori corretti con la formula di Abbott (%) (Abbott, 1925). Deviazione standard in parentesi tonda. Le lettere indicano differenze tra trattamenti diversi allo stesso tempo.

Specie	Attività estratto grezzo (10 mg/ml) a 72 h (%)	Attività frazione (0,5 mg/ml) a 72 h (%)
<i>P. lilacinus</i>	3,3 ^a (±5,7)	30 ^a (±18,0)
<i>P. griseofulvum</i>	40 ^b (±40)	73,3 ^b (± 7,6)
<i>P. chlamydosporia</i>	47 ^b (±13)	100 ^c (± 0)
<i>B. bassiana</i>	40 ^b (±23)	40 ^a (± 22,9)
<i>M. anisopliae</i>	40 ^b (±5,7)	48,1 ^a (± 11,5)
<i>T. pinophilus</i>	35,7 ^b (±5,7)	26,2 ^a (± 9,8)

Nessun metabolita testato alla concentrazione impiegata per il saggio di attività insetticida ha mostrato effetti fitotossici su *V. faba* var. aguadulce (dati non mostrati).

4.5 Attività dei derivati acetilati

La derivatizzazione di sostanze naturali sconosciute, oltre a dare supporto e conferma alla ipotesi strutturale della molecola isolata, consente di avere utili informazioni per lo studio dei gruppi funzionali biologicamente attivi presenti nel composto.

Il saggio nei confronti degli afidi del CH acetilato, effettuato anche ad una concentrazione di 1 mg/mL (concentrazione maggiore di tutte quelle usate nei precedenti saggi) non ha mostrato alcuna attività insetticida significativa (Fig. 28).

Attività insetticida del CH (chlamyphilone) acetilato su *A. pisum* (1 mg/ml)

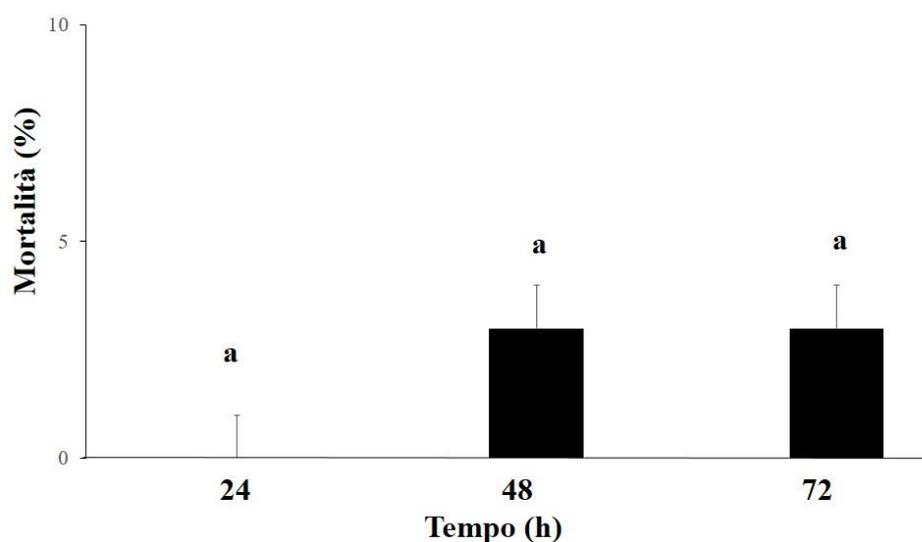


Figura 28. Attività insetticida del chlamyphilone acetilato (1 mg/mL) nel tempo. Valori corretti con la formula di Abbott (%) (Abbott, 1925). Analisi statistica (*one-way*) ANOVA ($p < 0,05$) con test *post hoc* LSD. Le lettere indicano il confronto in tempi diversi per lo stesso trattamento.

5 Produzione di metaboliti in co-coltura

La scelta dei ceppi fungini per la realizzazione delle co-culture è stata dettata principalmente dall'elevata potenzialità delle specie in questione di produrre metaboliti secondari appartenenti a classi chimiche diverse e dotati di proprietà potenzialmente utili.

5.1 Analisi LC-MS q-TOF

L'analisi metabolomica delle co-culture di *P. chlamydosporia* + *P. lilacinus* e *P. chlamydosporia* + *B. bassiana* non è risultata differente rispetto alle colture dei singoli ceppi. L'analisi LC-MS q-TOF della co-cultura di *T. harzianum* M10 + *T. pinophilus* F36CF ha mostrato delle significative differenze nel metabolismo rispetto ai singoli ceppi. L'analisi delle componenti principali (*principal component analysis* - PCA) ha rivelato la presenza di tre *clusters*, rappresentanti i metaboliti dei due ceppi singoli (controllo) e il metaboloma della co-cultura (dati non mostrati).

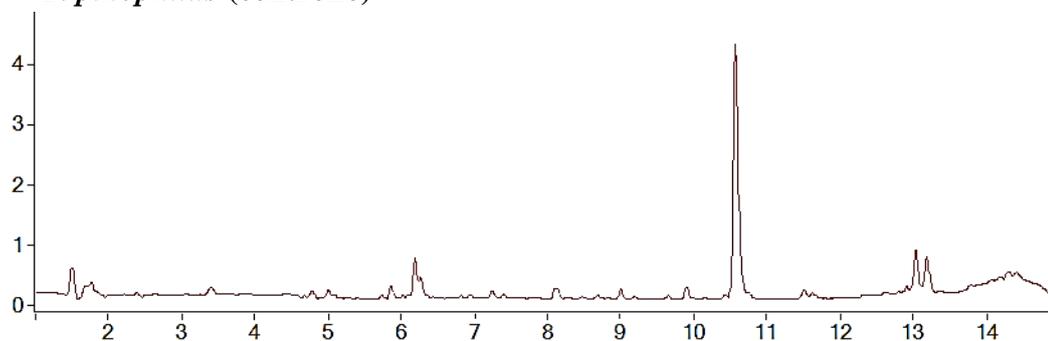
I metaboliti secondari prodotti durante l'interazione tra le due specie fungine appartenevano a diverse classi di prodotti naturali, inclusi pironi, acidi tetramici e molecole contenenti azoto.

La componente metabolica principale prodotta da *T. pinophilus* in coltura singola era costituita dal 3-O-methylfunicone (OMF) e dalla herqulina B (Enomoto *et al.*, 1996). Entrambi i composti erano presenti a concentrazioni minori rispetto alle colture singole in presenza di *T. harzianum* M10 (Tabella 13). Entrambi i metaboliti secondari, OMF ed herqulina B, sono stati probabilmente degradati da *T. harzianum*, che è in grado di produrre numerosi enzimi litici. La ferrirubina è un sideroforo che è stato *up* regolato in co-coltura. Anche i siderofori ferricrocina, coprogeno B e acido dimerumico sono stati tutti *up* regolati nel ceppo M10 durante l'interazione in co-coltura

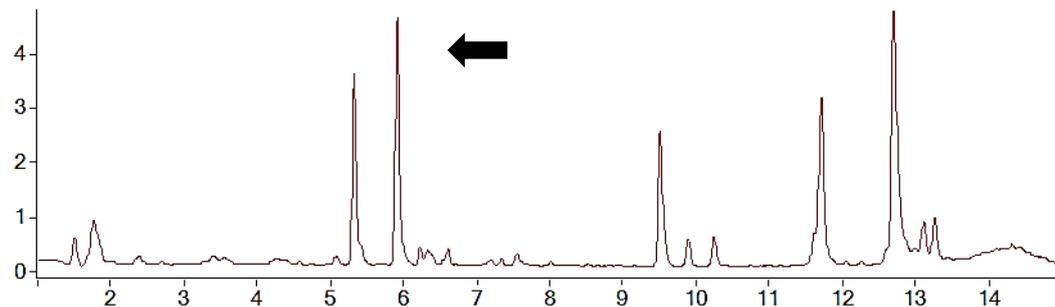
L'acido harzianico (HA) prodotto da *T. harzianum* M10, è stato rilevato sia in coltura singola sia combinata. La sua produzione non è stata influenzata dalla presenza del fungo competitore ed un risultato simile è stato ottenuto con il suo stereoisomero, l'acido iso-harzianico. Tra i metaboliti di *Trichoderma* indotti dalla presenza di F36CF è stato identificato un omologo della trichoharzianina, un polichetide precedentemente purificato da un ceppo di *T. harzianum* isolato da una spugna marina, la specie *M. cecilia* (Newman e Cragg, 2010) (Tabella 13). Questo composto aveva un rapporto m/z pari a 473,2507 [M+Na]⁺ e formula bruta C₂₅H₃₈NaO₇.

Il cromatogramma risultante dall'analisi LC-MS q-TOF della co-coltura tra M10 e F36CF (Figura 29) ha fornito un segnale m/z di un picco addizionale corrispondente ad un composto che era assente nelle colture singole (controllo). Questo metabolita non aveva corrispondenze in letteratura e per questo motivo è stato purificato, impiegando il metodo descritto in tabella 3, e sottoposto ad analisi spettroscopiche LC-MS q-TOF ed NMR mono e bi-dimensionale (Fig. 30-35; Tabella 14).

(A) *T. pinophilus* (controllo)



(B) Co-coltura



(C) *T. harzianum* (controllo)

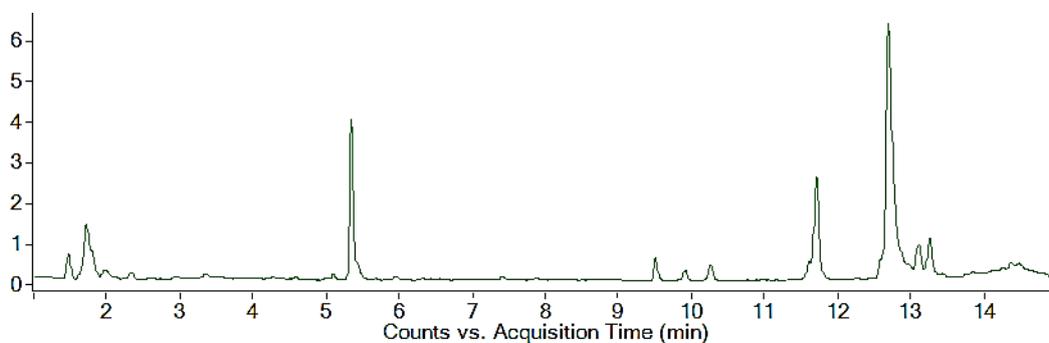


Figura 29. Cromatogramma TIC (*Total Ion Chromatogram*) in positivo (m/z 100-1700 uma) dei filtrati culturali di: **(A)** *T. pinophilus*; **(B)** co-coltura; **(C)** *T. harzianum*. La freccia nera indica il nuovo composto specificamente indotto nelle co-culture.

MFE MF Spectrum

+ ESI MFE Spectrum (5.0- 5.9 min) Frag= 180.0V Fract. Co-culture M10+F36CF

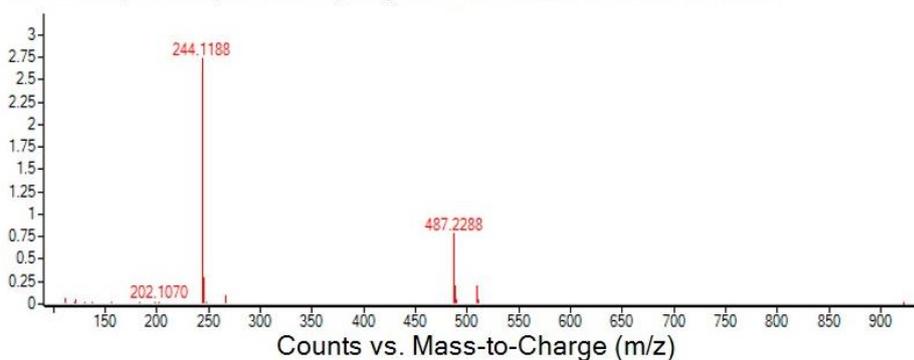


Figura 30. Spettro di massa dell'acido harziafilico di m/z 244,1188 = $[M+H]^+$; m/z 487.2288 = $[2M+H]^+$.

Tabella 13: metaboliti secondari identificati nella co-coltura *T. pinophilus* + *T. harzianum* attraverso analisi by LC-MS qTOF. L'identificazione è stata confermata confrontando i risultati con un *data base* che includeva più di 4000 metaboliti secondari fungini. Per ogni molecola è stato considerato un *matching score* $\geq 95\%$

	Composto	Formula bruta	Massa esatta	<i>m/z</i>	RT (min)	Presenzain co-coltura*
1	3-O-Metilfunicone	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	388.1158	389.1231 [M+H] ⁺ 411.1049 [M+Na] ⁺ 427.0786 [M+K] ⁺ 799.2205 [2M+Na] ⁺	10.5	↓
2	Herqulina B	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₂	314.1994	315.2066 [M+H] ⁺	8.2	↓
3	Ferrirubina	C ₄₁ H ₆₇ N ₉ O ₁₇	957.4655	958.4718 [M+H] ⁺ 980.4529 [M+Na] ⁺	5.9	↑
4	Ferricrocina	C ₂₈ H ₄₇ N ₉ O ₁₃	717.3293	718.3365 [M+H] ⁺ 740.3178 [M+Na] ⁺	5.1	↑
5	Coprogeno B	C ₃₃ H ₅₄ N ₆ O ₁₂	726.3804	727.3881 [M+H] ⁺ 749.3683 [M+Na] ⁺ 1453.7672 [2M+H] ⁺	5.3	↑
6	Acido dimerumico	C ₂₂ H ₃₆ N ₄ O ₈	484.2531	485.2604 [M+H] ⁺ 507.2414 [M+Na] ⁺	5.4	↑
7	Acido harzianico	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆	365.1839	366.1914 [M+H] ⁺ 388.1731 [M+Na] ⁺ 404.1475 [M+K] ⁺ 753.3575 [2M+Na] ⁺	12.7	↔
8	Acido harzianico iso-	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆	365.1839	366.1912 [M+H] ⁺ 388.1726 [M+Na] ⁺ 404.1467 [M+K] ⁺ 753.3563 [2M+Na] ⁺	11.5	↔
9	Nuovo metabolita (Acido harziafilico)	C ₁₁ H ₁₇ NO ₅	243.1108	244.1188 [M+H] ⁺ 266.0998 [M+Na] ⁺ 487.2289 [2M+H] ⁺ 509.2102 [2M+Na] ⁺	5.9	ON
10	Trichoharzianina	C ₂₅ H ₃₈ O ₇	450.2617	451.2693 [M+H] ⁺ 473.2507 [M+Na] ⁺ 489.2243 [M+K] ⁺ 923.5133 [2M+Na] ⁺	9.5	↑

* ↑: incremento di concentrazione del metabolita in co-coltura vs coltura singola
 ↓: decremento di concentrazione del metabolita in co-coltura vs coltura singola
 ↔: concentrazione invariata del metabolita in co-coltura vs coltura singola
 ON: produzione del metabolita *ex novo* in co-coltura

5.2 Analisi NMR

L'acido harziafilico appartenente alla classe chimica dei derivati dell'acido tetramico, presentava formula $C_{11}H_{17}NO_5$ ($[M+H]^+ = m/z 244.1188$) è risultato essere una molecola, mai isolata da fonte naturale o sintetizzata chimicamente. In tabella 14 sono riportati i dati NMR relativi a questa nuova molecola specificatamente indotta in co-coltura tra M10 e F36CF (Fig. 36).

Lo spettro protonico NMR del nuovo metabolita ha mostrato la presenza di 15 protoni: un singoletto metilico a δ 2.66, che suggerisce un gruppo N-metile; due doppietti metilici (δ 0.82 e 0.75) e un 1H sestetto (δ 2.03), che è parte di un gruppo isopropile come mostrato dallo spettro COSY (Fig. 31);

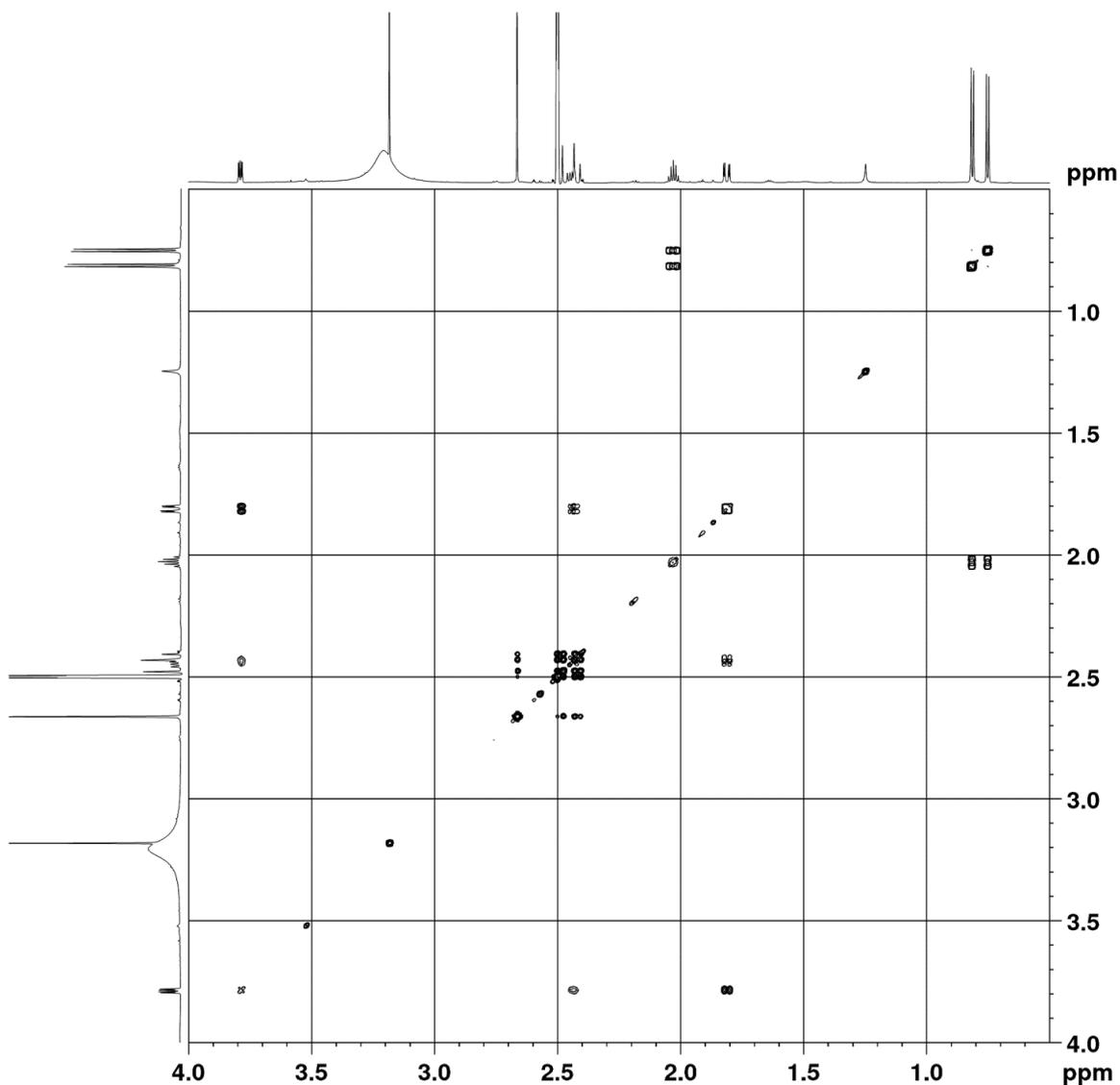


Figura 31. Spettro bidimensionale (COSY) dell'acido harziafilico in dimetilsolfossido deuterato (DMSO- d_6).

un sistema AB isolato (δ 2.49 e 2.42, $J = 17.1$ Hz); i segnali di un frammento CH-CH₂ (δ 3.79, dd, $J = 7.5$ e 3.1 Hz; δ 2.44, dd, $J = 14.0$ e 7.5 Hz; e δ 1.81, dd, $J = 14.0$ and 3.1 Hz) (Tabella 14). Questi valori suggerivano anche la presenza di due protoni scambiabili. Lo spettro ¹³C NMR mostrava la presenza di due gruppi carbonilici (δ 176.4 e 170.1) come unici atomi di carbonio sp² nella molecola (Fig. 32).

Tabella 14: Dati di Risonanza Magnetica Nucleare protonico (^1H) e carbonio 13 (^{13}C) dell'acido harziafilico (**9**) in dimetilsolfossido deuterato ($\text{DMSO-}d_6$) e metanolo deuterato d_4 (CD_3OD)

position	9 ($\text{DMSO-}d_6$) 50 °C				9-d_4 (CD_3OD)	
	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (J in Hz)	HMBC ^a	ROESY	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (J in Hz)
2	170.1 (C)	-	-	-	173.6 (C)	-
3	43.5 (CH_2)	2.49 (d, 17.1) 2.42 (d, 17.1)	2, 4, 5 2, 4	- -	44.3b	-
4	107.1 (C)	-	-	-	108.7 (C)	-
5	69.8 (CH)	3.79 (dd, 7.5, 3.1)	2, 4, 7	6a, 6b, 11	71.6 (CH)	3.98 (dd, 7.6, 3.1)
6	34.4 (CH_2)	2.44 (dd, 14.0, 7.5) 1.81 (dd, 14.0, 3.1)	12 4, 5, 7, 8, 12	5, 6b 5, 6a, 8, 9, 10, 11	35.1 (CH2)	2.68 (dd, 14.5, 7.6) 2.05 (dd, 14.5, 3.1)
7	91.2 (C)	-	-	-	93.2 (C)	-
8	33.2 (CH)	2.03 (setteetto, 6.8)	7, 9, 10, 12	6b, 9, 10	35.1 (CH)	2.12 (setteetto, 6.9)
9	17.5 (CH_3)	0.82 (d, 6.8)	7, 8, 10	6b, 8	17.8 (CH3)	0.91 (d, 6.9)
10	16.6 (CH_3)	0.75 (d, 6.8)	7, 8, 9	6b, 8	17.0 (CH3)	0.85 (d, 6.9)
11	26.7 (CH_3)	2.66 (s)	2, 5	5, 6b	27.7 (CH3)	2.81 (s)
12	176.4 (C)	-	-	-	179.5 (C)	-

Abbreviazioni: s, singoletto; d, doppietto; dd, doppietto di doppietto.

^a correlazione HMBC, ottimizzata per 8.3 Hz,

^b δ_{C} determinato per gli esperimenti HMBC

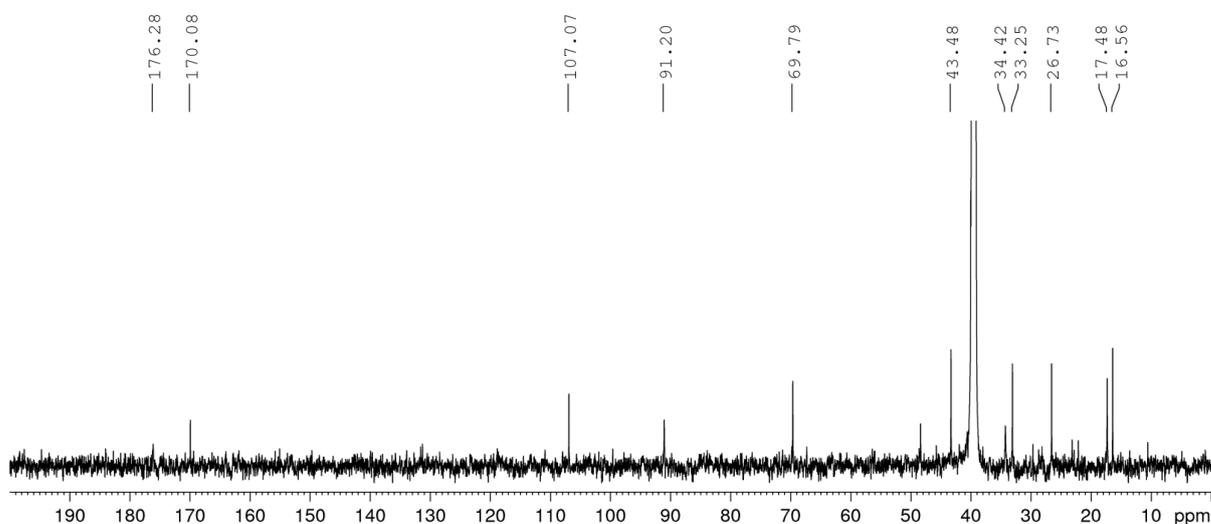


Figura 32. Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare del carbonio 13 (^{13}C) dell'acido harziafilico in dimetilsolfossido deuterato ($\text{DMSO-}d_6$).

Questo dato, insieme alle quattro insaturazioni dedotte dalla formula molecolare, indicava una struttura biciclica per l'acido harziafilico.

La connessione delle unità strutturali è stata dedotta dall'esperimento HMBC (Fig. 33 e 34). La presenza del pirrolidone è stata dimostrata dall'accoppiamento dei protoni N-metile a δ 2,66 ($\text{H}_3\text{-11}$) con l'atomo di carbonio $\text{C}=\text{O}$ a δ 170,1 (C-2) ed il carbonio del gruppo metinico a δ 69.8 (C-5), dall'accoppiamento del protone a δ 2.49 (H-3a) con lo stesso atomo di carbonio C-2 e C-5, e con un atomo di carbonio non protonato risonante a δ 107.1 (C-4).

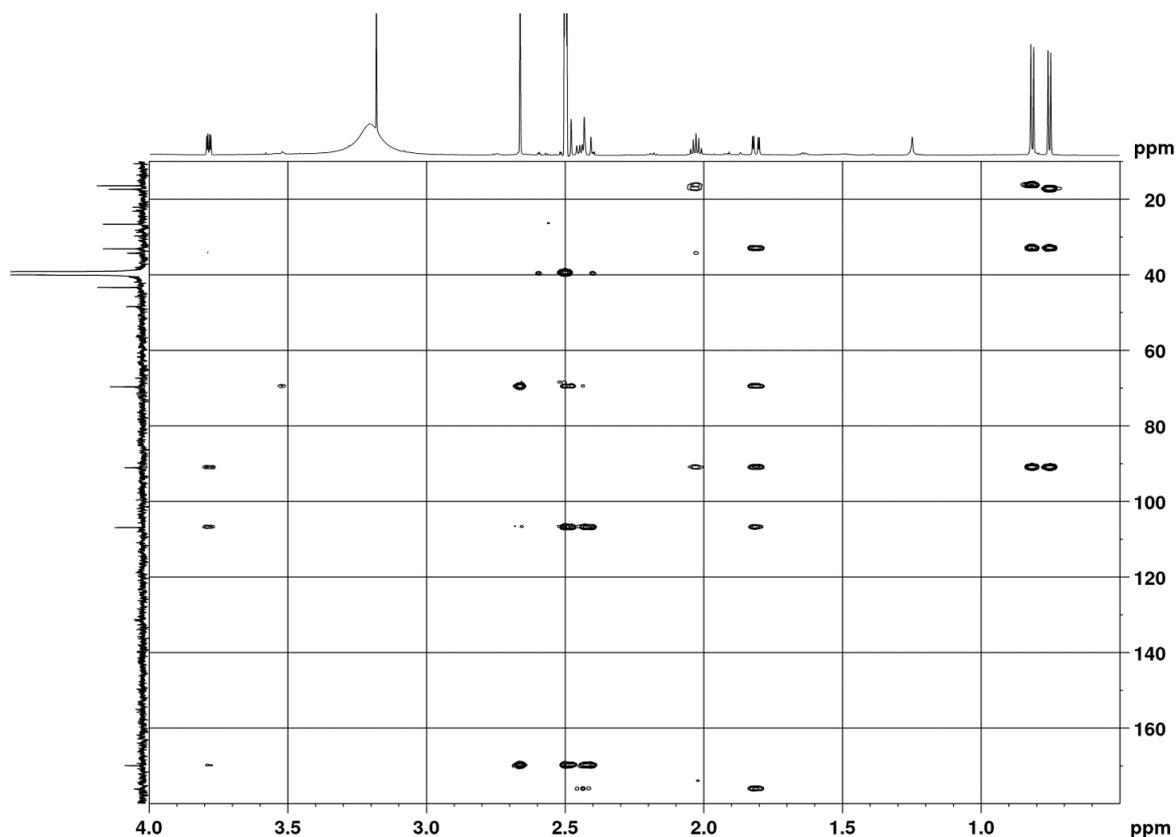


Figura 33. Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC) dell'acido harziafilico in dimetilsolfossido deuterato (DMSO- d_6).

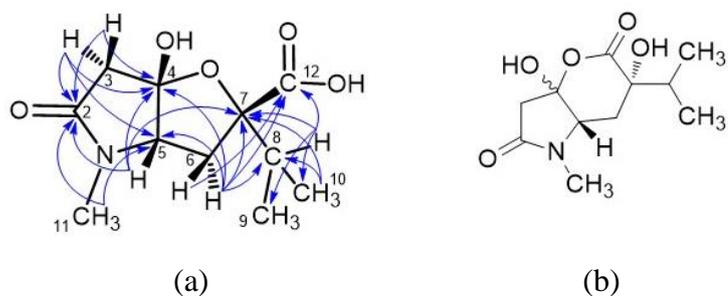


Figura 34. (a) Correlazione *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC) per l'acido harziafilico (b) struttura alternativa con il ponte di ossigeno tra C-4 e C-12.

Il *chemical shift* di quest'ultimo carbonio suggeriva un gruppo chetonico. L'accoppiamento di protoni di metile H₃-9 e H₃-10 con l'ossigeno a δ 91.2 (C-7) ha dimostrato che il gruppo isopropile era legato al C-7; l'accoppiamento del protone isopropile metinico H-8 con l'atomo di carbonio carbossilico a δ 176.4 (C-12) ha esteso la catena a questo atomo.

Infine, le correlazioni HMBC del protone metilenico a δ 1.81 (H-6b) con C-4, C-5, C-7; C-8 e C-12 hanno reso possibile l'interpretazione dello scheletro rimanente della molecola.

Siccome la formula molecolare dell'acido harziafilico richiedeva due anelli e cinque atomi di ossigeno, la struttura è stata completata con un ponte ossigeno tra C-4 e C-7 per formare un emiacetale a sei, e un gruppo carbossile libero al C-12. La determinazione della configurazione al C-7 richiedeva l'assegnazione stereospecifica preliminare di protoni al C-6, cosa possibile sulla base del forte picco di correlazione NOESY tra H-6 e H-5 che mostrava il loro rapporto in *cis* ed il picco di correlazione NOESY tra H-6 e i protoni N-metile H₃-12 (Fig. 35).

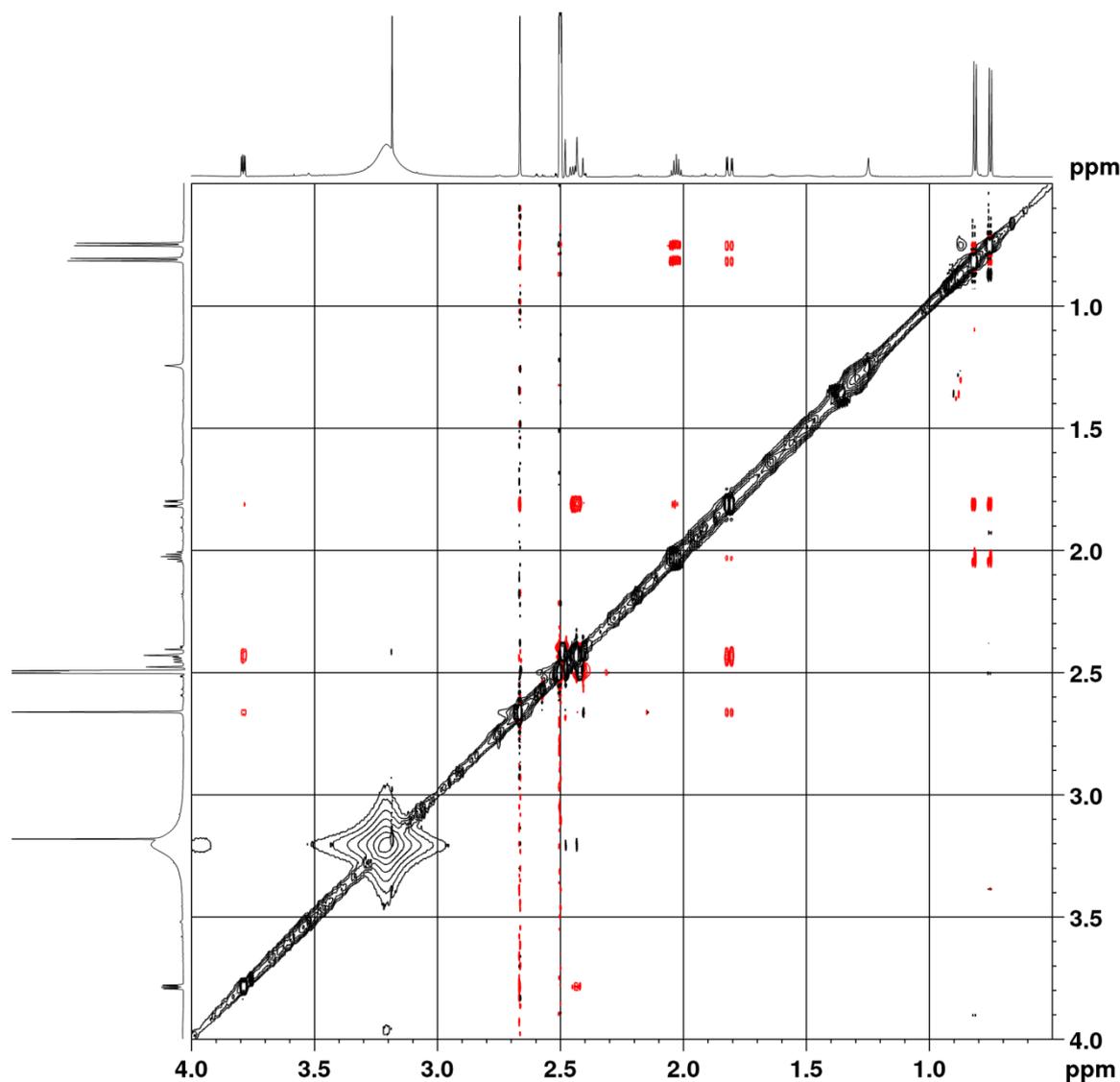


Figura 35. Spettroscopia bidimensionale (NOESY) dell'acido harziafilico in dimetilsolfossido deuterato (DMSO-*d*₆).

I picchi di correlazione del NOESY di H-6b con H-8, H₃-9 e H₃-10 hanno poi dimostrato che il gruppo isopropile era in *cis* ad H-6b e quindi, in *trans* ad H-5.

Dall'analisi NMR è stata anche dimostrata una possibile relazione biogenetica tra acido harzianico e acido harziafilico. In figura 36 è mostrata la struttura molecolare dell'acido harziafilico.

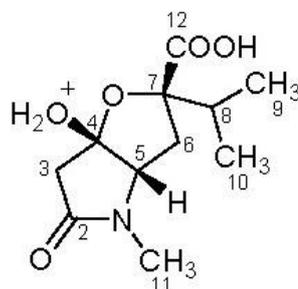


Figura 36. Struttura molecolare dell'acido harziafilico.

La quantità di acido harziafilico biosintetizzato è stata massima dopo 22 giorni di co-coltura per poi cominciare a diminuire (Figura 37). Un risultato simile è stato ottenuto anche con l'acido harzianico, mentre l'acido iso-harzianico ha raggiunto la produzione massima dopo 30 giorni (dati non mostrati).

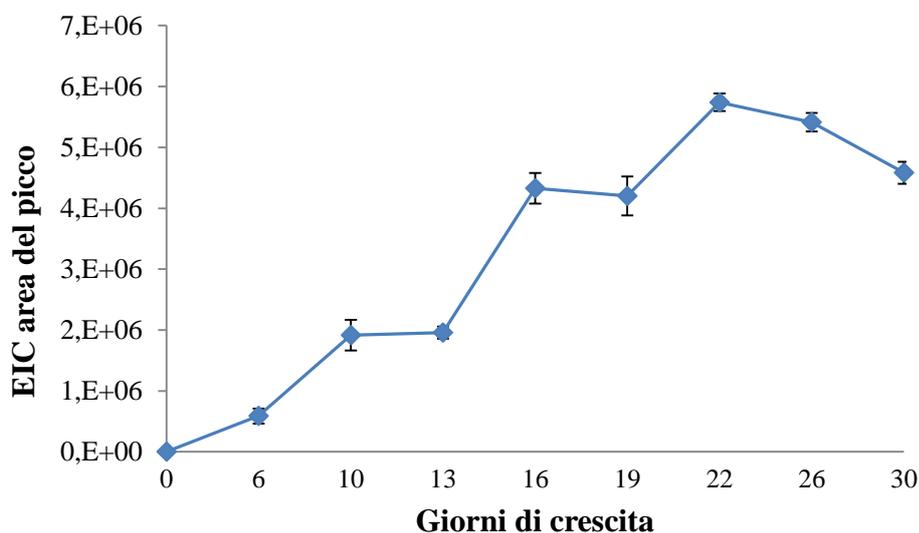


Figura 37. Andamento della produzione di acido harziafilico nel tempo durante la co-coltura *T. harzianum* (M10) – *T. pinophilus* (F36CF).

5.3 Saggio di attività insetticida dell'acido harziafilico

L'acido harziafilico è stato saggiato per valutare l'attività insetticida nei confronti di *A. pisum*. Il saggio, effettuato a varie concentrazioni (fino a 1,5 mg/mL) non ha mostrato efficacia significativa contro gli afidi (dati non mostrati).

6 Prove di produzione di metaboliti attivi in diversi substrati

Le prove di produzione in diversi substrati per incrementare la quantità di principio attivo hanno fornito ottimi risultati per la nuova molecola prodotta da *P. chlamydozporia*, il chlamyphilone. Nelle soluzioni controllo (PDB) la produzione totale di questo nuovo metabolita era di 5 mg/L dopo 30 giorni di crescita. Utilizzando il Corn Meal Broth la produzione totale era di 16 mg/L a 30 giorni di crescita. In questo caso è stato possibile triplicare il quantitativo totale del metabolita per litro di soluzione utilizzando un mezzo di coltura più specifico per la produzione di chlamydozspore, il Corn Meal Broth. Inoltre, l'impiego di questo substrato ha ridotto la quantità del metabolita secondario identificato come myxostiololo, di massa pari a 224 g/mol e polarità molto vicina al chlamyphilone. E' probabile che in queste condizioni di crescita il fungo trasformi più velocemente il myxostiololo, probabile precursore biosintetico, in chlamyphilone. L'analisi LC-MS q-TOF per valutare la produzione di chlamyphilone in diversi altri substrati (V8 = estratto vegetale; Yeast Mannitol Broth = estratto di lievito con aggiunta di mannitolo; Potato Dextrose Broth + Yeast 5g/L) non ha rilevato variazioni significative nella produzione del metabolita (Fig. 38).

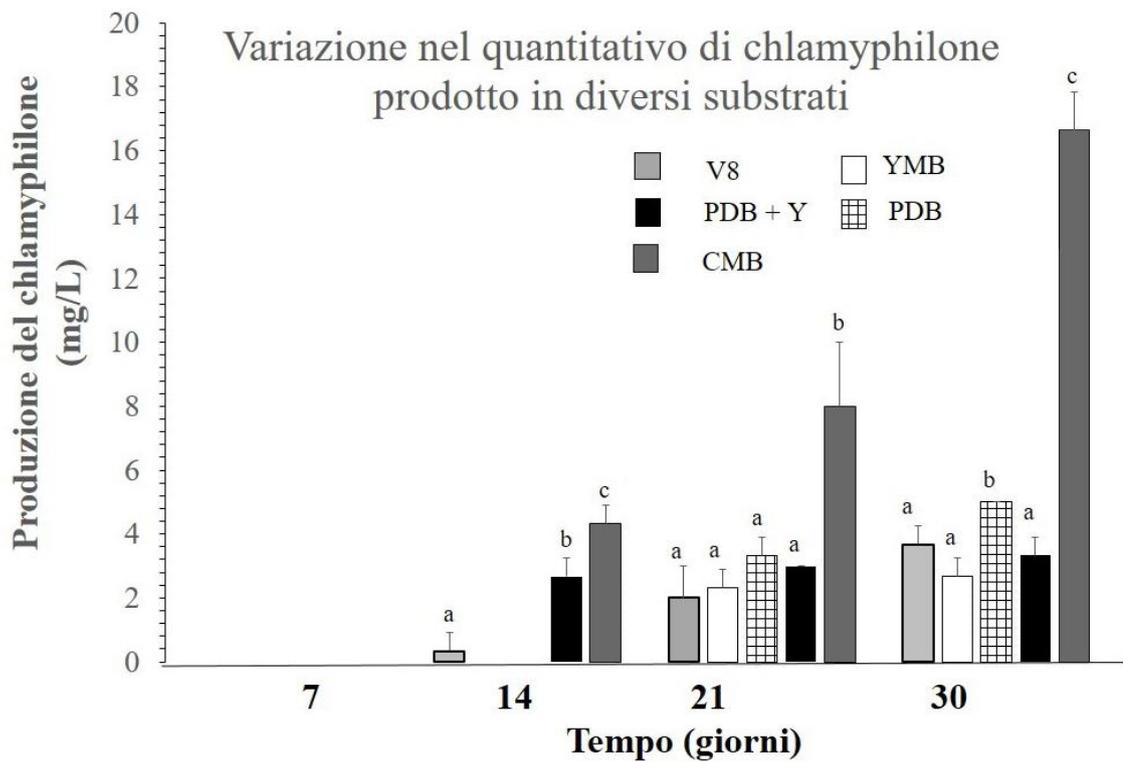


Figura 38. Produzione del chlamyphilone in diversi substrati nel tempo. Grigio chiaro = V8; nero = Potato dextrose broth + yeast (5 g/L); grigio scuro = Corn meal broth; bianco = Yeast mannitol broth; reticolato = Potato dextrose broth. Le lettere indicano la differenza tra i diversi trattamenti nel tempo; analisi statistica *one-way* ANOVA ($p < 0,05$) con *post hoc* test LSD.

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'impiego dei metodi di lotta convenzionali in agricoltura ha ricevuto negli anni sempre maggiori critiche di insostenibilità sia per gli ecosistemi che per la sicurezza alimentare. Anche gli effetti sulla salute umana non possono essere più sottovalutati. Spesso, infatti, l'esposizione degli operatori del settore ai pesticidi e l'ingestione di residui chimici attraverso gli alimenti hanno causato gravissimi danni, specialmente nel lungo termine (Battilani, 2016). La presa di coscienza riguardo queste tematiche ha portato, negli anni, ad una vera e propria rivoluzione di pensiero che si è tradotta nell'adeguamento delle normative per la difesa in agricoltura verso l'adozione di pratiche sostenibili come la lotta biologica. L'esigenza di una sempre crescente richiesta di mercato per la realizzazione di nuovi bio-formulati ad azione protettiva per le piante, che siano ecosostenibili e di facile impiego, spinge il mondo della ricerca a colmare il divario di conoscenze ad esempio sull'uso potenziale di metaboliti secondari come biopesticidi (Knight *et al.*, 2003).

Nell'ambito dell'attività di ricerca alla base di questa tesi, è stata realizzata una collezione microbica di ceppi provenienti da diversi ambienti (macchia mediterranea, bosco, pascolo, querceta) e dalla micoteca del Dipartimento di Agraria della Università degli Studi di Napoli Federico II, da utilizzare come sorgente di nuove molecole fungine ad azione insetticida potenzialmente impiegabili nella lotta biologica e integrata in agricoltura.

I microrganismi si adattano e rispondono all'ambiente esterno biosintetizzando un gran numero di metaboliti secondari prodotti in risposta a stress esterni. Nella *drug discovery* basata sulla caratterizzazione di molecole naturali, la diversificazione genetica delle specie considerate è alla base della possibilità di isolare nuovi metaboliti utili (Knight *et al.*, 2003). Diversificare il set di campioni prelevandoli da vari ambienti è una delle tecniche per aumentare la possibilità di trovare composti dotati di nuove funzioni o attività potenziata (Knight *et al.*, 2003). In quest'ottica la realizzazione di una collezione microbica varia e vasta può essere il punto di partenza ideale per l'isolamento di metaboliti secondari mai caratterizzati.

L'impiego dei metaboliti prodotti da microrganismi fungini per la lotta biologica in agricoltura può rappresentare una soluzione più efficace rispetto all'utilizzo di microbi vivi per diversi motivi. I metaboliti prodotti da microrganismi possono essere meno soggetti alla pressione

selettiva negli ecosistemi rispetto ai microrganismi vivi, i quali potrebbero essere sottoposti ad antagonismo, competizione o parassitismo nell'ambito delle complesse comunità microbiche associate alle piante e al suolo. Il loro impiego potrebbe essere maggiormente efficace data la possibilità di applicare un dosaggio controllabile del metabolita e/o composto puro. Inoltre, essi possono garantire una maggiore facilità di stoccaggio e una più elevata *shelf life* (Villaverde *et al.*, 2014). Queste caratteristiche, oltre alla più semplice standardizzazione della produzione e del prodotto, influiscono positivamente sulla valutazione della convenienza economica dell'uso dei biopesticidi a base di metaboliti attivi. Inoltre, l'utilizzo di combinazioni di metaboliti secondari dotati di diversi meccanismi d'azione può ridurre il rischio di insorgenza di fenomeni di resistenza nella popolazione *target*, un fenomeno tipicamente associato all'uso della chimica nella protezione delle colture (Thakore, 2006).

L'impiego di sostanze naturali in agricoltura è maggiormente ecosostenibile, per l'uomo e per l'ambiente circostante, in quanto i metaboliti impiegati come base per le formulazioni biologiche sono naturalmente presenti nelle matrici ambientali perché prodotti durante il ciclo vitale degli organismi utilizzati. I metaboliti costituiscono parte dell'arsenale di "armi" naturali possedute dai microbi contro altri organismi (patogeni e/o parassiti) loro bersagli. Queste molecole possono avere un effetto ad ampio spettro d'azione nei confronti di più patogeni o microrganismi ed effetti benefici molteplici per le piante (e.g. promozione di crescita; incremento della resistenza contro stress biotici e abiotici). Ciò non accade quasi mai per i prodotti di sintesi, i quali sono spesso stati causa, negli anni, di accumulo di inquinamento negli ecosistemi.

Nell'ambito del presente lavoro è stato sviluppato un metodo di *screening* rapido degli estratti organici ottenuti per controllare l'afide *A. pisum*, ottenendo informazioni sull'attività insetticida dei campioni prodotti man mano che si procedeva al frazionamento. Un metodo del genere è fondamentale per ottenere rapidamente informazioni riguardanti l'attività insetticida dei singoli estratti o delle molecole in purezza, permettendo di effettuare un'analisi veloce della totalità degli estratti organici ottenuti.

Gli estratti organici grezzi delle specie *P. lilacinus*, *P. griseofulvum*, *P. chlamydosporia*, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *T. pinophilus* sono risultati attivi nei confronti di *A. pisum*, alcuni erano costituiti da miscele di composti attivi, altri da singole molecole dotate di attività insetticida. Tutte le altre specie fungine testate non hanno mostrato significativa attività insetticida. In particolare, le specie che presentavano maggiore attività insetticida erano: *M. anisopliae*; *B. bassiana*; *P. chlamydosporia*; *P. griseofulvum* rispettivamente con il 40, 40, 47, 40 % di mortalità a 72 ore dal trattamento ad una concentrazione di 10 mg di estratto grezzo/mL. Gli

estratti delle specie *T. pinophilus* e *P. lilacinus* hanno mostrato attività insetticida meno rilevante: 35,7 e 3,3 % rispettivamente.

Gli estratti organici grezzi delle specie risultate attive e quindi selezionate potranno essere ulteriormente valutati come principi attivi di nuovi bio-insetticidi in grado anche di controllare generazioni successive di insetti con dosi di impiego, sia come molecola purificata sia come estratto semipurificato, relativamente basse (Copping e Menn, 2000). Lo sviluppo di una biotecnologia basata sull'utilizzo di molecole prodotte da microrganismi, in particolare funghi, che sia in grado di controllare la diffusione di insetti patogeni in agricoltura anche a lungo termine (per più generazioni) potrebbe costituire un obiettivo molto vantaggioso, sia per le aziende produttrici che per gli agricoltori, fino ad arrivare ai singoli consumatori del prodotto. Una innovazione di questo tipo infatti, potrebbe rappresentare la soluzione ottimale per ridurre l'impiego di pesticidi chimici e, allo stesso tempo, ottenere effetti in tutto e per tutto paragonabili ai metodi tradizionali di controllo degli insetti patogeni in agricoltura, e per certi versi, anche migliorati in termini di qualità nutrizionali e organolettiche dei prodotti agricoli, efficacia a lungo termine contro i patogeni e riduzione dell'inquinamento ambientale.

Nell'ambito di questo lavoro ogni estratto grezzo attivo è stato sottoposto a vari passaggi cromatografici utilizzando un sistema di frazionamento guidato dai saggi di attività insetticida (frazionamento bio-guidato), che ha permesso di individuare, per ogni ceppo, le molecole pure attive su *A. pisum* (Malviya e Malviya, 2017). Nei lavori di *drug discovery* il frazionamento degli estratti grezzi associato a biosaggi è considerato il metodo migliore per l'identificazione certa delle singole molecole bioattive (Butler, 2004). Ogni miscela di metaboliti ottenuti da colture di specie fungine può, potenzialmente, contenere una o più molecole bioattive con proprietà utili in diversi campi, e.g. agricoltura, farmacopea, etc. Può accadere che, talvolta, le proprietà intrinseche delle molecole possano non essere espresse in miscele eterogenee per la presenza di interazioni tra metaboliti diversi che nascondono le proprietà delle singole componenti (De Feo *et al.*, 2009).

L'analisi del metaboloma di numerosi ceppi fungini effettuata valutando l'attività insetticida nei confronti di *A. pisum*, ha consentito di definire un quadro completo del contenuto di composti bioattivi presenti negli estratti organici ottenuti. Secondo Chandrasena *et al.* (2011) la messa a punto di un metodo di *screening* molto veloce per valutare l'attività insetticida di pesticidi di sintesi come piretroidi, organofosfati e neonicotinoidi può comunque consentire di ottenere informazioni sulla dose letale di ogni prodotto da testare nei confronti degli afidi. Nel suddetto lavoro la metodologia descritta era applicata per saggiare pesticidi di sintesi nei

confronti della specie *A. glycines*, detto comunemente afide della soia. Il metodo consisteva nell'immersione di cinque afidi atteri per ogni replica in una soluzione acquosa a diverse concentrazioni del prodotto insetticida per 10 secondi. Successivamente, ogni *pool* di insetti trattati era trasferito su un disco di foglia di soia e posizionato su carta umida in una piastra Petri, per poi essere incubato in camera di crescita a 22°C, 70 % di umidità e 16:8 ore di luce/buio. Il controllo degli individui vivi o morti veniva effettuato a 24 e 48 ore.

Anche De Feo *et al.* (2009) hanno utilizzato un metodo simile per testare l'attività insetticida dell'aliantone, un metabolita isolato dalla specie *Alianthus altissima*, dimostrando che questa tipologia di test poteva essere impiegata anche utilizzando molecole provenienti da fonti naturali. In questo lavoro, gli afidi atteri sono stati impiegati al primo stadio di crescita, in quanto le ninfe, in genere, sono ritenute più sensibili degli adulti e quindi in grado di fornire maggiori informazioni sulla potenzialità insetticida di una molecola (De Feo *et al.*, 2009).

La metodologia di *screening* adottata nell'ambito di questa ricerca risulta dalla combinazione delle suddette metodiche. Essa è stata realizzata anche considerando il metodo descritto dalla *Insecticide Resistance Action Committee* (www.irac-online.org, metodo N° 019) per saggiare differenti specie di afidi, inclusa *A. pisum*, e che prevede l'impiego di dischetti di foglie non infestate da posizionare con la pagina inferiore adesa al *water agar* (1 %). L'agar garantiva la turgidità delle foglie per un periodo abbastanza lungo da coprire tutto l'intervallo del test (72 h).

Le molecole purificate dagli estratti grezzi dotati di attività insetticida erano le seguenti: leucinostatina A, B, D; griseofulvina; beauvericina; destruttina B2; 3-O-Methylfunicone; chlamyphilone (Tabella 15).

Tabella 15: Specie fungine e rispettive molecole pure dotate di attività insetticida sull'afide *A. pisum*

Specie	Molecola purificata dotata di attività insetticida
<i>P. lilacinus</i>	Leucinostatina A, B, D
<i>P. griseofulvum</i>	Griseofulvina
<i>B. bassiana</i>	Beauvericina
<i>M. anisopliae</i>	Destruttina B2
<i>T. pinophilus</i>	3-O-Methylfunicone
<i>P. chlamydosporia</i>	Chlamyphilone

L'estratto organico di *P. lilacinus* conteneva una miscela di leucinostatine di tipo A, B e D ritenute responsabili dell'attività insetticida. Esse, purificate dall'estratto grezzo, erano attive su *A. pisum* ad una concentrazione di 0,5 mg/mL (30 % di mortalità a 72 h dal trattamento). Le leucinostatine A, B e D rispettivamente di formula $C_{62}H_{111}N_{11}O_{13}$, $C_{61}H_{109}N_{11}O_{13}$ e $C_{56}H_{101}N_{11}O_{11}$ (Fig. 25) sono polipeptidi costituiti da nove aminoacidi che si ritrovano quasi sempre in miscela di molecole che differiscono per un solo singolo aminoacido (Mikami *et al.*, 1984; Park *et al.*, 2004).

La principale caratteristica di queste molecole è l'acilazione dell'aminoacido N-terminale e la presenza di un'elevata percentuale di due aminoacidi poco comuni, l'acido α -aminoisobutirrico e l'isovalina, presenti in natura molto raramente, ma comuni in alcune specie fungine tra cui quelle appartenenti al genere *Trichoderma* (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991). Tutti e tre i tipi di leucinostatine isolate hanno proprietà nematocide soprattutto nei confronti della specie *C. elegans*. Secondo Park *et al.* (2004) infatti, queste miscele di molecole inducevano una mortalità del 50% della popolazione di nematodi trattati dopo 24 ore dal trattamento ad una concentrazione di 100 ppm. Tra le proprietà delle leucinostatine sono annoverate quelle antibatteriche e antimicotiche che si esplicano attraverso un meccanismo d'azione basato, prevalentemente, sulla inibizione della sintesi dell'ATP mitocondriale, e su differenti *pathways* di fosforilazione (Park *et al.*, 2004). Tale meccanismo è anche alla base dell'attività nematocida di questi polipeptidi (Omkar, 2016). Le leucinostatine A, B e D sono prodotte dal fungo *P. lilacinus* durante la sua fase di infezione nei confronti di nematodi e svolgono un ruolo fondamentale per l'attività di biocontrollo. La loro produzione in PDB è stata precedentemente descritta da Park *et al.* (2004), secondo cui l'attività nematocida della specie *P. lilacinus* era direttamente collegata al rilascio, nel mezzo di coltura, di leucinostatine. Nessun dato è presente in letteratura sull'attività insetticida delle leucinostatine su *A. pisum*. Il risultato ottenuto nell'ambito di questa ricerca dunque è innovativo, e fornisce un'informazione essenziale per un potenziale impiego delle leucinostatine A, B e D in bio-formulati ad azione insetticida su *A. pisum*.

La frazione purificata dalla specie *P. griseofulvum* responsabile dell'attività insetticida era costituita da griseofulvina (Fig. 25), una molecola con formula bruta $C_{17}H_{17}ClO_6$ dotata di innumerevoli proprietà e impiegata, per le sue caratteristiche antibiotiche, in molti prodotti commerciali (Zhang *et al.*, 2017). La sua attività insetticida su *A. pisum* ha mostrato il 73,3 % di mortalità alla concentrazione di 0,5 mg/mL a 72 h dal trattamento.

Tra le principali caratteristiche della griseofulvina c'è la sua capacità di bloccare la mitosi cellulare e la sua attività insetticida è nota in letteratura da tempo (Dowd, 1993). Essa è attiva soprattutto su insetti masticatori come *Spodoptera frugiperda*, mostrando una tossicità acuta a livello intestinale se somministrata per via orale in aggiunta alla dieta delle larve. La sua azione sembra essere modulata dal piperonil butossido, un inibitore degli enzimi citocromo P450-dipendenti che blocca la degradazione del principio attivo da parte dell'organismo bersaglio (Dowd, 1993). La tossicità di questa molecola, considerata una micotossina, su *S. frugiperda* sembra essere direttamente collegata all'esposizione ai raggi UV poichè le larve che avevano ingerito griseofulvina esposte alla radiazione, presentavano una mortalità più elevata rispetto alle larve non esposte agli UV (Dowd 1993).

La frazione responsabile dell'attività insetticida in *B. bassiana* era costituita da beauvericina, un ciclodepsipeptide di formula $C_{45}H_{57}N_3O_9$, prodotto in alcune specie soprattutto appartenenti ai generi *Beauveria*, *Paecilomyces* e *Fusarium* (Daniel *et al.*, 2017) (Fig. 25).

La sua attività insetticida non è variata passando dall'estratto grezzo alla molecola in purezza. Questo risultato è coerente con numerosi studi che hanno dimostrato come, nell'impiego di insetticidi di origini naturali in miscele complesse, non è sempre facile associare l'attività ad uno specifico composto (De Feo *et al.*, 2009).

La beauvericina è in grado di formare complessi con cationi che aumentano la permeabilità delle membrane, sia naturali sia artificiali (Xu *et al.*, 2008), ed indurre morte cellulare programmata. I primi studi sulle sue proprietà tossiche furono svolti su crostacei (Daniel *et al.*, 2017), mentre di recente è stata dimostrata la sua spiccata azione sul terzo stadio larvale di *Aedes aegypti* per effetto da contatto (Daniel *et al.*, 2017). Anche su *Artemia salina*, *Lygus* spp., *S. frugiperda* e *S. graminum*, la beauvericina ha mostrato proprietà insetticide acute, riuscendo a penetrare l'esoscheletro e a diffondersi nel corpo dell'insetto (Wang e Xu, 2012). Secondo Ganassi *et al.* (2002) la beauvericina è in grado di controllare la popolazione dell'afide del grano *Schizaphis graminum* a partire dalla terza generazione sempre in seguito al contatto. In questo lavoro la molecola, ingerita dagli insetti attraverso le foglie, non è attiva sulla prima generazione di afidi ma le nascite nella terza generazione erano sensibilmente ridotte, e vi erano molti embrioni abortiti. Ciò indicava un'azione insetticida che si esplicava attraverso la riduzione delle nascite nelle generazioni successive, così come accade con molti bio-insetticidi (Senthil-Nathan, 2005). La frazione organica purificata nell'ambito di questa ricerca aveva un'azione insetticida abbastanza elevata (40 % di mortalità a 0,5 mg/mL e 72 h dal trattamento) a causa dell'effetto "contatticida" della beauvericina. L'estratto attivo della specie *M.*

anisopliae era formato in prevalenza da destruttina B2, di formula $C_{29}H_{49}N_5O_7$, costituita dall'acido α -idrossido e cinque residui aminoacidici (Fig. 25).

La purificazione della destruttina ha variato di pochissimo la potenzialità insetticida dell'estratto isolato (40% di mortalità dell'estratto grezzo a 10 mg/mL e 47,31 % di mortalità della frazione purificata a 0,5 mg/mL). Le destruttine sono note per le spiccate proprietà citotossiche su cellule cancerose (Morel *et al.*, 1983). In particolare, la destruttina E è più efficace delle altre per le proprietà antiproliferative su cellule neoplastiche in mammiferi. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato la sua efficacia contro il virus dell'epatite B (Odier *et al.*, 1987; Soledade *et al.*, 2002). Anche l'azione insetticida di questi potenti metaboliti secondari è stata dimostrata in letteratura. In particolare, la destruttina è stata testata su molte specie d'insetto attraverso diversi tipi di trattamento: ingestione, test da contatto, iniezione ecc. (Soledade *et al.*, 2002). La sua azione sembrerebbe essere dovuta alla depolarizzazione dei muscoli per apertura diretta dei canali del Ca^{2+} delle membrane, con conseguente paralisi e morte dell'insetto (Samuels *et al.*, 1988; Sree *et al.*, 2008). L'efficacia delle applicazioni sono risultate specie-dipendenti. Infatti, secondo Poprawski *et al.* (1994) e Amiri *et al.* (1999) le destruttine non sono efficaci in trattamenti topici sull'insetto modello *Galleria mellonella*, parassita delle api, mentre lo sono sul cicadellidae *Empoasca vitis*, insetto molto dannoso su vite, e sul parassita delle crucifere *Phaedon cochleariae* (Sree *et al.*, 2008). Questi dati lascerebbero ipotizzare un effetto tossico soprattutto su parassiti vegetali. Ciò concorderebbe con il dato riportato nell'ambito di questa ricerca sull'attività insetticida della destruttina B2 nei confronti dell'afide delle leguminose *A. pisum*.

La frazione attiva dell'estratto purificato dall'endofita *T. pinophilus* era costituita dal 3-O-methylfunicone (OMF), un derivato metilato del funicone di formula $C_{20}H_{20}O_8$ (Fig. 25).

L'estratto totale grezzo era maggiormente attivo rispetto alla frazione in purezza (35,7 % dell'estratto grezzo a 10 mg/mL e 26,2 % della frazione pura a 0,5 mg/mL). Questo dato è compatibile con un possibile effetto sinergico della molecola ritenuta responsabile dell'attività con altri metaboliti presenti nella frazione grezza. Effetti sinergici sono riportati in letteratura per le molecole derivate dai funiconi in alcuni studi di farmacologia su pazienti immunodepressi (Nicoletti *et al.*, 2009). Al momento sono in corso studi più approfonditi sulla natura chimica delle altre molecole presenti nell'estratto grezzo di *T. pinophilus*. L'azione protettiva degli endofiti nei confronti delle piante è ampiamente nota in letteratura, essi infatti possono essere in grado di produrre metaboliti secondari capaci di arricchire l'arsenale di difesa delle specie vegetali ospiti (Arnold *et al.*, 2003). Il ceppo di *T. pinophilus* utilizzato in questo lavoro è un antagonista del patogeno *R. solani* (De Stefano *et al.*, 1999) ed è in grado di limitare la

diffusione del patogeno attraverso micoparassitismo e lisi cellulare. Infatti, è ampiamente nota la produzione di enzimi litici, come glucanasi, beta-glucosidasi, cellulasi, xylanasi ed endoglucanasi da parte di questa specie microbica (Alagesabooopathi, 1994). L'OMF ha spiccate proprietà antibiotiche e la sua attività insetticida era stata riscontrata soltanto su *A. salina*, un organismo modello utilizzato per studi di tossicità (Rusman, 2006). L'attività insetticida nella frazione purificata da *P. chlamydosporia*, era determinata da un nuovo metabolita secondario mai caratterizzato precedentemente, il chlamyphilone (CH) di formula $C_{12}H_{12}O_4$ (Fig. 39).

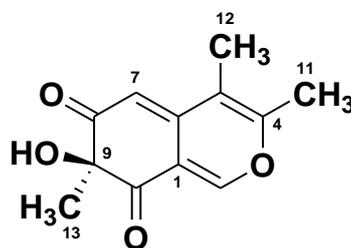


Figura 39. Struttura molecolare del chlamyphilone (CH).

L'attività insetticida del CH è risultata particolarmente significativa (100% di mortalità a 0,5 mg/mL). Questa nuova molecola è un azafilone appartenente alla classe dei polichetidi, metaboliti in genere molto stabili, prodotti nei funghi ascomiceti con un processo simile a quello che porta alla biosintesi degli acidi grassi (Gill e Steglich, 1987). Essi si originano tramite condensazione decarbossilativa di unità di malonil-CoA, principale donatore di unità acetiliche nella sintesi degli acidi grassi (Quang *et al.*, 2005). Gli azafiloni sono una classe di sostanze naturali caratterizzate da un nucleo biciclico altamente ossigenato e un centro quaternario chirale. Sono note per l'elevata capacità di reagire con ioni ammonio ed ammine pigmentandosi di rosso per scambio di ossigeno con l'azoto (Gao *et al.*, 2013), il che da origine a colorazioni molto vistose dei substrati di coltura contenenti il micelio fungino. Gli azafiloni possono inibire il funzionamento della glicoproteina virale gp 120-CD4 presente nel pericapside del virus dell'HIV e della *heat shock protein* 90, oltre ad avere proprietà antinfiammatorie, anticancro, antimicrobiche, antivirali e citotossiche (Gao *et al.*, 2013). Anche se molti azafiloni sono stati isolati ed identificati, ancora poco si conosce riguardo al loro *pathway* biosintetico (Wang, 2009). Molte molecole di questo genere sono state isolate e descritte come mitorubrine ad azione antibatterica ed antiprotozoaria, inibitrici della deidrogenasi (Hayashi *et al.*,

1996). Nel presente lavoro si è potuto verificare che la produzione di CH in PDB era di 5 mg/L in 30 giorni di crescita in coltura statica. Questo dato è stato modificato, incrementando notevolmente la biosintesi in un substrato più specifico per la produzione di chlamydosporie, come il Corn Meal Broth (CMB) (Nagesh *et al.*, 2007).

L'estratto organico di *P. chlamydosporia* conteneva anche due metaboliti, non dotati di significativa attività nei confronti di *A. pisum* e di polarità molto vicina a CH, identificati come myxostiolo e iso-myxostiolo (stereoisomero del myxostiolo) (Fig. 40).

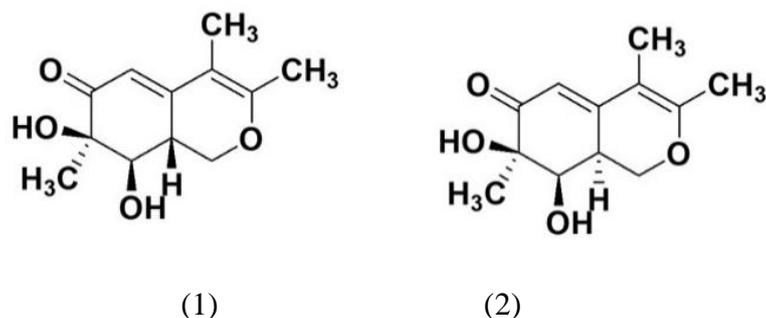


Figura 40. Struttura molecolare del myxostiolo (1) e del suo stereoisomero (2).

Il myxostiolo è una molecola già nota in letteratura, purificata per la prima volta dal fungo *Myxotrichum stipitatum*. Questo metabolita può regolare la crescita del tubo pollinico e incrementare l'accrescimento radicale in lattuga (Kimura *et al.*, 2002). Nel presente lavoro è stato osservato che il myxostiolo probabilmente si degradava molto velocemente in CMB rispetto al PDB, dando origine ad una maggiore quantità di CH (Bertrand *et al.*, 2013).

La sintesi di metaboliti secondari nei microrganismi può essere ottenuta attraverso l'attivazione di *pathways* biosintetici che possono essere definiti criptici, in quanto vengono attivati esclusivamente in determinate condizioni di crescita (Ochi e Hosaka, 2013). Per stimolare il metabolismo fungino secondario nella produzione di molecole bioattive ad azione insetticida potrebbe essere utile realizzare substrati di crescita contenenti insetti o parti di essi. Soprattutto in specie fungine entomopatogene o saprofiti l'interazione del fungo con parti di insetto contenute nel substrato potrebbe essere d'innescò per l'attivazione di *pathways* biosintetici che portano alla secrezione, nel mezzo di crescita, di metaboliti con importanti proprietà potenzialmente utili all'uomo.

Una delle strategie per la stimolazione della produzione di metaboliti secondari consiste nella realizzazione di co-colture di due o più specie diverse (Scherlach e Hertweck, 2009). Dall'interazione che si instaura tra i due organismi è possibile che risulti la produzione di molecole bioattive che offrono un vantaggio selettivo ad una delle due specie fungine. Molti

lavori dimostrano che una interazione di questo genere può portare a cambiamenti nell'espressione genica, produzioni di particolari enzimi e di metaboliti secondari con funzioni complesse (Schroekch *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2016). La realizzazione di co-culture è una strategia che simula ciò che accade in natura tra diverse specie di una comunità microbica. Nell'ambito di questa ricerca la co-cultura realizzata tra le specie *T. harzianum* (ceppo M10) e *T. pinophilus* (ceppo F36CF) ha stimolato la produzione di un nuovo metabolita secondario mai caratterizzato precedentemente, l'acido harziafilico, di formula $C_{11}H_{17}NO_5$ (Fig. 41). Entrambe le specie fungine poste in co-cultura avevano elevate potenzialità di produrre metaboliti secondari con particolari proprietà potenzialmente utili. Sia il ceppo M10 (noto agente di biocontrollo) sia il ceppo F36CF (endofita) infatti, sono noti in letteratura per produrre metaboliti ad azione antibiotica e innescare il sistema di difesa delle piante attraverso diversi meccanismi (Vinale *et al.*, 2013; Vinale *et al.*, 2017).

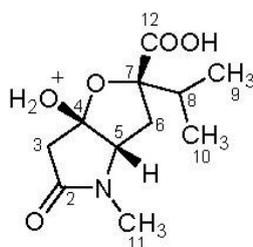


Figura 41. Struttura molecolare dell'acido harziafilico.

L'acido harziafilico caratterizzato nell'ambito della co-cultura tra i due ceppi è un derivato dell'acido tetramico, precursore di una classe di composti molto diffusi in natura e che presentano molteplici proprietà biologiche. Molti metaboliti di questo genere sono potenti antimicotici, antibatterici, antivirali, antiproliferativi (Vinale *et al.*, 2017, in stampa) e possono ricoprire un ruolo importante in interazioni pianta-patogeno e nell'inibizione della crescita di linee cellulari (Mo *et al.*, 2014). Alcuni acidi tetramici sono stati brevettati come fungicidi, insetticidi o erbicidi. Esistono, infatti, alcuni prodotti a base di acidi tetronici e tetramici, come l'acido spirotetraamico 21 e 22, che svolgono un'azione insetticida bloccando la funzionalità dell'acetil-coenzima A carbossilasi, una proteina di vitale importanza per la produzione di acidi grassi in alcuni artropodi, come acari ed insetti (Dekeyser, 2004).

L'acido harziafilico non risulta possedere proprietà insetticide nell'applicazione topica sull'afide *A. pisum*, tuttavia, studi nell'ambito di una collaborazione con il Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Napoli Federico II hanno consentito di verificare l'effetto antiproliferativo su cellule cancerose.

Nell'ambito della co-coltura tra M10 e F36CF sono stati purificati diversi metaboliti secondari tutti con interessanti proprietà potenzialmente utili all'uomo. In particolare, è stata purificata la molecola denominata 3-O-metilfunicone (OMF) che risulta possedere potenti proprietà antibiotiche e antibatteriche, come descritto da De Stefano *et al.*, 1999. Il metabolita denominato herquolina B fu purificato per la prima volta da un ceppo di *Penicillium herquei*, esso è noto in letteratura per la sua caratteristica di contenere azoto che può agire come fattore di antiaggregazione piastrinica (Enomoto *et al.*, 1996). La ferrirubina invece, è un sideroforo ferricromo che, nell'ambito della co-coltura realizzata tra *T. harzianum* ceppo M10 e *T. pinophilus* ceppo F36CF, è stato prodotto in concentrazioni maggiori rispetto al controllo. Questo fenomeno è stato innescato, molto probabilmente, dalla presenza del ceppo M10 in coltura, il quale ha stimolato la produzione della ferrirubina che avrebbe consentito una maggiore assimilazione del ferro (Heymann *et al.*, 2000). I siderofori ferricrocina, coprogeno B e acido dimerumico sono stati prodotti tutti in grosse concentrazioni. In genere, la produzione di molecole simili aiuta le specie fungine ad assimilare al meglio il ferro e può anche offrire un vantaggio selettivo durante l'interazione pianta-fungo, determinando di conseguenza un incremento della crescita delle specie vegetali (Vinale *et al.*, 2008). La produzione di molecole con funzione di siderofori può, inoltre, limitare la crescita di altri microrganismi per la competizione che si instaura per il ferro presente nell'ecosistema o nel substrato di coltura. L'acido harzianico (HA) identificato in entrambe le colture (sia singola che combinata) ha note proprietà di chelante del ferro e, attraverso questo meccanismo, è in grado di promuovere la crescita in pianta, (Vinale *et al.*, 2013). La produzione di HA in co-coltura sembra non essere variata rispetto al controllo (coltura singola), un risultato molto simile è stato ottenuto per il suo stereoisomero, l'acido iso-arzianico, probabilmente la sua concentrazione in co-coltura è stata regolata dalla presenza degli altri siderofori prodotti. La trichoharzianina, un polichetide purificato in precedenza da un ceppo di *T. harzianum* isolato dalla spugna marina *M. cecilia* (Newman e Cragg, 2010), possiede una modesta attività citotossica nei confronti di diverse linee cellulari di cancro e numerosi studi hanno dimostrato che la sua biosintesi è influenzata da condizioni particolari di stress o da eccessiva salinità del mezzo di coltura (Rahbæk *et al.*, 1998). Nell'ambito di questa ricerca, in maniera analoga, l'induzione di produzione dell'omologo della trichoharzianina potrebbe essere plausibilmente legata alle condizioni di stress relative alla presenza del fungo competitore nelle immediate vicinanze.

In conclusione, dai risultati ottenuti nell'ambito di questo lavoro è possibile affermare che l'impiego di specie fungine provenienti da diversi habitat per la realizzazione di colture mirate

alla produzione di metaboliti secondari, può essere considerata una strategia valida e con elevate potenzialità ancora in gran parte ignote. I risultati prodotti possono essere utili per la realizzazione di bio-formulati da utilizzare per la lotta biologica in agricoltura. Il principio attivo alla base di essi potrebbe essere costituito dagli estratti organici delle specie fungine attive, dalle molecole isolate e dotate di attività insetticida, e/o dai ceppi microbici vivi già noti per le proprietà entomopatogene.

8. BIBLIOGRAFIA

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.

Agrios, G.N. (2004). *Plant Pathology 5th Edition*, Academic Press, London, pp 952.

Alagesabooopathi, C. (1994). Biological control of damping-off disease of cotton seedling. *Current Science*, 66: 865-868.

Alexander, M. (1971). *Microbial ecology*. John Wiley and Sons, New York, pp 694.

Amiri, B., Ibrahim, L., Butt, T. M. (1999). Antifeedant properties of destruxins and their use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. *Biocontrol Science and Technology*, 9: 487–498.

Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kyllö, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 15649-15654.

Bhat, S. V., Nagasampagi, B. A., Sivakumar, M. (2005). *Chemistry of Natural Products*. Narosa Publishing House, New Delhi Chennai Mumbai Kolkata, India, pp 823.

Battilani, P. (2016). *Difesa sostenibile delle colture*. Edagricole - New Business Media, Milano, Italia, pp 336.

Belli, G. (2007). *Elementi di patologia vegetale*. Piccin Nuova Libreria, Napoli, Italia, pp 475.

Berasategui, A., Shukla, S., Salem, H., Kaltenpoth, M. (2016). Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 1567–1577.

Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Monod, M., Gindro, K., Wolfender, J. L. (2013). De novo production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *Journal of Natural Products*, 76: 1157-1165.

Behie, S.W., Israel, E., Padilla-Guerrero, Bidochka, M. J. (2013). Nutrient transfer to plants by phylogenetically diverse fungi suggests convergent evolutionary strategies in rhizospheric symbionts. *Communicative & Integrative Biology*, 6.1: e22321.

Bordallo, J. J., Lopez-Llorca, L. V., Jansson, H. B., Salinas, J., Persmark, L., Asensio, L. (2002). Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist*, 154: 491–499.

Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews, Microbiology*, 11: doi:10.1038/nrmicro2916.

Bu'Lock, J. D. (1961). Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Advances in Applied Microbiology*, 3: 293–342.

Butler, M. S. (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, 67: 2141-2153.

Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Biological Sciences*, doi: 10.1098/rstb.2010.0390.

Chandrasena, D., Difonzo, C., Byrne, A. (2011). An aphid-dip bioassay to evaluate susceptibility of soybean aphid (Hemiptera: Aphididae) to pyrethroid, organophosphate, and neonicotinoid insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 104: 1357-1363.

Chatterjee, P., Samaddar, S., Anandham, R., Kang, Y., Kim, K., Selvakumar G., Sa., T. (2017). Beneficial soil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* OS261 augments salt tolerance and promotes red pepper plant growth. *Frontiers in Plant Science*, 8: 705, doi: 10.3389/fpls.2017.00705.

Copping, L. G., Menn, J. J. (2000). Review Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56: 651-676.

Daniel, J., F. S., Andressa, A. S., Nakagawa, D. H., de Medeiros, L. S., Carvalho, M. G., Tavarres, L. J., Abreud, L. M., Filhob, E. R. (2017). Larvicidal activity of *Beauveria bassiana* extracts against *Aedes aegypti* and identification of Beauvericins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28: 1003-1013.

Dasrat, B., Rajkumar A., Richards-Haynes C., Quashie-Williams C., Eastwood D. (1997) Evaluation of *Allorhogas pyralophagus* Marsh (Hymenoptera: Braconidae) for the biological control of *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Pyralidae) in sugar-cane in Guyana. *Crop Protection*, 16: 723-726.

de Bekker, C., Ohm, R. A., Loreto, R. G., Sebastian, A., Albert, I., Merrow, M., Bracchman, A., Hughes, D. P. (2015). Gene expression during zombie ant biting behavior reflects the complexity underlying fungal parasitic behavioral manipulation. *BMC Genomics*, 16: 620.

Bolletino Ufficiale della Regione Campanianumero 23 del 20/03/2017. Decreto Dirigenziale n. 43, (2017). Norme tecniche per la difesa ed il diserbo integrato delle colture. Piano Regionale di Lotta Fitopatologica Integrata. PSR (REG.1305/2013) DISCIPLINARI DI PRODUZIONE INTEGRATA, pp. 399.

Dekeyser, M. A. (2004). Acaricide mode of action. *Pest Management Science*, 2: 103-110, doi: 10.1002/ps.994.

de Graaff, L. H., Van den Broek, H., Visser, J. (1988). Isolation and expression of the *Aspergillus nidulans* pyruvate kinase gene. *Current Genetics*, 11: 499–503.

De Feo, V., Mancini, E., Voto, E., Curini, M., Digilio, M., C. (2009). Bioassay-oriented isolation of an insecticide from *Ailanthus altissima*. *Journal of Plant Interactions*, 4: 119-123.

De Stefano, S., Nicoletti, R., Milone, A., Zambardino, S. (1999). 3-O-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. *Phytochemistry*, 52: 1399-1401.

Dowd, P. F. (1993). Toxicity of the fungal metabolite griseofulvin to *Helicoverpa zea* and *Spodoptera frugiperda*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 69: 5-11.

Escudero, N., Lopez-Llorca, L. V. (2012). Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis*, 57:33–42.

Enomoto, Y., Shiomi, K., Hayashi, M., Masuma, R., Kawakubo, T., Tomosawa, K., Iwai, Y., Omura, S. (1996). Herquiline B, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Penicillium herquei* Fg-372. *The Journal of Antibiotics*, 49: 50-53.

Faria, M.R., Wraight, S.P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237–256.

Fogliano, V., Ballio, A., Gallo, M., Woo, S. L., Scala, F., Lorito, M. (2002). *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15: 323-333.

Ganassi, S., Moretti, A., Bonvicini Pagliai, A. M., Logrieco, A., Sabatini, M. A. (2002). Effects of beauvericin on *Schizaphis graminum* (Aphididae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 80: 90-96.

Gao, G. M., Yang, S. X., Qin, J. C. (2013). Azaphilones: Chemistry and Biology. *Chemical Reviews*, 113: 4755-4811.

Ghisalberti, E. L., Sivasithampam, K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology & Biochemistry*, 23: 1011-1020.

Gill, M., Steglich, W. (1987). Pigments of fungi (Macromycetes). In: Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W., Tamm, C. (Eds.). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 51, Springer, Wien, Austria, pp 150.

Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R., Varma, A. (2005). Microbial diversity in soils. *Micro-organism in soils: roles in genesis and functions*. Springer-Verlag, Heidelberg, 195-212.

Harris, F. K., Maramorosch, K. (2014). Aphids as virus vectors. Academic Press. New Brunswick, New York, USA, pp 576.

Hayashi, K., Hatsutori, N., Donho, M., Nakajima, H. (1996). Dihydrofolate reductase inhibitors containing mitorubrin compounds for protozoiasis. Japanese patent, JP 08217673.

Heymann, P., Ernst, J. F., Winkelmann, G. (2000). Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 15: 186-221.

Holčápek, M., Jirásko, R., Lída, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1259: 3-15.

Humber, R. A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 262–266.

Jilani, G., Akram, A., Raja, M., AliFauzia, M., HafeezImran, H., ShamsiArshad, N., Chaudhry, A., Chaudhry, G. (2007). Enhancing crop growth, nutrients availability, economics and beneficial rhizosphere microflora through organic and biofertilizers. *Annals of Microbiology*, 57: 177–184.

Kerry, B. R. (1988). Fungal parasites of cyst nematodes. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 24: 293-305.

Kerry, B. R. (1995). Ecological considerations for the use of the nematophagus fungus *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Botany*, 73: 65-70.

Kimura, Y., Shimada, A., Kusano, M., Yoshii, K., Morita, A., Nishibe, M., Fujioka, S., Kawano, T. (2002). Myxostiolide, myxostiol, and clavatoic acid, plant growth regulators from the fungus *Myxotrichum stipitatum*. *Journal of Natural Products*, 65: 621-623.

Knight, V., Sanglier, J. J., Di Tullio, D., Braccilli, S., Bonner, P., Waters, J., Hughes, M. D., Zhang, L. (2003). Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 446-458.

Kramera, K. J., Muthukrishnanb, S. (1997). Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 887 – 990.

Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 1-41.

Larriba, E., Jaime, M. D. L. A., Caballero, C. J., Conesa, A., Dopazo, J., Nislow, C., Martín-Nieto, J., Lopez-Llorca, L. V. (2014). Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Genetics and Biology*, 65: 69-80.

Linderman, R. G. (1988). Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora: the mycorrhizzosphere effects. *Phytopathology*, 78: 366-371.

Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L., Di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*–antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83: 302–7.

Lorito, M., Cervone, F. (2004). Lotta Biologica. *Enciclopedia del Novecento*, supplemento III, Istituto della Enciclopedia Italiana, Treccani, Roma, Italia, pag. 92-98.

Lorito, M., Woo, S. L., Iaccarino, M., Scala, F. (2006). *Microrganismi antagonisti. Microrganismi benefici per le piante*. Idelson-Gnocchi s.r.l., Napoli, Italia 146-175.

Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., Mont, E. (2010). Translational Research on Trichoderma: From 'Omics to the Field'. *Annual Review Phytopathology*, 48: 19.1-19.23.

Maggi, O., Persiani, A. M., Casado, M. A., Pineda, F. D. (2005). Effects of elevation, slope position and livestock exclusion on microfungi isolated from soils of Mediterranean grasslands. *Mycologia*, 97: 984-995.

Malherios, A., Cechinel, F. V., Schmitt, C. B. Yunes, R. A., Escalante, A., Svetaz, L., Zacchino, S., Delle Monache, F. (2005). Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassay-guided fractionation. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15: 335-9.

Malviya, N., Malviya, S. (2017). Bioassay guided fractionation-an emerging technique influence the isolation, identification and characterization of lead phytomolecules. *International Journal of Hospital Pharmacy*, 1: 5.

Manter, D. K., Vivanco, J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 71: 7-14.

Miller, R. M., Jastrow, J. D. (1990). Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biology and Biochemistry*, 22: 579-584.

Mikami, Y., Fukushima, K., Arai, T., Abe, F., Shibuya, H., Ommura, Y. (1984). Leucinostatins, peptide mycotoxins produced by *Paecilomyces lilacinus* and their possible roles in fungal infection, 2: 275-83.

Mo, X., Li, Q., Ju, J. (2014). Naturally occurring tetramic acid products: isolation, structure elucidation and biological activity. *RSC Advances*, 4: 50566-50593.

Morel, E., Pais, M., Turpin, M., Guyot, M. (1983). Cytotoxicity of cyclodepsipeptides on murine lymphocytes and on L 1210 leukemia cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 37: 184–185.

Nagesh, M., Hussaini, S., Ramanujam, B., Rangeswaran, R. (2007). Molecular identification, characterization, variability and infectivity of Indian isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chalmydosporia*. *Nematologia Mediterranea*, 35: 47-56.

Newman, D. J., Cragg, G. M. (2010). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75: 311–335.

Nicoletti, R., Manzo, E., Ciavatta, M. L. (2009). Occurrence and bioactivities of funicone-related compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 1430-1444.

Nicoletti, R., De Filippis, A., Buommino, E. (2013). Antagonistic aptitude and antiproliferative properties on tumor cells of fungal endophytes from the Astroni Nature Reserve, Italy. *African Journal of Microbiology Research*, 31: 4073-4083.

Ochi, K., Hosaka, T. (2013). New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 87-98.

Odier, F., Vago, P., Quiot, J. M., Devauchelle, G., Bureau, J. P. (1987). Cytometric study of the effects of destruxin E on mouse leukemia cells. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 305: 575–578.

Oh, D. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. (2007). Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. *Journal of Natural Products*, 70: 515–520.

Ola, A. R. B., Thomy, D., Lai, D., Brötz-Oesterhelt, H., Proksch, P. (2013). Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through co-culture with *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, 11: 2094–2099.

Omkar, (2016). *Ecofriendly Pest Management for Food Security*. 1 edizione. Academic Press, New York, USA, pp 762.

- Owuama, C. I.** (2001). Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 505-515.
- Ownley, B. H., Gwinn, K. J. Vega, F. E.** (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55: 113–128.
- Park, J. O., Hargreaves, J. R., McConville, E. J., Stirling, G. R., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K.** (2004). Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 271-276.
- Poprawski, T. J., Robert, P. H., Maniania, N. K.** (1994). Contact toxicity of the mycotoxin destruxin E to *Empoasca vitis*. *Journal of Applied Entomology*, 117: 135–143.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., Pócsi, I.** (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6: 573.
- Quang, D. N., Hashimoto, T., Nomura, Y., Wolleweber, H., Hellwing, V., Fournier, J., Stadler, M., Asakawa, Y.** (2005). Cohaerins A and B, azaphilones from the fungus *Hypoxyton cohaerens*, and comparison of HPLC-based metabolite profiles in *Hypoxyton* sect. *Annulata*. *Phytochemistry*, 66: 797-809.
- Rahbæk, L., Sperry, S., Piper, J. E., Crews, P.** (1998). Deoxynortrichoharzin, a new polyketide from the saltwater culture of a spongederived *Paecilomyces* fungus. *Journal of Natural Products*, 61: 1571–1573.
- Requena, N., Perez-Solis, E., Azcón-Aguilar, C., Jeffries, P., Barea, J. M.** (2001). Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 495–498.
- Rietz, D. N., Haynes, R. J.** (2003). Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 845-854.

Romano, N., Lignola, G. P., Brigante, M., Bosso, L., Chirico, G. B. (2016). Residual life and degradation assessment of wood elements used in soil bioengineering structures for slope protection. *Ecological Engineering*, 90: 498-509.

Ruiz-Lozano, J. M., Porcel, R., Aroca, R. (2006). Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal fungi plants to water deficit involve modulation of drought induced plant genes *New Phytologist*, 171: 693-698.

Rusman, Y. (2006). Isolation of new secondary metabolites from sponge-associated and plant-derived endophytic fungi. Doctoral dissertation, Göttingen, Germany, pp 303.

Samuels, R. I., Reynolds, S. E., Charnley, A. K. (1988). Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90: 403–412.

Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaino, J., Llobell, A., Hermosa, R., Monte, E. (2004). Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Current Genetics*, 46: 277–86.

Scherlach, K., Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 7: 1753-1760.

Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H. W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C., Brakhage, A. A. (2009). Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106: 14558-63.

Senthil-Nathan, S. (2005). A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. *Environmental Sustainability*, doi:10.1007/978-81-322-2056-53.

Shang, Y., Feng, P., Wang, C. (2015). Fungi that infect insects: altering host behavior and beyond. *PLOS Pathology*, 11: e1005037.

- Siddiqui**, Z. A., Mahmood, I. (1996). Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. *Bioresource Technology*, 58: 229-239.
- Soledade**, M., Pedras, C., Zaharia, L. I., Ward, D. E. (2002). The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59: 579–596.
- Sree**, K. S., Padmaja, V., Murthy, Y. L. N. (2008). Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. *Pest Management Science*, 64: 119-125.
- Strand**, M. R., Obrycki, J. J. (1996). *Host Specificity of Insect Parasitoids and Predators*. Oxford University Press, doi: 10.2307/1312876.
- Thakore**, Y. (2006) The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2: 194-208.
- Vega**, F., Meyling, N., Luangsa-Ard, J., Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. In *Insect Pathology*, 171–220.
- Villaverde**, J. J., Sevilla-Morán, B., Sandín-España, P., López-Goti, C., Alonso-Prados, J. L. (2014). Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest management science*, 70: 2-5.
- Vinale**, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interaction. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1-10.
- Vinale**, F., Flematti, G., Sivasithamparam, Lorito, M., Marra, R., Skelton, B. W. K., Ghisalberti, E. L. (2009). Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 72: 2032-2035.
- Vinale**, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S. L., Lorito, M. (2012). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Natural Product Communications*, 7: 1545-1550.

Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S. L., Lorito, M. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters, doi:10.1111/1574-6968.12231.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., Lorito, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. Open Mycology Journal, 8: 127-139.

Vinale, F., Borrelli, F., Mangoni, A., Parisi, O. A., Marra, R., Lombardi, N., Lacatena, F., Grauso, L., Finizio, Lorito, M., Woo, S. L. (2017). Co-culture of plant beneficial microbes as source of bioactive metabolites. Scientific Reports, in stampa.

Wang, C. (2009). Activation of cryptic polyketide synthase pathways in *Aspergillus nidulans*: Discovery of the asperfuranone gene cluster. The American Chemical Society, 238: 290.

Wang, Q., Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. Molecules, 17: 2367-2377.

Wang, B., Kang, Q. J., Lu, Y. Z., Bai, L. Q., Wang, C. S. (2012). Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 109: 1287–1292.

Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Lorito, M. (2014). *Trichoderma*- based products and their widespread use in agriculture. The Open Mycology Journal, 8: 1.

Wong, K. C. (2014). Review of NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry. Journal of Chemical Education, 91: 1103-1104.

Xiao, G., Ying, S. H., Zheng, P., Wang, Z. L., Zhang, S., Xie, X. Q., Shang, Y., St. Leger, R. J., Zhao, G. P., Wang, C., Feng, M. G. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Scientific Reports 2, 483, doi:10.1038/srep00483.

Xu, Y., Orzoco, R., Wijeratne, E. M., Gunatilaka, A. A., Stock, S. P., Molnàr, I. (2008). Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chemistry Biology*, 15: 898-907.

Xue, C. Y., Hsueh, Y. P., Heitman, J. (2008). Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *FEMS Microbiology Review*, 32: 1010–32.

Yao, L., Zhu, L. P., Xu, X. Y., Tan, L. L., Sadilek, M., Fan, H., Hu, B., Shen, X. T., Yang, J., Qiao, B., Yang, S. (2016). Discovery of novel xylosides in co-culture of basidiomycetes *Trametes versicolor* and *Ganoderma applanatum* by integrated metabolomics and bioinformatics. *Scientific Reports*, 6: 33237.

Yilmaz, N., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Samson, R. A. (2014). Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies on Mycology*, 78: 175-341.

Young, S.L. (2017). A systematic review of the literature reveals trends and gaps in integrated pest management studies conducted in the United States. *Pest Management Science*, 73:1553-1558.

Zhang, D., Zhao, L., Wang, L., Fang, X., Zhao, J., Wang, X., Li, L., Liu, H., Wei, Y., You, X., Cen, S., Yu, L. (2017). Griseofulvin derivative and indole alkaloids from *Penicillium griseofulvum* CICC 400528. *Journal of Natural Products*, 80: 371-376.

9. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio di cuore i miei supervisor ed i ricercatori, il prof. Lorito, la prof. ssa Woo, il prof. Vinale, la Dott.ssa Marra e la Dott.ssa Lombardi, che mi hanno supportata e trasmesso tutte le conoscenze scientifiche, tecniche e di ricerca di cui ho avuto bisogno, che hanno sempre assecondato ogni mia volontà e che mi hanno, con molta pazienza, aiutata soprattutto in questa ultima fase del progetto, che si è rivelata per me più stancante del previsto per ovvie condizioni fisiche limitanti dovute alla gravidanza in corso. Grazie a loro sono riuscita a raggiungere questo traguardo tanto desiderato e atteso. Ringrazio la prof.ssa Digilio ed il Dott. Giorgini per l'essenziale supporto fornitomi e per le conoscenze entomologiche che mi hanno trasmesso. Un grazie particolare va ai ragazzi, docenti e ricercatori del CERMANU del Dipartimento di Agraria di Portici, in particolare al Prof. Piccolo ed al Dott. Mazzei che si sono occupati di svolgere tutte le analisi NMR. Ringrazio Luciano, mio compagno di vita, che ha sempre trasformato ogni momento difficile in una spinta in più verso il raggiungimento dell'obiettivo finale e mi ha aiutata attivamente nella realizzazione del progetto trasmettendomi competenze scientifiche e di ricerca da lui acquisite negli anni. Ringrazio tutti i miei colleghi dell'Edificio L del Dipartimento di Agraria di Portici (NA), che hanno sempre riservato per me una parola di conforto e un aiuto valido e competente per ogni necessità, sia scientifica e tecnica che morale. Ringrazio i miei docenti ed il coordinatore del corso, il prof. D'Urso, che mi hanno trasmesso nozioni necessarie alla buona riuscita del mio percorso formativo. Grazie infine a Leonardo, mio figlio, per essere stato il feto più tranquillo e paziente del mondo durante tutta la fase di stesura della tesi!