

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

DIPARTIMENTO DI AGRARIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE AGRARIE E AGROALIMENTARI

XXX° CICLO

TESI DI DOTTORATO

**BIO-FORMULATI A BASE DI MICRORGANISMI BENEFICI
O LORO METABOLITI PER IL MIGLIORAMENTO DELLE
PRODUZIONI OLIVICOLE**

Relatore:

Ch.mo Prof. Matteo Lorito

Ch.ma Prof.ssa Sheridan Lois Woo

Correlatore

Dott. Francesco Vinale

Candidato:

Marica Pascale

Coordinatore

Giudo D'Urso

Indice

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Premessa	1
1.2. Lotta biologica.....	2
1.2.1. Contenimento della popolazione del patogeno.....	3
1.2.2. Risposte di difesa nella pianta ospite.....	4
1.2.2.1. Resistenza acquisita sistemica (SAR) e resistenza sistemica indotta (ISR).....	6
1.3. Microrganismi benefici e loro meccanismi di azione	7
1.3.1. <i>Trichoderma</i> spp.....	11
1.3.2. Metaboliti secondari di <i>Trichoderma</i> spp.....	12
1.4. Biopolimeri in agricoltura.....	15
1.4.1. Biopolimeri a base di galattomannani	16
1.5. Olivo	17
1.5.1. Olivicoltura in Italia.....	18
1.5.2 Principali patologie dell'olivo	20
1.5.3. Principali sostanze naturali dell'olivo	22
1.5.1.1. Struttura e caratteristiche dei principali composti fenolici dell'olivo.....	23
1.5.1.2. Effetti benefici dei composti fenolici per il consumatore	28
1.5.1.3. Il ruolo dei fenoli nello sviluppo e nella difesa della pianta	28
1.6. Scopo del lavoro	30
2. MATERIALI E METODI	31
2.1. Ceppi fungini e metaboliti bioattivi	31
2.2. Applicazione dei ceppi selezionati e dei metaboliti bioattivi	32
2.2.1. Materiale vegetale	32
2.2.2. Disegno sperimentale	33
2.2.3. Trattamenti in campo con ceppi di <i>Trichoderma</i> sp. e metaboliti secondari.....	34

2.3. Applicazione del biopolimero a base di galattomannani	35
2.3.1. Valutazione dei sintomi provocati da <i>Fusicladium oleagineum</i>	36
2.3.2. Microscopia a scansione elettronica	36
2.4. Metabolomica di piante di olivo trattate con ceppi microbici benefici o loro metaboliti	37
2.4.2. Analisi dei composti polifenolici mediante sistema LC-MS Q-TOF	38
2.4.3. Elaborazione dei dati	40
2.5. Analisi statistica.....	44
3. RISULTATI	45
3.1. Effetto dei trattamenti sulla crescita vegetativa e sulla produzione di piante di olivo.....	45
3.2. Contenimento delle sintomatologie da <i>Fusicladium oleagineum</i>	47
3.3. Analisi dei profili cromatografici dei composti fenolici estratti da foglie	51
3.3.1. Analisi metabolomica dei composti fenolici estratti dalle foglie di olivo	55
3.3.2. Metabolomica <i>untargeted</i>	55
3.3.3. Analisi metabolomica <i>targeted</i>	60
3.3.4. Analisi dei profili metabolici dei composti fenolici estratti dalle drupe.....	65
4. DISCUSSIONE.....	69
5. BIBLIOGRAFIA.....	76

1. INTRODUZIONE

1.1. Premessa

I prodotti fitosanitari consentono di ottenere raccolti più abbondanti ed alimenti a minor costo, con produzioni maggiormente svincolate dalla stagionalità. L'impiego in agricoltura dei prodotti fitosanitari utili per la difesa delle colture interessa vari settori e pone questioni importanti sia dal punto di vista ambientale che da un punto di vista della salute dell'uomo.

La Comunità Europea disciplina l'utilizzo dei prodotti fitosanitari con la Direttiva 91/414/CEE (https://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/normativa/Direttiva_91-414-CEE_xsenza_allegatix.pdf), la quale stabilisce le regole per l'autorizzazione dei prodotti fitosanitari, prevedendo una rigorosa valutazione del rischio prima dell'immissione sul mercato e dell'uso di tali prodotti. Oltre a regolare l'immissione in commercio, la normativa prende in considerazione anche la fase finale del ciclo di vita dei pesticidi, stabilendo quali siano i livelli massimi di residui di tali prodotti negli alimenti (Regolamento 396/2005/CE, <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R0396:20100729:IT:PDF>). In Italia, la produzione e l'uso dei prodotti fitosanitari deve essere approvato mediante Decreto dal Ministero della Salute in seguito al lavoro di una Commissione di Esperti chiamata a valutare l'utilità dei prodotti e la loro sicurezza per le colture e l'ambiente.

La Direttiva Europea 2009/128/CE (https://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/normativa/direttivaCE_2009_128.pdf), ha delineato un quadro normativo "ai fini dell'utilizzo sostenibile dei prodotti fitosanitari", per ridurre i rischi e gli impatti sulla salute umana e l'ambiente, promuovendo la gestione integrata delle specie nocive (*Integrated Pest Management*). Uno degli approcci prevede l'utilizzo di agenti di controllo biologico e dei loro prodotti come alternativa agli agro-chimici. L'impiego di antagonisti per controllare microrganismi fitopatogeni, nematodi ed erbe infestanti è cominciato oltre cinquanta anni fa. Oggi sono disponibili una varietà di formulati a base di funghi o batteri antagonisti o metaboliti secondari utilizzabili come biofitofarmaci.

Diversi sono i vantaggi dell'utilizzo dei bioformulati:

- I. riducono i contaminanti chimici sia nelle derrate alimentari che nell'ambiente;
- II. limitano l'impoverimento del terreno in termini di microflora e sostanza organica;

III. non rilasciano residui tossici o dannosi per gli operatori e i consumatori;

IV. sono economicamente vantaggiosi.

L'introduzione di tecnologie sempre più avanzate e rispettose dell'ambiente ha consentito di ridurre le dosi d'impiego dei prodotti fitosanitari, tanto che nel periodo 1990-2013 si è registrato un calo del 32,6% nel consumo nazionale che è passato dalle 141.200 tonnellate nel 1990 alle 95.155 tonnellate nel 2013.

Per evidenziare la tendenza alla riduzione dell'uso dei prodotti fitosanitari nel 2013 rispetto al 2012 qui di seguito si riportano i dati pubblicati dall'ISTAT (<https://www.istat.it/it/archivio/145664>):

- fungicidi -14,6%,
- insetticidi e acaricidi -15,0%,
- erbicidi -3,1%
- vari -9,6%.

Dal 2012 al 2013 la quantità di principi attivi contenuti nei prodotti fitosanitari è diminuita complessivamente di 39 mila tonnellate (-41,3%). Per quanto riguarda i principi attivi, sono soprattutto i fungicidi e gli erbicidi ad aver determinato la consistente diminuzione registrata negli ultimi 20 anni, essendo di fatto le famiglie più interessate dall'introduzione di molecole innovative a bassi dosaggi d'impiego (https://www.istat.it/it/files//2013/10/Report_distribuzione_fitosanitari.pdf).

In tutto il mondo, sono venduti circa 1400 biopesticidi. Sono in commercio 68 sostanze attive per biopesticidi registrati in UE e 202 negli Stati Uniti (Chandler et al., 2011).

La tendenza alla diminuzione è in linea con le indicazioni espresse dalle politiche agroambientali comunitarie e nazionali, che mirano al minore utilizzo di mezzi tecnici chimici nelle coltivazioni agricole. In forte crescita sono risultati i prodotti di origine biologica, passati da 11,9 a 289,9 tonnellate (2002/2013). La diffusione dei prodotti a certificazione biologica rappresenta il segmento più innovativo della distribuzione, dovuto alla sempre maggiore richiesta sia da parte dei consumatori, sempre più attenti alla qualità degli alimenti, sia degli agricoltori, interessati a qualificare le proprie produzioni vegetali come prodotti di origine protetta, biologici ed integrati, anche se le quantità immesse al consumo risultano ancora di entità limitata.

1.2. Lotta biologica

Per biocontrollo o lotta biologica s'intende "l'impiego di qualsiasi entità biologica vivente, o derivata da organismi viventi, che riesca a contenere l'attività di un patogeno o di un parassita".

Inoltre, sono considerati nei programmi di lotta biologica anche gli interventi realizzati con metodi biologici per contrastare l'effetto di una malattia causata da agenti abiotici come freddo o siccità (Lorito e Cervone, 2004).

Gabriel e Cook (1991) individuano tre principali strategie per l'attuazione del controllo biologico:

- contenimento della popolazione del patogeno mediante interventi sul suolo o sull'ambiente;
- sfruttamento della resistenza della pianta ospite;
- applicazione di microrganismi antagonisti per escludere l'infezione.

1.2.1. Contenimento della popolazione del patogeno

Il suolo è naturalmente capace di limitare lo sviluppo di malattie fungine indotte da patogeni tellurici (Janvier et al., 2007). Tale capacità deriva dall'interazione complessa che si instaura tra suolo, pianta e patogeno, caratteristica questa che fa della rizosfera (porzione di suolo in cui le radici si sviluppano ed interagiscono con i microrganismi tellurici) un ambiente particolarmente ostile allo sviluppo di malattie.

In letteratura, sono riportate diversi esempi di contenimento di patogeni terricoli quali *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Aphanomyces euteiches*, *Thielaviopsis basicola*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium splendens*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces scabies* e *Plasmodiophora brassicae* (Hoitink e Boehm, 1999; Weller et al., 2002; Bonanomi et al., 2007; Janvier et al., 2007).

La soppressività di un suolo dipende sia da componenti abiotiche, quali la struttura e la composizione chimico-fisica del suolo, che da quelle biotiche. Queste ultime sono determinate dalla competizione tra i diversi microrganismi che popolano il terreno e, soprattutto dalla presenza di microrganismi antagonisti noti per la loro azione di biocontrollo. Tra questi ricordiamo i funghi appartenenti ai generi *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporidesmium* e i batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces*.

La presenza di tali organismi svolge un ruolo chiave nella soppressività del suolo tanto che la loro eliminazione a seguito di pratiche quali la sterilizzazione del suolo causa la perdita della capacità di contenimento dei patogeni. La potenziale soppressività dei suoli è dimostrata dalla maggiore aggressività dei patogeni introdotti accidentalmente in terreni precedentemente sterilizzati e quindi privati di organismi antagonisti (Weller et al., 2002; Termorshuizen e Jeger, 2008). L'incidenza delle malattie è nettamente inferiore in quei suoli che non sono stati sottoposti a trattamenti di sterilizzazione, poiché tale pratica può limitare le attività biologiche intrinseche in un suolo riducendone la naturale biodiversità. Per tale ragione è importante precisare che il contenimento è

imputabile non ad un singolo microrganismo ma ad un consorzio di questi (Baker e Cook, 1974). Inoltre, il contenimento degli organismi patogeni può essere conseguito attuando altre strategie di lotta a basso impatto ambientale quali ad esempio la solarizzazione, la rotazione colturale e l'impiego di ammendanti organici (Agrios, 2005).

1.2.2. Risposte di difesa nella pianta ospite

Le piante sono costantemente minacciate da parassiti e microrganismi potenzialmente patogeni quali batteri, funghi, virus, nematodi, insetti ed acari. Al fine di minimizzare o bloccare l'insorgenza di patologie provocate da tali organismi le piante hanno sviluppato complessi meccanismi di difesa utili a tollerare o bloccare l'agente eziologico.

La risposta immunitaria delle piante ha inizio per mezzo del riconoscimento di molecole esogene quali chitina, flagellina, glicoproteine o lipopolisaccaridi note come PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) o MAMPs (Microbe-associated molecular patterns) oppure prodotte dalla pianta stessa a seguito di danni provocati dall'infezione di un patogeno. In questo caso si parla di DAMPs (Damage-associated molecular patterns). La percezione di queste molecole da parte di specifici recettori di membrana detti PRRs (Plant-pattern recognition receptors) determina l'instaurarsi nella pianta di una risposta di difesa nota come PTI/MTI (PAMP/MAMP-triggered immunity) che costituisce la prima linea di resistenza contro il patogeno.

Diversi patogeni riescono a superare questa prima linea difensiva producendo molecole effettrici, codificate dai geni *avr* (avirulence genes) che inibiscono la detezione dei PAMPs da parte della pianta ospite o interferendo con i meccanismi di segnalazione innescati dal PTI, riportandola quindi al di sotto della soglia di resistenza efficace. La condizione di suscettibilità in cui si trova la pianta a causa degli effettori è detta ETS (Effector-triggered susceptibility) (Jones e Dangl, 2006).

Tuttavia alcuni degli effettori prodotti dai patogeni sono riconosciuti in maniera specifica da una particolare classe di proteine di resistenza (R) della pianta note come NB-LRR e costituite da domini di unione a nucleotidi (NB: nucleotide binding) e da altri caratterizzati dalla ripetizione di leucine (LRR: leucine rich repeat). Quando avviene questo riconoscimento specifico la pianta si trova in una condizione di immunità innescata dagli effettori denominata ETI (Effector-triggered immunity). Questa risposta di difesa è molto più intensa di quella innescata dai MAMPs ed è spesso associata alla Risposta Ipersensibile (Hypersensitive Response) caratterizzata da morte cellulare programmata circoscritta alla zona di invasione del patogeno.

A loro volta i patogeni hanno la capacità di eludere l'ETI mediante mutazioni dei geni avr che danno luogo a versioni modificate degli effettori, i quali non vengono efficacemente riconosciuti dalle proteine di resistenza determinando una riduzione dell'intensità dell'ETI, e riportando la pianta nella condizione di suscettibilità, al di sotto della soglia della resistenza efficace.

L'intero processo descritto può essere ricondotto ad un modello cosiddetto a "zig-zag" schematizzato nella Figura 1 (Jones e Dangl, 2006).

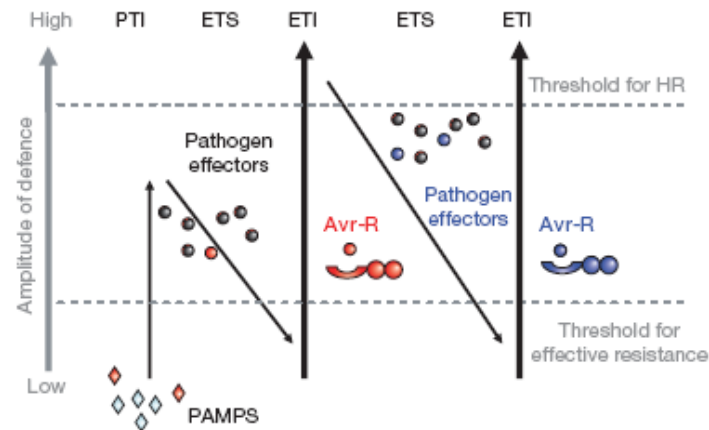


Figura 1. Sistema immunitario della pianta: modello a zigzag. Nella fase 1 la pianta riconosce i pattern molecolari associati al microrganismo o patogeno (MAMPs/PAMPs, rombo rosso) per innescare la MAMP/PAMPs-triggered immunity (MTI/PTI). Nella fase 2 i patogeni virulenti rilasciano gli effettori che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

La pianta difende sé stessa attraverso due principali meccanismi: I) barriere fisiche che inibiscono l'ingresso del patogeno e la sua diffusione all'interno della pianta; II) reazioni biochimiche nella cellula e nei tessuti della pianta che produce sostanze tossiche per il patogeno, o crea le condizioni per l'inibizione del patogeno.

La tolleranza è intesa come la capacità della pianta di sopportare la malattia, senza comprometterne la crescita e lo sviluppo. Invece si definisce resistenza la capacità della pianta di contrastare efficacemente il patogeno o il parassita (Dangl e Jones, 2001).

I meccanismi che determinano la resistenza possono essere di natura meccanica e biochimica e possono essere pre-esistenti all'infezione o indotti dal processo infettivo (Jones e Dangl, 2006).

La resistenza meccanica pre-infezionale è legata alla presenza nella pianta di strutture morfologiche (ad esempio spessore della cuticola e delle pareti cellulari, contenuto in cera, presenza di tricomi, etc.) capaci di contrastare l'adesione, la penetrazione o la colonizzazione dei tessuti vegetali da parte del patogeno. Le difese di natura biochimica pre-infezionali comprendono il rilascio di essudati fungitossici e di sostanze ad attività antifungina. Tra questi ricordiamo i prodotti del

metabolismo secondario come i composti fenolici, i glucosidi, i solforati, i lattoni insaturi ed i glucosinolati.

La resistenza post-infezionale è caratterizzata dalla risposta della pianta a seguito dell'infezione. Tali difese possono essere di tipo meccanico (modificazioni morfologiche e strutturali) o biochimiche (secrezione di fenoli, fitoalessine, sesquiterpeni, specie reattive dell'ossigeno – ROS -, proteine correlate alla patogenesi – PR -, ecc).

Una caratteristica comune della resistenza alle malattie è la risposta ipersensibile (HR) nel sito di infezione, caratterizzata da una locale apoptosi cellulare al fine di bloccare la diffusione del patogeno. Tale difesa nasce dall'interazione tra la resistenza di tipo meccanico e quella biochimica post-infezionale. Infatti, a seguito della risposta meccanica, il tessuto distale sviluppa una resistenza sistemica acquisita (SAR) nei confronti di successive infezioni da parte dello stesso o di altri patogeni. Questa immunità è il risultato della trascrizione di numerosi geni e dalla successiva attivazione di pathway metabolici di sintesi (Jones e Dangl, 2006). La SAR si verifica anche a seguito di disordini fisiologici, lesioni, o trattamenti con agenti chimici (Harms, 1992).

1.2.2.1. Resistenza acquisita sistemica (SAR) e resistenza sistemica indotta (ISR)

Il rilascio di sostanze non presenti prima dell'infezione, come ad esempio i fenoli, le fitoalessine, i sesquiterpeni, i ROS (reactive oxygen species), le PR (Pathogenesis Related) proteins, provoca una serie di reazioni che sfociano nella difesa biochimica post-infezionale. In particolare, i ROS possono distruggere le membrane cellulari producendo perossidi lipidici e, nello stesso tempo, favorire reazioni che rafforzano le pareti cellulari. Queste molecole hanno un ruolo diretto nei confronti dei patogeni o indiretto nella attivazione della reazione di ipersensibilità (HR) e della ISR (induced systemic resistance). La HR è associata alla resistenza indotta localizzata (LAR) o sistemica (SAR), che possono verificarsi non solo quando la pianta è soggetta a infezioni ma anche in seguito a lesioni, trattamenti con agenti chimici quali acido salicilico, ossalato, acidi grassi insaturi o spermidina (Harms, 1992).

Le PR proteins si accumulano sia a livello intracellulare che negli spazi intercellulari in risposta ad un patogeno o a stress abiotici, e sono coinvolte nella ISR; esse comprendono enzimi (glucanasi, proteasi, perossidasi) o inibitori di proteasi, proteine ricche in glicina o cisteina, osmotine e taumatine. Molte di esse hanno spiccata attività antimicrobica ad azione sinergica. L'espressione transgenica costitutiva di una o più PR proteins comporta difatti un aumento della resistenza in pianta (Guido et al., 1995). In genere, la loro espressione è indotta da elicitivi quali acido salicilico, etilene, acido jasmonico ed è associata all'espressione di geni di resistenza. Nell'ambito di questa

famiglia di proteine risultano essere particolarmente interessanti le chitinasi e le glucanasi, enzimi che catalizzano rispettivamente l'idrolisi della chitina e dei β -glucani, che sono i principali costituenti della parete della maggior parte dei funghi fitopatogeni. Si ritiene che questi enzimi siano responsabili della lisi dell'apice ifale, con conseguente inibizione della crescita fungina, e del rilascio di sostanze che stimolano le risposte di difesa della pianta (Sahai e Manocha, 1993).

1.3. Microrganismi benefici e loro meccanismi di azione

Nella rizosfera, i microrganismi benefici svolgono i più svariati ruoli. Essi sono infatti coinvolti nel ciclo dei nutrienti e nei processi di decomposizione della materia organica; inoltre, sono in grado di rimuovere sostanze tossiche dal suolo e di sopprimere le malattie causate da patogeni terricoli. Infine, molti di essi sono anche capaci di stimolare la crescita delle piante (Kubicek and Harman, 1998).

I microrganismi maggiormente studiati ed applicati sono riportati di seguito.

- **Bacilli:** sono batteri (*Bacillus* spp.) ubiquitari capaci di produrre metaboliti secondari dotati di attività antibiotica contro diversi patogeni (Whipps, 2001). Le specie maggiormente note ed impiegate in lotta biologica per la loro abilità di produrre antibiotici (polimixina, difficidina, subtilisina, ecc.) attivi contro batteri e funghi ed anche come promotori di crescita, sono *B. subtilis*, *B. mycoides* e *B. cereus*. (Kloepper et al., 2004; Stein, 2005; Bargabus et al., 2002).
- **Attinomiceti:** sono batteri gram-positivi noti per la loro capacità di produrre metaboliti secondari biologicamente attivi ad attività antibatterica (attinomicina, streptomina, tetraciclina, kanamicina) ed antifungina (candicina e nistatina) (Hornby, 1990). Inoltre, producono sostanze che possono inibire o promuovere la crescita di altri microrganismi, come vitamine, siderofori ed ormoni. Quando colonizzano la rizosfera possono comportarsi sia da antagonisti nei confronti di altri microrganismi presenti, sia da promotori della crescita delle piante. Gli essudati radicali inducono la crescita di attinomiceti antagonisti di patogeni fungini. A loro volta questi attinomiceti producono sostanze antimicrobiche che probabilmente agiscono contro i competitori biologici presenti nel suolo e proteggono la pianta da potenziali patogeni. La maggior parte di questi composti è prodotta da varie specie del genere *Streptomyces*. (Bressan, 2003; El-Tarabily et al., 2009; Doumbou et al., 2001).
- **Pseudomonadi:** sono batteri afferenti al genere *Pseudomonas* noti per la loro azione antagonista nei confronti di fitopatogeni dovuta alla produzione di antibiotici (Bloem et al., 2005) e la capacità di indurre nella pianta una risposta di resistenza alle malattie. Per tali batteri è stata

dimostrata anche la loro capacità di colonizzare la rizosfera e di stimolare la crescita delle piante e per questo chiamati batteri rizogeni PGP (*Plant Growth Promoting*) (Kloepper et al., 1980). Le specie più impiegate nelle strategie di lotta contro batteri e funghi fitopatogeni sono *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* e *P. syringae* (Haas and Défago, 2005; Agaras et al., 2015).

- **Agrobatteri:** al genere *Agrobacterium* appartengono sia forme patogene, come *A. tumefaciens* (agente causale del tumore batterico, malattia che provoca seri problemi, soprattutto nei vivai poiché rende non commerciabili le piantine), che forme benefiche come *A. radiobacter* (ceppo K84, produttore di agrocina 84, antibiotico specifico per i ceppi patogeni di *A. tumefaciens*).
- **Funghi rizosferici:** tali funghi si caratterizzano per la capacità di instaurare interazioni neutre, negative o positive con le piante e con gli altri microrganismi. Le associazioni negative sono attuate dai funghi fitopatogeni che, attaccando la pianta, causano gravi perdite di produzione (Agrios, 1997).
 - **Funghi micorrizici:** gli apparati radicali di molte piante sono infettati da funghi simbiotici, capaci di interagire beneficamente con la pianta ospite. Le associazioni simbiotiche tra i funghi del terreno e le radici di molte specie di piante vengono denominate micorrize (Jennings e Lysek, 1996). Da questa simbiosi traggono beneficio sia le piante, con un miglioramento dell'assorbimento di Sali dal terreno, sia i funghi, assorbendo dalle radici della pianta i composti del carbonio sintetizzati con la fotosintesi da quest'ultima. Le micorrize arbuscolari sono molto diffuse in natura ed instaurano simbiosi con piante economicamente importanti (molte graminacee, leguminose, piante da frutto e da legno). Questa simbiosi comporta importanti conseguenze per l'agricoltura e per gli ecosistemi naturali (Dechamplain e Gosselin, 2002). Esistono due tipi di micorrize, le ectomicorrize e le endomicorrize, che si distinguono per il diverso meccanismo di colonizzazione dei tessuti radicali della pianta ospite. Le ectomicorrize sono caratterizzate dalla presenza di aggregati di ife che circondano e ricoprono come una guaina la superficie esterna delle radici. Alcune ife penetrano all'interno delle cellule della radice, rimanendo sempre nell'apoplasto, dove possono colonizzare l'epidermide e in alcuni casi lo strato delle cellule corticali dove avviene lo scambio di metaboliti. Nelle radici di piante endomicorrizzate, all'interno delle cellule corticali, le ife del fungo possono formare particolari strutture di assorbimento simili ad austori e minutamente ramificate dette arbuscoli, o dei rigonfiamenti terminali, chiamati vescicole, che hanno funzione di stoccaggio di nutrienti. Le endomicorrize che formano un solo tipo di struttura sono chiamate micorrize arbuscolari (AM) nel caso abbiano solo

arbuscoli, e micorrize vescicolari (VM) nel caso in cui formino vescicole. I benefici per la pianta sono correlati all' promozione della crescita vegetale ed una migliore tolleranza agli stress idrici (Boyd et al., 1986), ad una maggiore mobilitazione ed assorbimento di nutrienti (Hahn and Mendgen, 2001) ed alla modifica dell'interazione pianta-patogeno, che influenza negativamente la colonizzazione della radice da parte di microrganismi patogeni terricoli come nematodi, funghi e batteri fitopatogeni (Harley and Smith, 1983). Questo benefico effetto di protezione dai patogeni terricoli può essere dato dall'alterazione degli essudati radicali (Linderman, 1988), o da un effetto di mascheramento dovuto alla crescita del micelio che crea una barriera fisica attorno alla radice.

I microrganismi antagonisti possono contenere od ostacolare lo sviluppo di patogeni attraverso diversi meccanismi di azione quali la competizione per i nutrienti, il parassitismo e l'antibiosi. La competizione per i nutrienti avviene quanto le specie che condividono la stessa nicchia ecologica e le stesse esigenze fisiologiche si trovano in condizioni limitanti in termini di risorse trofiche. Un esempio di competizione per le risorse è dato dalla precoce colonizzazione dei tessuti vegetali da parte di un fungo antagonista a discapito di un fungo patogeno. Tale fenomeno è favorito dalla capacità degli agenti di bio-controllo di resistere allo stress ossidativo che si verifica in seguito al danneggiamento del tessuto (Castoria et al., 2003).

Un importante esempio di competizione per i nutrienti è fornito da alcuni antagonisti, in grado di sequestrare il ferro presente nel terreno anche in condizioni estreme, come per esempio a bassi valori di pH, rendendolo indisponibile per gli altri microrganismi. Ciò avviene grazie alla dotazione di un sistema di assimilazione del ferro altamente efficiente, basato sulla produzione di siderofori (molecole con un sito di legame selettivo per il ferro) e sul trasporto all'interno della cellula mediante una proteina di trasporto (carrier) specifica (Renshaw et al., 2002). La competizione per carbonio, azoto, e ferro, sembra essere alla base del biocontrollo di *Fusarium* spp. da parte di alcuni isolati di *Trichoderma* spp. e ceppi non patogeni di *Fusarium* spp. (Mandeele e Baker, 1991; Couteaudier, 1992).

Il parassitismo è una tipologia di associazione durante la quale l'antagonista trae vantaggio dalla presenza del patogeno, vivendo a sue spese. Gli antagonisti fungini micoparassiti sono distinguibili in biotrofi e necrotrofi. I biotrofi si nutrono delle cellule vive dell'ospite, penetrando in esse tramite apposite strutture (austori); i necrotrofi si nutrono delle cellule dell'ospite solo dopo averle uccise (Kendrick, 1992). In entrambi i casi, l'azione parassitaria esercitata dall'antagonista determina una efficace riduzione della densità d'inoculo del patogeno. Il meccanismo d'azione è regolato dalla

costante secrezione, da parte dell'antagonista, di enzimi litici, quali proteasi, chitinasi e glucanasi, che degradano la parete cellulare del patogeno.

I BCAs (*Biological Control Agents*) possono indurre anche un forte cambiamento nella fisiologia della pianta ospite ciò si traduce nell'aumento della capacità di difesa nei confronti dei patogeni e, quindi, nella riduzione dell'incidenza e della gravità delle malattie (Vinale et al., 2008; Van Wees et al., 2008). Alcuni BCAs modulano i meccanismi di difesa delle piante, inducendo l'attivazione della risposta ipersensibile (*Hypersensible response*, HR) e della resistenza sistemica indotta (*Induced Systemic Resistance*, ISR). Diverse piante, a seguito della continua minaccia da parte dei microrganismi patogeni hanno sviluppato costitutivamente un sistema di difesa in grado di prevenire l'invasione e/o l'attacco dei loro tessuti (Harman et al., 2004). L'attivazione della HR nella zona di infezione, caratterizzata dalla formazione di aree necrotiche e dalla conseguente riduzione della crescita e dello sviluppo dei patogeni biotrofi, rappresenta una delle più importanti risposte della pianta all'invasione microbica. Una volta attivata la risposta localizzata nei siti d'infezione, si sviluppa la resistenza sistemica acquisita (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) nei confronti di successive infezioni da parte dello stesso o di altri patogeni (Kothari and Patel, 2004). Alla base di questo processo, sembrano esserci molecole segnale come l'acido salicilico o l'acido jasmonico, le quali, insieme con etilene e ossido di azoto, attivano una cascata di eventi biochimici che portano alla produzione di numerosi metaboliti e proteine, tra cui fenoli, specie reattive dell'ossigeno (ROS), fitoalessine, sesquiterpeni e proteine legate alla patogenesi (*Pathogenesis Related Protein*, PR Protein), con svariate funzioni biologiche (Harman et al., 2004). Una di queste è la capacità di inibire il patogeno. È stato dimostrato che la resistenza sistemica nelle piante può essere indotta anche in seguito alla colonizzazione delle radici da parte di microrganismi non fitopatogeni come i BCA (Walters e Daniell, 2007). In questo caso si parla di ISR ed alla base di tale fenomeno vi è il rilascio da parte degli antagonisti di molecole segnale (elicitori) in grado di generare nella pianta una cascata di eventi assimilabili a quelli descritti in precedenza. Per esempio, diversi studi attestano la capacità di *Trichoderma* spp. di produrre, nel corso dell'interazione con la pianta, differenti classi di metaboliti che agiscono da elicitori, ovvero da induttori di resistenza (Vinale et al., 2008). Tali molecole comprendono proteine con attività enzimatica (es. chitinasi, xylanasi), prodotti genici di avirulenza, metaboliti secondari e composti a basso peso molecolare rilasciati dalle pareti cellulari del fungo o della pianta in seguito all'azione degli enzimi di *Trichoderma* spp. (Vinale et al., 2008). Altri esempi di resistenza indotta da microrganismi antagonisti sono noti con riferimento a isolati fungini non patogeni di *Rhizoctonia* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp., *Fusarium* spp. (Hwang e Benson, 2003; Duijff et al., 1998; Chérif et al., 2002) e ad alcuni ceppi batterici dotati di competenza per la rizosfera (Van Loon et al., 1998). L'interazione

dei microrganismi antagonisti con la pianta non si limita solo all'attivazione di risposte di difesa, ma in alcuni casi determina anche una promozione della crescita della pianta. Ciò avviene attraverso l'aumento della biodisponibilità di nutrienti (es. azoto, fosforo, micronutrienti) e la produzione di sostanze di crescita (es. sintesi di fitormoni e sostanze fitormone-simili) (Berg e Smalla, 2009).

L'antibiosi consiste nella produzione e rilascio da parte di un microrganismo benefico di sostanze ad attività antimicrobica che inibiscono la crescita e proliferazione di microrganismi limitrofi o ne provocano la morte. L'antibiosi è il principale meccanismo di azione utilizzato da diversi agenti di biocontrollo (BCA) come *Pseudomonas fluorescens*, e diverse specie dei generi *Bacillus* e *Streptomyces*. Di particolare interesse sono i funghi appartenenti al genere *Trichoderma* per la loro capacità di produrre un'ampia varietà di metaboliti ad azione antimicrobica (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991; Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998). I metaboliti secondari prodotti di *Trichoderma* esplicano diverse caratteristiche utili sia alla promozione della crescita delle piante sia al contenimento dei patogeni per attività antimicrobica. L'acido harzianico ad esempio, ha mostrato notevoli effetti di promozione della crescita su piante di colza con attività dose dipendente (Vinale et al., 2009b). Inoltre, questo metabolita ha mostrato attività antimicrobica contro *Pythium irregulare*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* ed è in grado di legare con buona affinità metalli essenziali tra cui il ferro (Fe^{3+} , sideroforo), processo che potrebbe rappresentare uno dei meccanismi di solubilizzazione di questo metallo. Questa peculiarità può significativamente alterare la biodisponibilità di ferro nel suolo, favorendo l'assorbimento dello stesso da parte di altri microrganismi o della pianta ospite. Questi risultati suggeriscono un ruolo importante di questo composto nella regolazione della crescita delle piante e nei processi di competizione antagonismo contro agenti fitopatogeni (Vinale et al., 2013).

1.3.1. *Trichoderma* spp.

Il genere *Trichoderma* è costituito da diverse specie di funghi filamentosi afferenti alla divisione degli Ascomyceti. Tali microrganismi funigni sono ubiquitari e in grado di degradare sostanze tossiche e prodotti chimici quali idrocarburi, derivati clorofenolici, polisaccaridi e pesticidi xenobiotici. La maggior parte delle specie appartenenti al genere *Trichoderma*, presenta uno sviluppo rapido con produzione di una grande quantità di spore (verdi o bianche), formatesi da cellule conidiogene con ontogenesi fialidica. I conidiofori sono ramificati, a forma piramidale, settati e polinucleati. I conidi sono ovoidali, generalmente con parete liscia e possiedono un solo nucleo. *Trichoderma* presenta un elevato livello di diversità genetica che si estende dai biotipi

colonizzatori del suolo, con alto potenziale di biodegradazione, ai simbionti vegetali in grado di interagire con le piante ed altri microrganismi (Harman and Kubicek, 1998). L'azione antagonista esercitata da *Trichoderma* spp. nei confronti di patogeni terricoli risulta dalla combinazione di diversi meccanismi quali antibiosi (Benitez et al., 2004; Sempere e Santamarina, 2009; Mukherjee et al., 2009), competizione (Hermosa et al., 2013; Sempere e Santamarina, 2009; Vinale et al., 2006; Trabelsi e Mhamdi, 2013) e micoparassitismo (Benitez et al., 2004; Mukherjee et al., 2013).

Inoltre, alcuni ceppi di *Trichoderma* sono in grado di promuovere la crescita e lo sviluppo delle piante, di aumentarne la tolleranza a stress biotici ed abiotici, e di facilitare l'uptake di micronutrienti grazie alla produzione di sostanze chimiche capaci di aumentarne la biodisponibilità (Yedidia et al., 2001). Un'altra importante caratteristica di questi microrganismi antagonisti riguarda la loro capacità di interagire in modo sinergico con i funghi micorrizici e con i batteri PGPR (*Plant Growth Promoter Rhizobacteria*) (Calvet et al., 1989). Diversi ceppi di *Trichoderma* sono inoltre noti per l'abbondante sintesi di molecole biologicamente attive quali la gliovirina e gliotossina, α -pironi, terpeni, polichetidi, derivati isocianidici e composti appartenenti al gruppo dei peptaiboli (Vinale et al., 2008; Ruocco et al., 2015; Bisset, 1991; Sivasithamparam e Ghisalberti 1998).

Tutte queste caratteristiche ampliano le potenziali applicazioni dei prodotti a base di *Trichoderma* nel mercato agricolo e non solo come biofungicida contro i fitopatogeni, ma anche applicato come inoculo biologico che stimola la resistenza delle piante a stress biotici e/o abiotici, che migliora la crescita delle piante ed il rendimento, oltre a migliorare l'agro-ecosistema (Woo et al., 2014).

Le specie più utilizzate per il biocontrollo sono: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. polysporum*, *T. viride*, così come alcune specie che appartengono al genere *Gliocladium* (Woo et al., 2014).

1.3.2. Metaboliti secondari di *Trichoderma* spp.

I funghi producono numerose molecole non essenziali per le loro funzioni primarie, note come metaboliti secondari (Herbert, 1989). In particolare, le specie appartenenti al genere *Trichoderma* sono conosciute per la variegata produzione di metaboliti secondari biologicamente attivi (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991; Reino et al., 2008).

Il termine metaboliti secondari include un gruppo eterogeneo di composti naturali a basso peso molecolare (< 3000 Da), che intervengono nei più svariati processi, dalla interazione con altri organismi, all'approvvigionamento e al trasporto di oligoelementi (Demain e Fang, 2000).

Uno dei fattori che contribuisce agli effetti benefici su pianta dei microrganismi benefici appartenenti al genere *Trichoderma* è relazionabile alla produzione di metaboliti secondari. Queste sostanze naturali possono avere un effetto diretto inibendo la crescita e lo sviluppo degli agenti patogeni, ed un effetto indiretto incrementando i livelli di resistenza locale e sistemica in pianta. Inoltre, alcuni di questi composti sono in grado di favorire la crescita vegetale e di compensare i danni dei patogeni incrementando lo sviluppo di alcuni organi (es. radici). La produzione di metaboliti secondari da parte di *Trichoderma* spp. è ceppo-dipendente ed include sostanze antifungine appartenenti a diverse classi di composti. Tali composti sono stati classificati in tre principali categorie:

- Antibiotici volatili;
- Composti solubili in acqua;
- Peptaiboli: peptidi idrofobici caratterizzati dalla presenza di due amminoacidi non proteino-genici quali l'acido α -amminoisobutirrico (AIB) e l'isovalina (Iva), e da modificazioni sulle estremità N- e C-terminale.

In alcuni casi l'applicazione diretta dei metaboliti secondari purificati ha permesso di ottenere risultati simili a quelli ottenuti dall'impiego del corrispondente microrganismo produttore, sia in termini di biocontrollo che di promozione della crescita (Benitez et al., 2004; Vinale et al. 2008; Vinale et al. 2012).

Il 6-pentil- α -pirone (6PP) è stato uno dei primi metaboliti secondari prodotti da specie di *Trichoderma* ad essere stato isolato e caratterizzato (Collins e Halim, 1972; Cutler et al., 1986; Parker et al., 1997). Il 6PP (Fig. 2) è caratterizzato da un intenso aroma di cocco ed è comunemente purificato dal filtrato colturale di diverse specie di *Trichoderma*, tra cui *T. viride*, *T. atroviride*, *T. harzianum* e *T. koningii*. Esso possiede attività antimicotica *in vivo* ed *in vitro* nei confronti di diverse specie fitopatogene ed è stato appurato che la sua biosintesi si correla positivamente con la capacità di biocontrollo esercitata dal microbo produttore (Worasatit et al, 1994; Scarselletti et al., 1994; Vinale et al., 2014). È stata inoltre riportata la sua capacità di interferire con i processi di sviluppo di alcune piante in maniera dipendente dalla concentrazione (Cutler et al., 1986; Parker et al., 1997; Vinale et al, 2008). Pascale et al. (2017), inoltre, ha effettuato saggi *in vitro* dimostrando come l'acido harzianico ed il 6PP hanno effetti di promozione della crescita correlati alla dose di applicazione, anticipando l'epoca di germinazione ed incrementando l'elongazione del fusto. Precedentemente è stato dimostrato che il 6PP induce questi effetti su pianta agendo come una molecola auxino-simile od anche come induttore nella produzione di auxina. Solitamente ha una concentrazione ottimale di attività tra 10^{-5} e 10^{-6} M, al contrario ha un effetto inibitorio a concentrazioni più elevate (10^{-2} e 10^{-3} M).

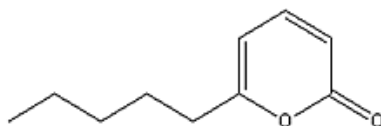


Figura 2. Struttura chimica del 6-pentil- α -pirone (6PP).

L'acido harzianico (HA) (Figura 3) è un acido tetramico isolato in Giappone per la prima volta da filtrati colturali di *T. harzianum*, ceppo SY-307 (Sawa et al., 1994). In seguito, questo composto è stato isolato anche in filtrati colturali del ceppo australiano M10 di *T. harzianum* e la sua struttura chimica è stata completamente caratterizzata (Vinale et al., 2009).

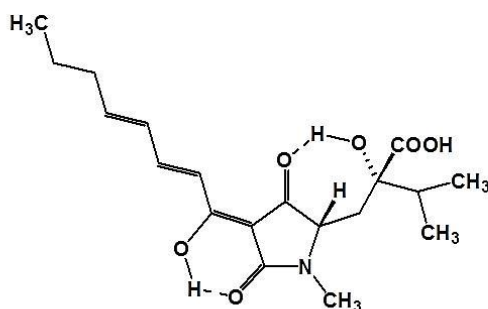


Figura 3. Struttura chimica dell'acido harzianico (HA).

L'acido harzianico ha dimostrato proprietà antibiotiche in saggi di attività antifungina *in vitro* nei confronti di *Pythium irregulare*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. Le applicazioni *in vitro* di iso-HA hanno inibito la crescita radiale del micelio di *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. Inoltre, trattamenti dei semi con questa molecola hanno evidenziato la capacità di promuovere la crescita di piantine di *Brassica napus* (Vinale et al., 2009). Inoltre, nel lavoro di Vinale et al. (2014) si riporta l'isolamento e la caratterizzazione di un nuovo metabolita denominato acido isoharzianico (iso-HA). Questo è uno stereoisomero dell'acido harzianico ottenuto dal filtrato colturale di un ceppo di *T. harzianum*. L'attività biologica di questo metabolita è stata studiata sia *in vitro* contro i patogeni fungini *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* che *in vivo* in termini di promozione della crescita delle piante ed induzione di resistenza alle malattie. Inoltre, è stata esaminata anche l'influenza del tessuto vegetale sulla produzione di HA e iso-HA. Le applicazioni *in vitro* di iso-HA hanno inibito la crescita radiale del micelio di *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. Inoltre, iso-HA ha migliorato la germinazione dei semi di pomodoro e la resistenza alle malattie indotte. In particolare, il tessuto di pomodoro ha provocato la produzione di HA e ha modulato negativamente la biosintesi del suo iso-HA, suggerendo che diverse forme dello

stesso metabolita secondario del *Trichoderma* hanno ruoli specifici nel meccanismo molecolare che regola l'interazione con la pianta del *Trichoderma*.

Altri metaboliti secondari (viridioli) prodotti da *T. virens* inibiscono invece la crescita delle piante ed interferiscono nella biosintesi di aflatossine microbiche (Sakuno et al., 2000; Wipf, 2003).

1.4. Biopolimeri in agricoltura

Si definiscono biopolimeri i polimeri prodotti dagli organismi viventi. Essi comprendono molecole diverse dal punto di vista strutturale e funzionale come l'amido e la cellulosa, le proteine, gli acidi nucleici (DNA e RNA) e le nuove bioplastiche. Negli organismi viventi i biopolimeri ricoprono i più svariati ruoli, svolgendo funzioni genetiche, enzimatiche, strutturali e di immagazzinamento dell'energia. I biopolimeri di interesse agrario sono di natura polisaccaridica. Questo tipo di molecole é composto da unità monosaccaridiche interconnesse mediante legami glicosidici a formare una catena lineare o con ramificazioni. La cellulosa e l'amido sono ad esempio polisaccaridi strutturali e di immagazzinamento dell'energia nelle piante, mentre la chitina ed il glicogeno svolgono le medesime funzioni negli animali (Mishra et al., 2009).

Negli ultimi anni si è registrato un crescente interesse verso l'uso dei polisaccaridi naturali per la produzione di bioplastiche alternativa a quelle tradizionali, data la loro atossicità, biodegradabilità, biocompatibilità, rinnovabilità e bassi costi di produzione (Reddy et al., 2011).

La maggior parte dei polisaccaridi naturali é utilizzata nelle industrie alimentari, farmaceutiche e cosmetiche come addensante, idratante, emulsionante, emolliente. Oltre all'impiego nel *food packaging*, questi composti sono utilizzati per la produzione di sacchetti, imballaggi, superassorbenti, protesi biomedicali, biocompositi, vasetti per piante, supporti per il lento rilascio di feromoni o fertilizzanti, teli per pacciamatura o solarizzazione.

Di estremo interesse ambientale sono le sperimentazioni per produrre biopolimeri da materiali di scarto, come ad esempio quelli derivanti dall'industria agroalimentare (conserviera, casearia e della lavorazione del pomodoro), ma anche da alghe, stoppie di mais o da raccolta differenziata della frazione organica dei rifiuti urbani. Anche le eccedenze dei prodotti dell'agricoltura come la lignocellulosa, la canna da zucchero, la farina di frumento, le bucce di frutta, le fibre di frutta, la segatura e la paglia di grano sono oggetto di attenzione in tal senso (Koller et al., 2012).

Da diversi anni si studia la possibilità di utilizzare biopolimeri che siano in grado di stimolare risposte di difesa nelle piante dato il loro basso impatto ambientale, e la scarsa propensione a favorire la comparsa di ceppi resistenti.

Ad esempio la chitina, il chitosano ed i loro derivati hanno suscitato un grande interesse per le applicazioni in agricoltura, medicina e biotecnologie grazie alla loro biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività (Kurita, 1998; Felse and Panda, 1999; Kumar, 2000; Synowiecki and Al Khateeb, 2003). Si è visto che l'impiego del chitosano nel *coating* di semi, foglie, frutta e verdura protegge dalla perdita di peso durante lo stoccaggio e ne previene la senescenza (Devlieghere et al., 2004). Il chitosano è stato inoltre utilizzato in aggiunta a fertilizzanti per controllarne il rilascio (Sukwattanasinitt, et al. 2001), e per aumentare la produttività di specie floreali come *Gerbera jamesonii* e *Dendrobium* sp (Wanichpongpan et al., 2001; Chandkrachang, 2002). Sono stati anche accertati effetti di promozione della crescita e sulla differenziazione di diverse specie vegetali (Bautista-Banos et al., 2003; Chibu e Shibayama, 2001; Lay Nge et al., 2006).

1.4.1. Biopolimeri a base di galattomannani

I galattomannani sono miscele di polisaccaridi estratti da semi di piante leguminose. Sono sostanze di riserva costituite da catene lineari di D-mannosio unite da legami β -1,4, con ramificazioni di unità di D-galattosio legate α -1,6 e spaziate in modo non regolare; in media si trovano 3 o 5 residui di mannosio per ogni residuo di galattosio (Prajapati et al. 2013) (Figura 4).

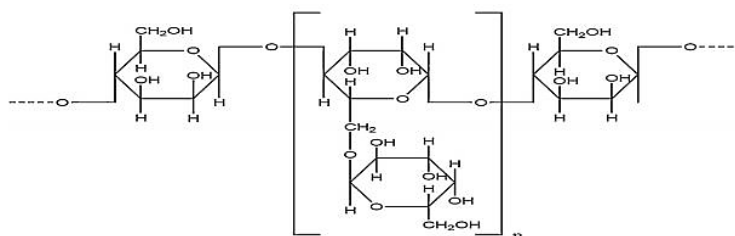


Figura 4. Struttura molecolare generale del galattomannano.

Grazie alle loro specifiche proprietà chimiche e fisiche i galattomannani sono di grande interesse per la produzione di biopolimeri. Infatti, essendo molto ramificati sono in grado di formare soluzioni molto viscosi e/o sospensioni colloidali.

I galattomannani di maggiore interesse commerciale sono isolati dall'endosperma di *Cyamopsis tetragonolobus* e *Ceratonia siliqua* L., meglio noti rispettivamente come gomme di "Guar" e LBG (Locust Bean Gum).

Queste gomme svolgono un ruolo di primo piano come agenti addensanti, gelificanti, emulsionanti, idratanti e sospesdenti, trovando applicazione in diversi settori produttivi (Barak e Mudgil 2014,

Thombarea et al. 2016). La capacità dei galattomannani di formare film stabili in acqua è di grande interesse nel settore agrario, ad esempio per la concia dei semi. Inoltre, il film di matrice polimerica può essere impiegato per la ritenzione dei principi bioattivi nell'area di applicazione, ad esempio per effettuare trattamenti delle foglie oppure della rizosfera.

1.5. Olivo

L'olivo (*Olea europaea* L., 1753) è un albero da frutto che si suppone provenga dall'Asia Minore e dalla Siria da cui nel corso dei millenni si è diffuso nel bacino del Mediterraneo. L'olivo coltivato appartiene alla vasta famiglia delle *Oleaceae* che comprende ben 30 generi, ed include anche specie di interesse ornamentale. L'olivo consta di due varietà botaniche: l'oleastro (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) e l'olivo coltivato (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*) (Green e Wickens, 1989).

L'olivo presenta foglie persistenti e lanceolate lunghe in media da 5 a 8 cm, verdi nella parte superiore e grigie argento nella parte inferiore. Le foglie restano vitali fino a due anni di età; all'ascella di ogni foglia si trova una gemma, che potrà dare luogo ad una infiorescenza (gemma a fiore) o ad un germoglio (gemma a legno). Molte gemme a legno possono rimanere in quiescenza e svilupparsi anche dopo vari anni. L'olivo è una pianta caratterizzata da un accrescimento lento e da uno sviluppo medio (4-8 m di altezza) che può variare in funzione della cultivar e delle peculiarità pedoclimatiche e gestionali.

L'apparato radicale è alquanto esteso e molto superficiale; nell'albero adulto la zona del colletto appare ingrossata ed è caratterizzata dalla presenza di formazioni grossolanamente sferiche, dalle quali si sviluppano i polloni. Sul tronco sono inserite le branche che recano i rami. I germogli che nascono sul dorso dei rami e delle branche sono detti succhioni.

Il fiore dell'olivo è ermafrodita, molto piccolo (3-5 mm) e la sua corolla è costituita da quattro petali biancastri saldati fra di loro alla base; il pistillo è tozzo, breve, provvisto di uno stimma ampio piumato, ricco di papille e quindi molto adatto a trattenere facilmente il polline. Tuttavia una buona parte delle varietà italiane è auto-sterile, pertanto la fecondazione dell'olivo è prevalentemente eterogama. Inoltre, la fecondazione avviene principalmente attraverso il vento (anemofila). Una caratteristica tipica dell'olivo è l'aborto dell'ovario che si manifesta in diversa misura tra le varietà o, nella stessa varietà, da un'annata all'altra. Tale fenomeno è fortemente influenzato dallo stato nutrizionale della pianta. Una percentuale inferiore al 10% dei fiori arriva a completa maturazione. I fiori sono riuniti in infiorescenze chiamate comunemente "mignole". La "mignolatura" è seguita dalla fioritura vera e propria che, a seconda delle annate e della latitudine, può avvenire tra la fine di

aprile ed il mese di giugno. Dopo 6 mesi si avrà la maturazione delle olive formatesi dai fiori (circa il 5% dei fiori).

I frutti pesano da 2 a 20 g ed hanno un colore che vira dal verde-giallo al viola-nero; a partire da ottobre, durante la maturazione o "inoliazione" nella polpa si riduce il contenuto in acqua, zuccheri e acidi ed invece aumenta quello in olio.

L'olivo presenta un vasto patrimonio genetico rappresentato da centinaia di varietà di olive da olio, da mensa e da duplice attitudine, con forme e dimensioni differenti, caratterizzate da un diverso rapporto tra nocciolo e polpa e quindi da un contenuto medio di olio variabile dal 18 al 27%. Il germoplasma italiano rappresenta il 48% del germoplasma mondiale (Ganino et al. 2006). La loro produttività dipende da moltissimi fattori che determinano il ritmo biennale della piena produzione (alternanza produttiva con anni di carico e di scarico). Un numero così elevato di cultivar è dovuto a modificazioni del genotipo (a causa di mutazioni gemmarie fissate per via vegetativa o per incrocio spontaneo e successiva disseminazione) o per fluttuazione dei caratteri varietali a seguito di condizioni ambientali.

1.5.1. Olivicoltura in Italia

Il patrimonio olivicolo italiano è stimato in 150 milioni di piante distribuite su una superficie di 1.165.458 ettari ripartita tra oltre 1000 imprese. L'Italia è il secondo produttore europeo di olio di oliva con una produzione nazionale media di oltre 6 milioni di quintali, due terzi dei quali extravergine e con ben 41 denominazioni DOP (denominazione di origine protetta) ed IGP (indicazione geografica protetta) riconosciute dall'Unione Europea. Tra le DOP ricordiamo la Nocellara del Belice, la Bella della Daunia e l'Oliva tenera Ascolana, ma ci sono tantissime altre varietà tipiche regionali come la Carolea in Calabria, la Cellina di Nardò e la Leccino del leccese.

La quasi totalità delle aziende e della superficie coltivata si concentra in regioni del Centro-Sud (Tabella 1). Dati ISTAT e ISMEA evidenziano che tra le regioni più vocate alla coltivazione dell'olivo ed alla produzione di olio di oliva, la Puglia occupa il primo posto, vantando il più alto numero di aziende olivicole (267.203). Seguono Sicilia (196.352), Calabria (136.016) e Campania (112.093).

Ogni anno la produzione italiana di olio di oliva si attesta sui 6-7 milioni di quintali, ma ovviamente la resa può variare molto in funzione delle condizioni climatiche della stagione produttiva.

Le opportunità di espansione che la filiera olivicola-olearia è potenzialmente in grado di esprimere sono molto promettenti: da una parte le opportunità di carattere generale, che consistono nella espansione della domanda di un prodotto di qualità nei paesi ricchi (Nord Europa, Nord America,

Oceania, ecc.), ma con bassi consumi pro-capite; dall'altra l'interesse derivante dagli effetti benefici che questo alimento determina sulla salute dei consumatori dovuto essenzialmente ai suoi costituenti, quali acidi grassi, ed alle proprietà antiossidanti dei composti fenolici, importanti inibitori della sintesi dei radicali liberi (Owen et al., 2000a; Owen et al., 2000b, Visioli et al., 2004), ma anche in grado di ridurre il rischio di malattie cardiovascolari (Owen et al., 2004; Tripoli et al., 2005; Dominguez e Barbagallo, 2007; Fitò et al., 2007; Flemming et al., 1973).

Tabella 1. Produzione di olio d'oliva nelle varie regioni italiane.

Posizione	Regione	Percentuale (%)
1	Puglia	35.16
2	Calabria	29.54
3	Sicilia	9.96
4	Campania	7.39
5	Lazio	4.17
6	Abruzzo	3.87
7	Toscana	3.32
8	Umbria	1.2
9	Molise	1.09
10	Basilicata	1.09
11	Liguria	0.94
12	Marche	0.86
13	Sardegna	0.84
14	Veneto	0.23
15	Emilia-Romagna	0.16
16	Lombardia	0.13
17	Trentino Alto-Adige	0.042
18	Friuli-Venezia Giulia	0.007
19	Piemonte	0.001
20	Valle d'Aosta	0.0
21	Trentino-Alto Adige (Bolzano)	0.0

1.5.2 Principali patologie dell'olivo

L'olivo è soggetto a numerose avversità abiotiche e biotiche. Fra le prime, di particolare importanza sono le basse temperature che possono provocare una severa abscissione delle foglie ed anche danni gravi a tronco e branche. Tra le avversità biotiche troviamo principalmente malattie di origine fungina e batterica.

Due dei più gravi problemi dell'uliveto sono causati da batteri: la rogna (*Pseudomonas savastanoi*), che spesso si propaga per la mancata applicazione di pratiche agronomiche adeguate (es. scarsa pulizia degli attrezzi da potatura), ed il complesso da disseccamento rapido (agente causale = *Xylella fastidiosa*), che ha tanto danneggiato gli ulivi in Puglia negli ultimi anni.

La rogna è tra le più frequenti malattie dell'uliveto, è causata dal batterio che penetra nella pianta tramite ferite e come molte altre batteriosi prolifera in condizioni di umidità elevata. I sintomi tipici della malattia si manifestano con la formazione di ingrossamenti verdi, molli e lisci su giovani germogli, piccioli, tronchi e radici. Col tempo questi tendono ad imbrunirsi e sfaldarsi, assumono dimensioni variabili. Sulle olive possono comparire delle tacche scure o delle escrescenze. Queste escrescenze sono chiamate tumori.

Il complesso del disseccamento rapido dell'olivo (CoDiRO), inizialmente si manifesta col disseccamento degli apici fogliari, e quando si estende alle branche principali provoca la morte della pianta. Questa malattia recentemente ha provocato la perdita di diversi ettari di uliveti secolari nel Salento. L'agente causale è un batterio Gram negativo, che vive e si riproduce all'interno dei vasi xilematici (permettono il circolo di acqua e di sali minerali all'interno della pianta). *X. fastidiosa* porta a delle profonde alterazioni della pianta, spesso letali. Alcuni ceppi di questo batterio sono noti per i gravi danni che arrecano a diverse colture agrarie: è infatti responsabile della malattia di Pierce nella vite, ad esempio.

Le malattie più comuni causate da funghi sono quattro: l'occhio di pavone (*Fusicladium oleaginum*), la lebbra dell'olivo (*Gloeosporium olivarum*), verticilliosi (*Verticillium dahliae*) e la fumaggine (Iannotta et al., 2012).

L'occhio di pavone è la più importante e diffusa malattia fungina dell'olivo e si manifesta in forme più o meno gravi in relazione alla suscettibilità varietale, alle condizioni vegetative delle piante ed alle situazioni pedo-climatiche dell'oliveto. Infatti, le infezioni sono più frequenti negli impianti ad alta densità e nelle zone vallive dove si verifica una maggiore persistenza di umidità. Il fungo attacca essenzialmente le foglie e, in casi particolari, anche le drupe, i giovani rametti ed i peduncoli. La sintomatologia tipica è riscontrabile sulla pagina superiore delle foglie con evidenti macchie circolari, più o meno estese in relazione allo stadio vegetativo del fungo, di colore dal

grigio chiaro al verde scuro circondato da un alone giallo. In relazione alla entità delle macchie ed alla superficie da esse occupata, l'intera foglia tende ad ingiallire completamente ed a cadere anticipatamente, inducendo grave filloptosi sui rami o sull'intera pianta, con conseguente minore funzionalità vegetativa e produttiva.

La lebbra dell'olivo è una malattia che si manifesta in prossimità della maturazione, quando sul frutto compare una tacca tonda, lievemente infossata, di colore bruno-nerastra. Col tempo l'oliva colpita da lebbra tende a disseccare e a mummificare, l'olio all'interno della drupa è torbido, acido e rossastro. Raramente compaiono sintomi sulle foglie, in forma di macchie gialle, che col tempo diventano di colore cuoio. Segue la caduta delle foglie.

La verticilliosi dell'olivo interessa maggiormente le giovani piantine ed è favorita dalla suscettibilità di alcune cultivar molto diffuse, è dovuta a varie cause telluriche (terreno infetto trasportato dalle macchine oppure tramite ospiti intermedi come infestanti ed orticole), ma anche alle procedure di propagazione in vivaio, spesso effettuate senza la necessaria attenzione nel prelievo di marze da piante infette (magari senza sintomatologia evidente). L'agente causale *V. dahliae* è notevolmente polifago infettando un'elevata quantità di specie coltivate, e si conserva nel terreno, anche per numerosi anni, sotto forma di microsclerozi o nell'interno di tessuti infetti e, al verificarsi di condizioni favorevoli, penetra nell'interno della pianta attraverso microferite provocate all'apparato radicale, o da ferite e lesioni determinate specialmente nella fase di trapianto. Dopo la penetrazione, il fungo incomincia a diffondersi nei vasi legnosi, invadendo i vasi a ridosso della zona cambiale occludendoli e, tramite la corrente linfatica, porzioni di ife vengono trasferite in più parti della pianta. A seguito di ciò, si può riscontrare una sintomatologia che inizialmente ha un decorso di lento ingiallimento e successivo disseccamento di alcune parti di pianta o di organi vegetativi, in quanto scarsamente alimentati dalla linfa. Le foglie diventano di colore verde opaco e si distaccano precocemente, mentre i rametti assumono una colorazione bruno-rossastra esternamente e marrone scuro nell'interno. In tali casi, piante adulte hanno anche la possibilità di sopravvivere, in quanto si riesce a ricostituire la chioma.

Gli agenti causali della fumaggine sono diversi funghi, appartenenti al genere *Capnodium*, *Pleosphaeria*, *Ceratocarpia*, *Peyronellea*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Alternaria*. La malattia si manifesta sull'olivo con un rivestimento di colore scuro e di consistenza fuliginosa su foglie, germogli, rametti e drupe di olivo. Questo rivestimento è costituito dal micelio e dai corpi fruttiferi dei funghi. Si tratta di organismi saprofiti polifagi, che vivono a spesa delle sostanze zuccherine (melata), prodotta per alterazione del metabolismo della pianta o in seguito ad attacco di insetti fitomizi, come gli afidi. Il danno provocato dalla fumaggine è indiretto poiché la formazione del

rivestimento impedisce gli scambi gassosi, l'attività fotosintetica e quindi provoca notevoli cali di produzione.

Delle circa 50 specie di insetti e acari più frequenti, solo la mosca delle olive, *Bactrocera oleae*, la tignola dell'olivo, *Prays oleae*, e la cocciniglia mezzo grano di pepe, *Saissetia oleae*, rappresentano una costante minaccia alle produzioni olivicole. Alcuni fitofagi secondari, come il rodilegno giallo, *Zeuzera pyrina*, cocciniglie e scolitidi, possono causare danni in particolari situazioni. I giovani impianti possono essere attaccati dalla tignola verde dell'olivo, *Palpita unionalis*, e dall'oziorrinco, *Otiorrhynchus cribricollis*. Tutti gli altri insetti ed acari sono invece normalmente ben controllati da un notevole numero di predatori (Antocoridi, Crisopidi, Coccinellidi, formiche e ragni) e da un complesso di 300-400 specie di Imenotteri parassitoidi. La maggior parte delle cultivar italiane, inoltre, ben si adatta alle diverse condizioni pedoclimatiche ed è dotata di una grande tolleranza e in qualche caso di resistenza ai principali insetti dannosi (Angelini et al., 2009).

Il principale parassita degli oliveti è rappresentato da *B. oleae*. L'adulto (circa 5 mm di lunghezza) ha un colore di fondo bruno-dorato, il capo rossiccio e gli occhi verdi con riflessi metallici; il torace è color cenere, striato di nero e lo scutello è giallo. Le ali sono trasparenti con riflessi iridescenti; l'addome presenta maculature nere.

La larva (circa 8 mm di lunghezza) è apoda, di colore bianco-giallognolo e si presenta più sottile verso l'estremità cefalica; sono ben evidenti le due mandibole nere, ad uncino, che sporgono dal capo.

Gli adulti si nutrono di materiali zuccherini, proteici e del succo che fuoriesce dalle olive in seguito alle punture da ovideposizione.

Le larve vivono nutrendosi della polpa dei frutti, dentro i quali scavano delle gallerie; le olive bacate possono essere invase da microrganismi che provocano marciumi, con conseguente cascola. Inoltre, la mosca dell'olivo è responsabile della trasmissione della rogna dell'olivo (*P. savastanoi*) (Ferrari et al., 2006).

1.5.3. Principali sostanze naturali dell'olivo

Con il termine "composti bioattivi" si indica una serie di sostanze assunte quotidianamente con la dieta che contribuiscono positivamente allo stato di salute dell'organismo. Essi esercitano numerose attività biologiche, tra cui: attività antiossidante ed antinfiammatoria, immunostimolante, antibatterica, antivirale ed antiproliferativa (Cabras e Martelli, 2004; Adom et al., 2005, Ninfali e Bacchiocca, 2003; Robards, 2003). Questi composti sono chiamati anche fitocomposti perché la quasi totalità di essi comprende carotenoidi, polifenoli e glucosinolati di origine vegetale.

Una ricca fonte di composti bioattivi è rappresentata dall'olivo. Infatti, oltre ad essere presenti nel prodotto finito (l'olio) sono presenti anche nei residui (foglie) e nei sottoprodotti di lavorazione (sanse, acque di vegetazione). Numerose ricerche sono tuttora in corso sull'uso alternativo dei residui organici dell'industria olivicola ed olearia, nonché sul recupero di sostanze ad alto valore aggiunto. Nell'ambito dei principali composti bioattivi prodotti dall'olivo i più importanti ed anche i più abbondanti sono i composti fenolici. Essi appartengono ad una classe di metaboliti secondari di origine vegetale molto eterogenea. Tutti questi composti sono caratterizzati dalla presenza di un anello aromatico con uno o diversi sostituenti ossidrilici. La loro abbondanza nel regno vegetale è dovuta all'azione protettiva contro l'attacco da parte di patogeni ed erbivori. Questa funzione antifungina ed antimicrobica deriva dall'azione combinata della capacità antiossidante e chelante dei gruppi ossidrilici presenti sull'anello fenolico che si legano tramite legami ad idrogeno alla parete cellulare dei microrganismi, in particolare con specifiche proteine presenti su di esse (Ragae et al., 2006). I composti fenolici possono essere ritrovati in natura in due forme: legati ad altre sostanze organiche come acidi organici o zuccheri (flavonoidi glicosidici), oppure possono presentarsi in forma libera (polifenoli). Sono stati identificati oltre 800 diversi polifenoli e circa 4000 sono presenti sotto forma di glicosidi, esteri ed altre combinazioni (Oszamianski 1988; Lecham et al., 1991; Ashraf et al., 1994; Rozes e Peres, 1998; Scalbert e Williamson, 2000).

1.5.1.1. Struttura e caratteristiche dei principali composti fenolici dell'olivo

I composti fenolici possono essere suddivisi in diverse sottoclassi in base al numero di anelli aromatici presenti nella loro struttura, al modo in cui sono legati, ed ai sostituenti (Tabella 2).

I fenoli costituiscono una frazione importante degli oli extravergini di oliva in quanto hanno proprietà antiossidanti e ne influenzano le caratteristiche organolettiche. Infatti, il gusto amaro e piccante dell'olio si deve alla presenza di polifenoli come l'idrossitirosolo, il tirosolo e gli agliconi.

Tra i composti fenolici presenti nell'olivo si distinguono gli acidi fenolici, gli alcoli fenolici, i lignani, i flavonoidi ed i secoiridoidi.

Gli acidi fenolici sono stati i primi composti ad essere individuati nell'olio vergine di oliva (Montedoro et al., 1992a; Tsimidou et al., 1996; Servili et al., 2004). Alcuni esempi sono rappresentati dall'acido 4-idrossibenzoico, gallico, vanillico, p-cumarico, o-cumarico, caffeico e ferulico.

Tabella 2. Principali composti fenolici presenti nell'olio di oliva

Acidi fenolici e derivati	Alcoli fenolici
Acidi idrossibenzoici	(3,4-Diidrossifenil)etanolo (3,4,-DHPEA, idrossitirosolo)
4-idrossibenzoico	(p-Idrossifenil)etanolo (P-HPEA, tirosolo)
Protocatechico	Alcool omovanillico
Gallico	
Vanillico	Lignani
Siringico	(+)-1-Acetossipinoresinolo
Acidi idrossifenilacetici	(+)-Pinoresinolo
4-idrossifenilacetico	
Omovanillico	Flavonoidi
Acidi idrossicinnamici	Apigenina
0-Cumarico	Luteolina
p-Cumarico	
Caffeico	
Ferulico	
Sinapico	
Derivati dei Secoiridoidi	
Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA)	
Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al p-HPEA (p-HPEA-EDA)	
Oleuropeina Aglicone (3,4-DHEA-EA)	
Ligstroside Aglicone (p-HPA-EA)	
Forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone	
Forma dialdeidica del ligstroside aglicone	

La classe degli alcoli fenolici include l'idrossitirosolo (o 3,4-diidrossifeniletanolo o 3,4-DHPEA) ed il tirosolo (p-idrossifeniletanolo o p-HPEA). (Figura 5)

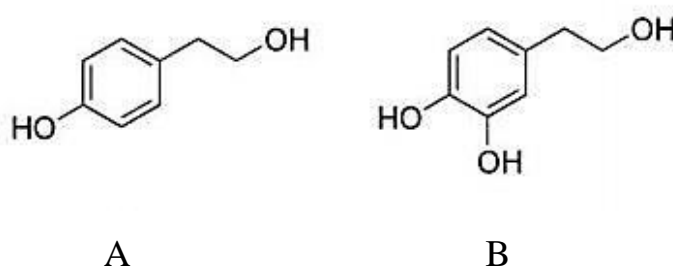


Figura 5. Struttura chimica dei principali fenoli semplici dell'olio extravergine d'oliva. A) Tiroso B) Idrossitiroso.

La loro concentrazione è generalmente bassa negli oli freschi ma aumenta durante lo stoccaggio a causa dell'idrolisi dei secoiridoidi dell'olio vergine di oliva che contengono nella loro struttura molecolare l'idrossitirosolo e tirosolo (Romani et al., 2007).

L'idrossitirosolo derivante dall'idrolisi acida dell'oleuropeina si trova generalmente nell'acqua di vegetazione delle olive, nelle foglie e nei frutti dell'olivo. Esso è considerato uno *scavenger*, che

protegge le cellule dallo stress ossidativo, seguito come efficacia dall'oleuropeina, acido caffeico e tirosolo (De la Puerta et al., 1999).

Un altro gruppo di polifenoli presenti nell'olio di oliva è quello dei lignani, in particolare (+)-1-acetossipinoresinolo e (+)-pinoresinolo (Owen et al., 2000; Brenes et al., 2000a). (Figura 6).

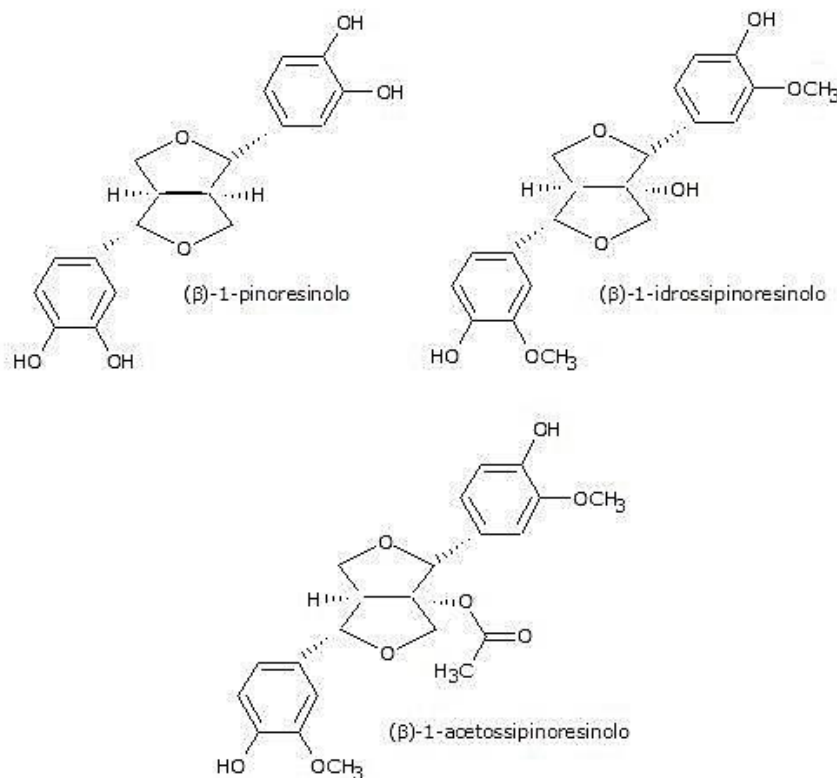


Figura 6. Struttura chimica dei principali lignani contenuti nell'olio di oliva.

Il (+)-pinoresinolo è un composto comune in diverse piante come il sesamo (*Sesamun indicum*) ed i semi delle specie di *Forsythia*, appartenente alla famiglia delle *Oleaceae*. Il (+)-1-acetossipinoresinolo e (+)-1-idrossipinoresinolo, ed i loro derivati glicosidici, sono stati ritrovati nella corteccia dell'olivo (*Olea europae*) ed anche nel nocciolo delle olive (Owen et al., 2000). Essi non sono presenti nel pericarpo delle drupe, né nei rametti e foglie che possono accidentalmente essere spremuti insieme alle olive.

I flavonoidi sono polifenoli che derivano dal benzo- γ -pirano, costituito da 15 atomi di carbonio, arrangiati in due anelli fenolici legati da una catena alifatica a 3 atomi, che ciclizza per formare un anello piranico (Figura 7). I flavonoidi sono suddivisi in quattro gruppi principali: flavoni, flavonoli, flavanoni e flavanoli, in base alle modifiche che la struttura di base subisce. Le modifiche principali prevedono formazione di doppi legami o aggiunta di gruppi carbonilici ed ossidrilici.

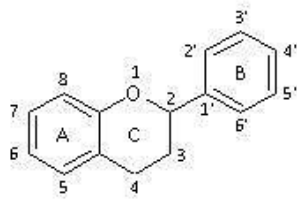
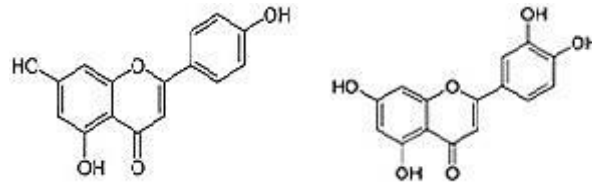


Figura 7. Struttura di Base dei Flavonoidi

I composti più importanti sono l'apigenina e la luteolina (Servili et al., 2004) (Figura 8), che svolgono un'azione antiossidante nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) grazie ai gruppi ossidrilici presenti in posizione 3' (apigenina) e 3', 4' (luteolina).



Apigenina

Luteolina

Figura 8. Struttura chimica dell'Apigenina e della Luteolina

I secoiridoidi sono esteri dell'acido elenolico. Essi si possono trovare in forma glicosilata quando legano glucopiranosio; gli esempi più noti di secoiridoidi glicosilati sono l'oleuropeina, la dimetiloleuropeina ed il ligstroside. Queste molecole possono trovarsi anche in una forma non glicosilata detta aglicone, (oleuropeina aglicone, ligstroside aglicone) (Figura 9) (Garrido Fernández et al., 1997).

A differenza dei flavonoidi, degli acidi e degli alcoli fenolici che sono presenti in molte specie appartenenti a diverse famiglie botaniche, i secoiridoidi sono presenti soltanto nelle *Oleaceae*. Essi sono i polifenoli più abbondanti nell'olivo.

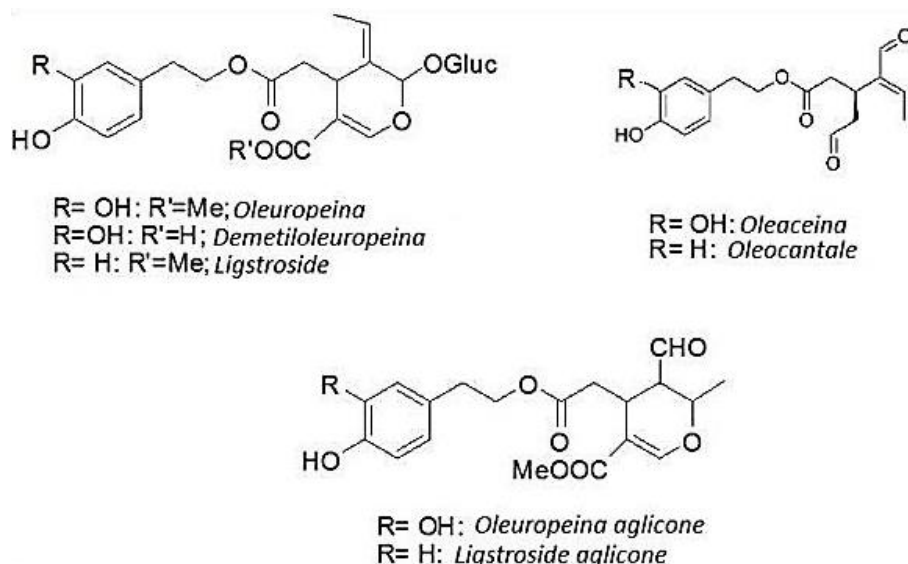


Figura 9. Struttura chimica dei secoiridoidi presenti nell'olio extravergine di oliva .

L'oleuropeina, la demetiloleuropeina, il ligstroside ed il nüzhenide sono i secoiridoidi più abbondanti della drupa. (Gariboldi et al., 1986; Garrido Fernández et al., 1997)

Il frutto, tra i composti fenolici principali, contiene anche il verbascoside, un derivato dell'acido idrossicinnamico che contiene il 3,4-DHPEA nella sua struttura molecolare (Servili et al., 1999a), assegnata da Andary et al. (1982) e confermata da Servili et al. (1999b).

L'Oleuropeina in particolare presenta uno scheletro strutturale oleosidico, tipico degli iridoidi da *Oleaceae* (Figura 10) e si trova sia nelle olive (2% sulla sostanza secca) sia nelle foglie e nei fusti (1% sulla sostanza secca).

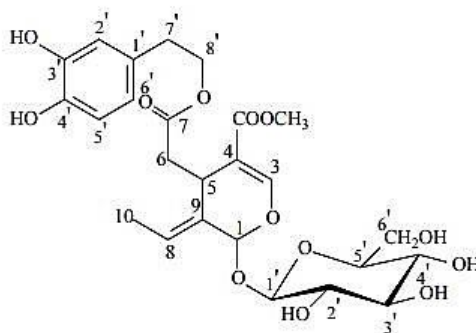


Figura 10. Struttura chimica dell'Oleuropeina.

L'oleuropeina ha attirato l'interesse degli scienziati e nutrizionisti di tutto il mondo per le sue proprietà in grado di rafforzare il sistema immunitario, aiutare la circolazione, prevenire la formazione di coaguli di sangue e per la sua capacità di contrastare l'invecchiamento cellulare, tissutale e dell'intero organismo (Vogel et al., 2015).

1.5.1.2. Effetti benefici dei composti fenolici per il consumatore

Molti studi epidemiologici hanno evidenziato che l'incidenza di malattie infiammatorie, cardiovascolari e tumorali è più bassa nelle regioni dell'Europa mediterranea (come Grecia, Italia e Spagna) rispetto agli altri paesi occidentali e settentrionali (Trichopoulou, 2003). Ciò potrebbe essere attribuito all'elevato consumo di olio di oliva nella dieta mediterranea che contribuisce al fabbisogno giornaliero di vitamina E, di acidi grassi essenziali e di specifici antiossidanti, in particolar modo di composti fenolici e tocoferoli. I presenti effetti benefici potrebbero almeno in parte essere dovuti all'azione antiossidante dei polifenoli a basso peso molecolare, come l'oleuropeina e l'idrossitirosolo (Dekanski et al., 2011; Raederstorff, 2009). Inoltre, il contenuto in polifenoli conferisce all'olio il tipico sapore amaro ed il gusto pungente (Boskou et al., 2005), oltre che rendere l'olio stabile all'ossidazione.

Negli ultimi venti anni la ricerca scientifica si è focalizzata sullo sviluppo di tecniche di recupero dei composti bioattivi di origine vegetale, in particolare dagli scarti delle lavorazioni agro-alimentari, da impiegare quali ingredienti funzionali di preparati omeopatici o nutraceutici (Stone, 2003). L'olivo rappresenta una ricca fonte di composti bioattivi di natura fenolica, la cui estrazione dai sottoprodotti della sua lavorazione (foglie, sansa, acque di vegetazione, etc.) può costituire una valida strategia di valorizzazione di questi materiali di scarto (Rodis et al., 2002). Diversi metodi analitici sono stati utilizzati finora per estrarre i composti antiossidanti dai sottoprodotti dell'olivo, tra cui tecniche di filtrazione (microfiltrazione, ultra-filtrazione, osmosi inversa), trattamenti enzimatici, estrazione con fluidi supercritici (SFE) o con etanolo. Ad ogni modo, lo scale-up industriale di queste metodiche estrattive deve essere ancora perfezionato per garantire una maggiore standardizzazione dei processi di recupero e l'ottenimento di quantità ottimali di composti ad alto valore aggiunto ed elevato grado di purezza (Ghanbari et al., 2012).

1.5.1.3. Il ruolo dei fenoli nello sviluppo e nella difesa della pianta

Le piante producono una grande varietà di composti fenolici che, a seconda della loro natura chimica, rivestono ruoli diversi. Alcuni servono da sostegno meccanico (biosintesi della lignina), come fonte di attrazione per gli impollinatori (flavoni), per la dispersione del frutto o per la difesa da erbivori e patogeni. I fenoli come l'acido ferulico e la cumarina, invece, possono agire come inibitori della crescita. Infatti, è stato dimostrato che semi di *Melilotus alba* contenenti alte

concentrazioni di cumarina non sono capaci di germinare fino a quando la cumarina non è allontanata o degradata (James et al., 1952).

La loro biosintesi è influenzata da numerosi fattori, tra cui lo stadio di sviluppo della pianta, la presenza di ferite, la carenza idrica, la stagionalità o l'attacco da parte di un patogeno (Lynn e Chang, 1990; Ozyigit et al., 2007; Thomas e Ravindra, 1999). Analogamente carenze di luce o nutrienti stimolano la biosintesi di fenilpropanoidi (possibili precursori di composti flavonoidi) in alcune specie vegetali (Balasundram et al., 2006; Hollman e Katan, 1999). Come precedentemente menzionato, i fenoli hanno anche una funzione rilevante nella difesa della pianta contro insetti fitofagi, nematodi, erbivori e patogeni fungini o batterici (Lattanzio et al., 2006). Pertanto alcuni fenoli sono stati proposti come valide alternative all'utilizzo dei pesticidi chimici per il controllo di importanti agenti patogeni (Langcake et al., 1981).

La pianta risponde all'attacco dei patogeni accumulando fitoalessine, come per esempio le idrossicumarine (Karou et al., 2005). I fenoli sono sintetizzati quando la pianta riconosce i potenziali patogeni tramite i PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), inducendo la cosiddetta immunità innescata da PAMP (PAMP-triggered immunity) e limitando così la diffusione dell'infezione (Newman et al., 2007; Zipfel, 2008). I fenoli possono anche essere coinvolti nelle interazioni che avvengono a livello della rizosfera; infatti, le radici delle piante rilasciano questi composti negli essudati radicali, che contengono anche ioni, enzimi liberi, mucillagini e metaboliti primari e secondari. Nel suolo i composti fenolici innescano reazioni redox e influenzano in maniera selettiva la crescita di microrganismi terricoli che colonizzano la rizosfera, che a loro volta possono condizionare l'attività enzimatica, il bilancio ormonale, la disponibilità di nutrienti e la competizione con piante vicine (Kraus et al., 2003; Northup et al., 1998). Come conseguenza di questa interazione dinamica, la struttura e la composizione chimica del suolo si modificano in maniera significativa in funzione della quantità e tipologia di composti fenolici rilasciati dalle diverse specie di piante. I microrganismi degradano i fenoli in composti più semplici che contribuiscono alla mineralizzazione dell'azoto nel suolo e alla formazione dell'humus (Halvorson et al., 2009). I composti fenolici, inoltre, chelano gli ioni divalenti e migliorano la porosità del terreno, fornendo siti attivi di assorbimento ed incrementando altresì la mobilità e la biodisponibilità di elementi come potassio, calcio, magnesio, rame, etc. (Seneviratne e Jayasinghearachchi, 2003). Molti composti fenolici presenti negli essudati radicali agiscono come segnali chemiotattici per numerosi microrganismi terricoli che li riconoscono e si muovono verso le radici della pianta nella rizosfera (Perret et al., 2000; Taylor e Grotewold, 2005). Diversi organismi sono respinti o attratti dallo stesso segnale chimico, che può quindi elicitare differenti risposte. Un esempio è dato dagli isoflavoni prodotti dalle radici della soia che agiscono come chemioattrattivi

sia per il simbionte *Bradyrhizobium japonicum* che per il patogeno *Phytophthora sojae* (Morris et al., 1998).

1.6. Scopo del lavoro

Nell'ottica di fornire un contributo alla definizione di sistemi ecocompatibili per l'olivicoltura, l'obiettivo di questo progetto di dottorato è stato quello di realizzare bio-formulati a base di agenti microbici benefici e/o loro metaboliti secondari, opportunamente selezionati per la difesa, nonché per la promozione della crescita e per il miglioramento della fitness dell'olivo. Inoltre, nell'ambito del progetto, è stato valutato l'impiego di biopolimeri per il contenimento di patogeni naturalmente presenti.

A tale scopo, in una prima fase sono stati preparati formulati a base di propaguli attivi di diverse specie del fungo antagonista *Trichoderma* (tra cui *T. harzianum* T22, *T. harzianum* M10, *T. harzianum* Th1, *T. asperellum* KV906, *T. virens* GV41) e di soluzioni a titolo noto di alcuni dei suoi metaboliti secondari, quali il 6-pentil- α -pirone (6PP) e l'acido harzianico (HA).

Nella fase successiva i ceppi/metaboliti selezionati sono stati applicati su piante di *Olea europae* cv Carolea allevate in vaso.

Il presente lavoro è rivolto alla valutazione degli effetti che i suddetti trattamenti hanno provocato sulle piante di olivo, tanto in termini di promozione della crescita quanto in termini di diminuzione delle infezioni e di incremento nella produzione di composti bioattivi. L'analisi metabolomica con sistema LC-MS Q-TOF viene utilizzata per verificare le differenze di accumulo dei composti fenolici nelle foglie in seguito ai trattamenti effettuati con i ceppi o metaboliti selezionati. L'importanza attribuita dalla letteratura ai composti fenolici dell'olivo è giustificata dal crescente interesse che questi metaboliti secondari stanno suscitando in virtù delle loro proprietà antiossidanti, antinfiammatorie ed antimicrobiche. Il recupero di questi composti bioattivi da un prodotto di scarto della filiera olivicola quali ad esempio le foglie di olivo offre nuove ed interessanti opportunità di impiego in diversi settori come quello cosmetico, nutraceutico, farmacologico ed agrario. In quest'ultimo caso i fenoli, essendo composti di difesa prodotti nelle piante in risposta all'attacco dei patogeni, potrebbero essere utilizzati anche in regime di lotta integrata limitando l'uso dei prodotti chimici di sintesi.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Ceppi fungini e metaboliti bioattivi

I ceppi appartenenti al genere *Trichoderma* ed i metaboliti da loro prodotti, sono stati selezionati al fine di realizzare dei formulati a base di propaguli attivi per le successive applicazioni *in vivo*. I ceppi utilizzati sono di seguito riportati:

- *T. harzianum* ceppo M10
- *T. asperellum* ceppo KV906
- *T. virens* ceppo GV41
- *T. harzianum* ceppo TH1
- *T. harzianum* ceppo T22

I funghi sono stati inoculati in piastre Petri contenenti *potato dextrose agar* (PDA, SIGMA St. Louis, MO) e tenuti a 25°C per un periodo compreso tra 4 e 7 giorni fino al raggiungimento della sporulazione. In seguito, le spore sono state raccolte con acqua sterile (10 ml), filtrate per allontanare i residui di micelio, e contate al microscopio mediante l'uso di una camera contaglobuli di Burkner. Le spore raccolte e con titolo stabilito sono state conservate a -20°C in una soluzione acquosa di glicerolo al 20% (v/v) fino al loro utilizzo. Per il ceppo KV906 è stato utilizzato un formulato commerciale, pertanto, la sospensione conidica è stata realizzata mediante diluizione del preparato contenente conidi del fungo (10^{10} spore grammo^{-1}) e materiale inerte.

Per i trattamenti in campo, oltre alle sospensioni conidiche dei 5 ceppi selezionati di *Trichoderma*, sono stati utilizzati 2 metaboliti secondari, ovvero il 6PP e l'HA prodotti rispettivamente da *T. atroviride* P1 e *T. harzianum* M10.

Quest'ultimi sono stati allevati su PDA fino ad ottenere una completa sporulazione ed inoculati in 1,5 l di *potato dextrose broth* (PDB, SIGMA St. Louis, MO). Le beute da 5 l sono state incubate a 25°C per 30 giorni in coltura statica. Successivamente, la coltura è stata filtrata mediante pompa da vuoto e carta Whatman 3MM-CHR (Whatman, Brentford, UK).

I filtrati colturali ottenuti dai 2 ceppi di *Trichoderma* sono stati estratti esaustivamente con acetato di etile (EtOAc). Le frazioni organiche raccolte sono state unite ed anidificate con l'aggiunta di

Na₂SO₄ anidro. Successivamente il solvente è stato allontanato mediante evaporazione a pressione ridotta.

Il residuo oleaginoso ottenuto dal filtrato colturale di *T. atroviride* ceppo P1 è stato sottoposto ad analisi cromatografia su colonna a pressione atmosferica, (Si gel; 50 g Merck, Kiesegel 60, 0.063-0.2 mm) ed eluito con un gradiente di Etere di petrolio:EtOAc da 8:2 v/v a 1:1 v/v. Le frazioni raccolte sono state analizzate mediante cromatografia su strato sottile (TLC) (Si gel, Kiesegel 60, GF254 di 0,25 mm, Merck, Darmstadt; Germany) eluite con Etere di petrolio: EtOAc in rapporto 8:2 v/v e le frazioni che mostravano lo stesso profilo sono state riunificate.

L'estratto totale di *T. harzianum* ceppo M10 è stato sottoposto ad un primo passaggio di purificazione mediante estrazione basica. Il residuo secco è stato sciolto in diclorometano (DCM) con un rapporto p/v di 10 mg/ml ed è stato estratto con una soluzione 2 M di idrossido di sodio (NaOH). La soluzione in cui sono presenti i sali sodici è stata neutralizzata aggiungendo acido cloridrico (HCl) 2M. L'acidificazione con HCl ha permesso di riportare i soluti nelle rispettive forme non dissociate insolubili in acqua. Il precipitato è stato recuperato per filtrazione tramite imbuto Büchner in vetro borosilicato (porosità 16÷40µm) e risospeso in EtOAc. Il residuo secco ottenuto è stato analizzato con TLC (Thin Layer Chromatography) a fase inversa (TLC Silica gel 60 RP-18 Merck Darmstadt; Germany) usando come eluente una soluzione di metanolo/acetone/acqua (MeOH/CH₃CN/H₂O) in rapporto v/v 3/4/3 (Vinale et al., 2013; 2014).

2.2. Applicazione dei ceppi selezionati e dei metaboliti bioattivi

2.2.1. Materiale vegetale

In questo lavoro sono state impiegate piante di olivo cultivar Carolea. Questa cultivar (tipica delle regioni meridionali italiane ed in particolare della Calabria) è caratterizzata da una folta chioma a forma di piramide rovesciata ed una buona resistenza termica. Le infiorescenze sono poco sviluppate e compatte. Le drupe, di forma ellissoidale e asimmetrica, hanno dimensioni piuttosto grandi che arrivano ad un peso massimo di 8g. A maturazione completa il colore è nero lucido. Il nocciolo è piccolo e presenta solchi pronunciati. La funzione principale di questa varietà è quella di fornire olive da tavola, tuttavia esse possono essere impiegate anche per l'estrazione dell'olio. Questa varietà necessita di opportune cure di natura agronomica per la sua spiccata suscettibilità a malattie quali Mal del Piombo ed occhio di pavone, e la predisposizione ad infestazioni parassitarie (principalmente tignola e mosca dell'olivo). Inoltre, poiché Carolea non risulta essere autocompatibile per l'impollinazione è stata selezionata la cultivar Pendolino (Tabella 3).

Tabella 3. Caratteristiche delle cultivar Pendolino e Carolea utilizzate in questa sperimentazione.

	PENDOLINO	CAROLEA
Diffusione	Toscana e centro Italia	Calabria
Peso oliva	-	5-6 g
Caratteri	Frutti medio piccoli, invaiatura viola, media precocità	Inoleazione precoce in novembre; albero taglia grande
Produttività	Buona e costante	buona
Resistenza	Al freddo	Al freddo siccità gelate, scarsa a malattie; anche raccolta meccanica.
Resa in olio	Media: 21 %	Elevata: 20 %
Caratteri organolettici tipici dell'olio	Olio apprezzabile di buona qualità	Fruttato medio, giallo dorato e toni verdi; anche olive da mensa.

Le piante oggetto di studio, con circa due anni di età, sono state acquisite tramite vivaio e trapiantate in vaso presso il Dipartimento di Agraria di Portici (NA) (Figura 11).



Figura 11. Piante di olivo, cv. Carolea, utilizzate per gli esperimenti condotti presso il Dipartimento di Agraria di Portici (NA).

2.2.2. Disegno sperimentale

Il disegno sperimentale include 15 piante per trattamento, disposte in 3 blocchi randomizzati (Figura 12).

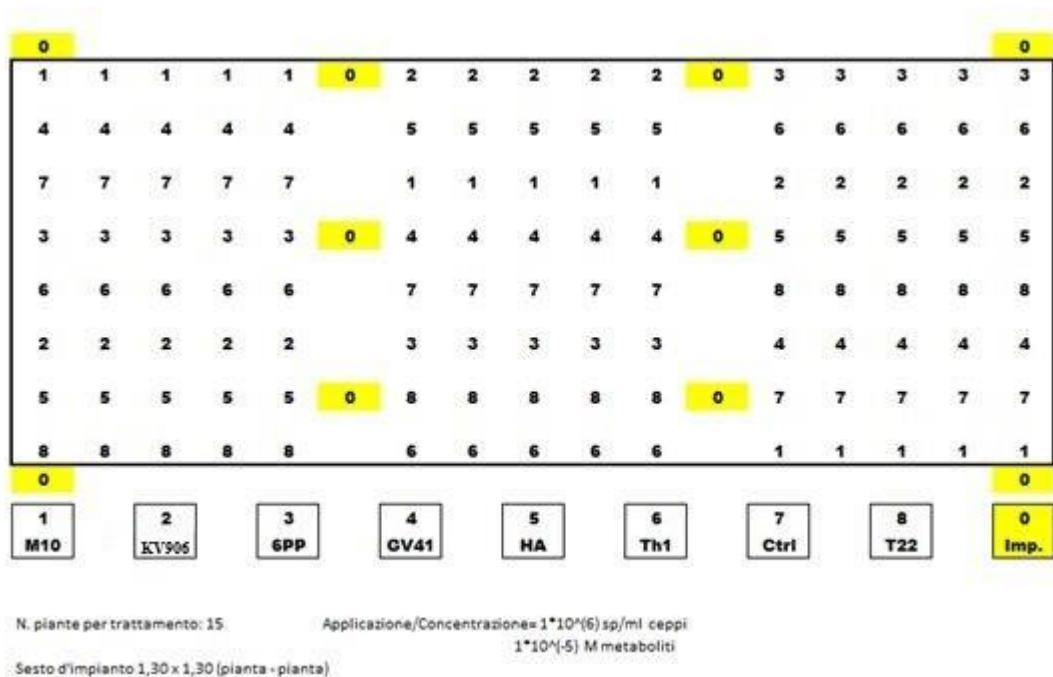


Figura 12. Schema di campo utilizzato per la distribuzione random delle piante oggetto di studio. La legenda dei trattamenti effettuati è riportata nei riquadri sottostanti lo schema. 1= ceppo M10 di *T. harzianum*. 2 = ceppo KV906 di *T. asperellum*. 3 = 6PP. 4 = ceppo GV41 di *T. virens*. 5 = HA. 6 = ceppo TH1 di *T. harzianum*. 7 = controllo d'acqua-CTRL. 8 = ceppo T22 di *T. harzianum*. 0 = cv. Pendolino, impollinatrice.

Gli olivi sono stati disposti con un sesto di impianto di 1,30 x 1,30 m, distribuiti su 15 file intervallate dalle piante impollinatrici (contrassegnate dal numero 0), poste anche al centro ed ai 4 lati del campo. Ogni trattamento è stato somministrato a 15 piante disposte in gruppi di cinque per tre repliche. Inoltre, a ciascun trattamento è stato assegnato un numero identificativo in cui: 1= ceppo M10 di *T. harzianum*. 2 = ceppo KV906 di *T. asperellum*. 3 = 6PP. 4 = ceppo GV41 di *T. virens*. 5 = HA. 6 = ceppo TH1 di *T. harzianum*. 7 = controllo d'acqua-CTRL. 8 = ceppo T22 di *T. harzianum*. 0 = cv. Pendolino (figura 12).

2.2.3. Trattamenti in campo con ceppi di *Trichoderma* sp. e metaboliti secondari

I trattamenti in campo sono stati eseguiti somministrando 400 ml di sospensione di spore di *Trichoderma* o di metabolita, sostituiti da acqua per le piante controllo (CTRL, trattamento 7) i . Le piante sono state trattate con sospensioni conidiche di ciascun ceppo applicate alla concentrazione di 10⁶ spore/ml e con soluzioni acquose dei metaboliti alla concentrazione 10⁻⁵ M.

Durante il trapianto in vaso degli olivi è stato effettuato il primo trattamento mediante bagnatura delle radici (*root dip* – immersione per 10 min. nella soluzione) utilizzando 1 litro di soluzione di spore o metabolita per pianta (Figura 13).



Figura 13. Applicazione dei trattamenti mediante bagnatura delle radici al trapianto.

I successivi trattamenti sono stati invece effettuati ogni 30 giorni mediante bagnatura del colletto utilizzando circa 400 ml di soluzione di spore o metabolita per pianta.

Durante il primo anno i trattamenti sono stati effettuati, con cadenza mensile, da aprile a settembre mentre, per i successivi due anni, da maggio ad ottobre.

2.3. Applicazione del biopolimero a base di galattomannani

Durante l'ultimo anno, le stesse piante sono state utilizzate per dei trattamenti fogliari con un biopolimero a base di galattomannani di carrubo (LGB). Pertanto, sono stati effettuati quattro trattamenti con cadenza settimanale utilizzando una sospensione del biopolimero in acqua (rapporto 2:1 v/v biopolimero /acqua). Le applicazioni aeree di galattomannano sono state eseguite fino a completa bagnatura della chioma dell'olivo.

2.3.1. Valutazione dei sintomi provocati da *Fusicladium oleagineum*

Per tutta la durata della sperimentazione è stata monitorata la presenza di infezioni naturali causate dal patogeno fungino *Fusicladium oleagineum* (ex *Spilocaea oleagina*) responsabile dell'occhio di pavone, mediante conta delle lesioni presenti sulle foglie (Figura 14). Per ciascun trattamento sono state previste 7 repliche. I valori medi sono stati ottenuti da ogni replica per ogni trattamento, che era costituito da 7 repliche con conta totale delle foglie. I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) seguita dal confronto con il test Student Newman Keuls utilizzando il software SPSS (Statistics, v. 21). I dati relativi all'incidenza della malattia sono espressi come media \pm SD (Deviazione Standard). Il livello di significatività è stato impostato con $p < 0.05$.



Figura 14. Sintomi di *F. oleagineum* sulle foglie degli olivi trattati.

2.3.2. Microscopia a scansione elettronica

Le foglie di olivo sono state fissate in Gluteraldeide 2.5% in PB (Phosphate Buffered, pH 7.4) a 4°C per 24h. Successivamente, i campioni sono stati lavati in PBS (2x10 min), disidratati in scala ascendente di alcool 2X per 10 min. (70%, 85%, 95% e 100%) e sottoposti a *critical points*. I campioni disidratati sono stati montati su stubs di alluminio, ricoperti con uno strato di oro-palladio (100Å), utilizzando un metallizzatore EMITECH K 850 (Ashford, UK). Infine, essi sono stati esaminati con un microscopio elettronico a scansione (Zeiss EV040) presso il centro di microscopia elettronica del Dipartimento di Agraria (Figura 15). Le foto ottenute al SEM delle

foglie con e senza il biopolimero sono presentate con un ingrandimento di 2.00xK, una tensione di 20.00kV, corrente di 10 mA ed una lunghezza focale di 16.5 mm < WDL <20.00mm.

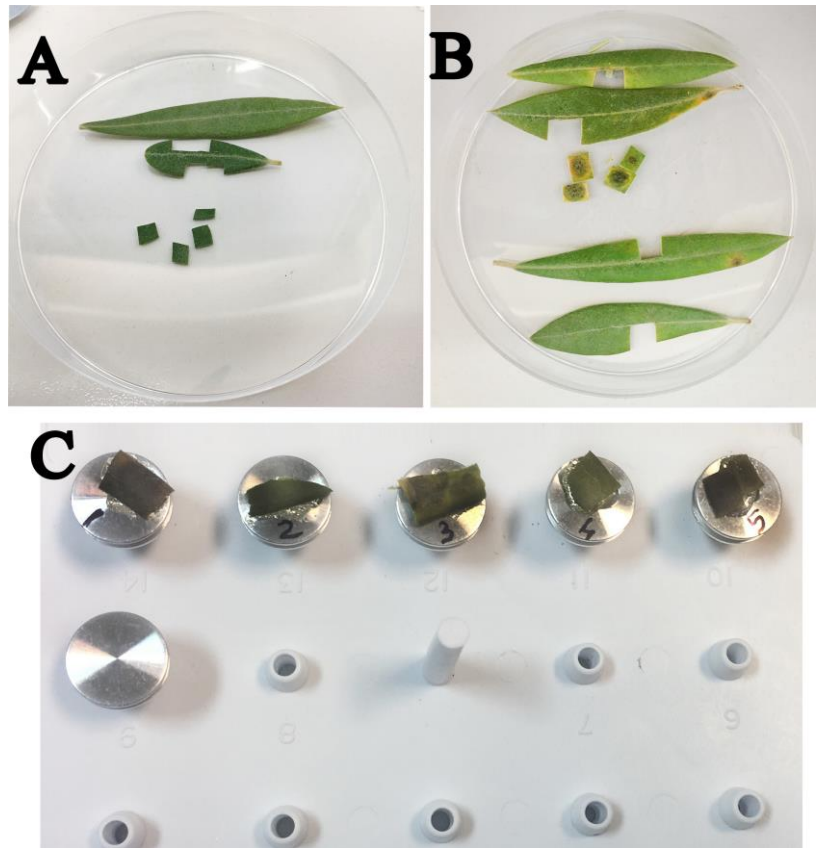


Figura 15. Preparazione dei campioni per l'osservazione al SEM. A. Foglie sane. B. Foglie malate. C. Campioni sullo stubs.

2.4. Metabolomica di piante di olivo trattate con ceppi microbici benefici o loro metaboliti

2.4.1. Estrazione dei polifenoli dalle foglie di olivo e dalle drupe

Nel corso dei tre anni di sperimentazione sono stati effettuati prelievi periodici di cinque foglie da piante campione dopo ogni trattamento (Figura 16).



Figura 16. Campionamento di foglie per l'analisi metabolomica.

Durante il primo anno sono stati effettuati cinque campionamenti (da aprile ad agosto), quindici giorni dopo ogni trattamento. Nel corso del 2016 i prelievi eseguiti sono stati quattro (da luglio ad ottobre). Mentre nel 2017 le foglie sono state prelevate da giugno ad ottobre e dicembre per un totale di 6 prelievi. Inoltre, è stata effettuata la raccolta delle olive derivanti dal campo sperimentale.

Le foglie e le drupe prelevate sono state conservate a -80°C per le successive estrazioni dei polifenoli, utilizzando il protocollo di Talhaoui et al. (2015) con alcune modifiche. In particolare, i campioni fogliari sono stati liofilizzati, macinati e 200 mg di estratti trattati con 5 ml della soluzione MeOH/H₂O 80/20 (v/v). Per favorire la rottura delle cellule e, quindi, l'estrazione dei composti d'interesse, le foglie sono state sonicate in ghiaccio per 10 min utilizzando un apparecchio sonics vibra-cell (Branson) con i seguenti parametri: 40% AMPL e PULSE ON 30''/OFF 15''. La miscela ottenuta è stata centrifugata (4000 rpm) a 4°C per 10 minuti. Prelevato il surnatante la procedura di estrazione è stata ripetuta una seconda volta. L'estratto è stato quindi portato a secco mediante un concentratore centrifugo (Thermo Scientific™ Savant™ SPD131DDA SpeedVac™) e risospeso in 4 ml di una soluzione MeOH/H₂O 50/50 (v/v). La miscela così ottenuta è stata filtrata (0,22 μm Millipore) per eliminare eventuali impurità residue e conservata a -20°C fino al momento dell'analisi.

Diversamente dalle foglie, l'estrazione di polifenoli dalle drupe è stata effettuata con una soluzione di metanolo (MeOH) ed acqua (H₂O) in rapporto 50/50 (v/v). La miscela così ottenuta è stata filtrata e sottoposta ad ulteriore purificazione con etere di petrolio per eliminare la componente lipofila, filtrata (0,22 μm Millipore) e conservata a -20°C .

2.4.2. Analisi dei composti polifenolici mediante sistema LC-MS Q-TOF

L'analisi dei polifenoli estratti dalle foglie e dalle drupe degli olivi trattati con spore o metaboliti di *Trichoderma* spp. è stata effettuata mediante tecniche di spettrometria di massa accoppiata a

cromatografia liquida HPLC a fase inversa. Lo strumento utilizzato è stato un LC-MS Q-TOF prodotto da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), costituito da un HPLC 1260 serie Infinity dotato di rilevatore DAD, ed uno spettrometro di massa Q-TOF (modello G6540) con sorgente di tipo Dual ESI. Per ogni trattamento sono stati analizzati 3 campioni (repliche biologiche), ciascuno dei quali è stato iniettato in triplicato (repliche tecniche) per un totale di 9 corse per trattamento. I polifenoli sono stati separati in una colonna analitica Zorbax Eclipse Plus C-18 (2.1 x 100 mm, 2,7 µm diametro delle particelle) della Agilent Technologies. Le analisi sono state condotte tenendo la colonna ad una temperatura costante di 25°C e utilizzando come fasi mobili: 0,1% (v/v) acido formico (HCOOH) in H₂O (fase A) e 0,1% (v/v) acido formico in acetonitrile (ACN; fase B) ad un flusso costante pari a 0,5 ml/min. Il gradiente lineare impiegato per le separazioni cromatografiche è riportato in Tabella 4.

Per ogni campione sono stati analizzati tre diversi cromatogrammi:

- TIC (*total ion current* o corrente ionica totale) che rappresenta la somma delle intensità delle masse rilevate in ogni punto del cromatogramma;
- BPC (*base peak chromatogram* o cromatogramma del picco base) che riporta solo il picco più intenso di ogni spettro;
- UV-vis, che fornisce lo spettro di assorbimento nell'intervallo di lunghezze d'onda selezionato (da 190 a 750 nm) di tutte le masse rilevate in ogni punto del cromatogramma.
-

Tabella 4. Gradiente lineare utilizzato per la separazione dei polifenoli estratti da foglie di olivo. Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema LC-MS Q-TOF (Agilent Technologies).

Tempo (min)	Composizione della fase mobile (%)	
	A	B
0.00	95	5
4.00	91	9
7.00	88	12
8.00	85	15
9.00	84	15
14.00	80	20
15.00	78	22
18.00	72	28
19.00	70	30
20.00	69	31
21.50	68	32
23.00	66	34
24.00	65	35
25.00	60	40
27.00	50	50
30.00	0	100

35.00	0	100
37.00	95	5

Gli spettri UV sono stati acquisiti dal rilevatore DAD ogni 4 s nell'intervallo di lunghezze d'onda da 190 a 750 nm con una risoluzione di 2 nm. La sorgente di ionizzazione Dual ESI ha operato in modalità (MH⁺), e gli spettri di massa sono stati registrati nell'intervallo m/z 100-1600 come spettri *centroid*, con 3 scansioni al secondo. La correzione delle masse in tempo reale è stata realizzata utilizzando due standards, la purina (C₅H₄N₄ con m/z 121.050873, 10 µM) e hexakis (1H,1H, 3H-tetrafluoropentoxo-phosphazene) (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄ con m/z 922.009798, 2 µM). La soluzione contenete le masse di riferimento è iniettata direttamente in sorgente mediante una pompa isocratica operante ad un flusso costante di 0,060 ml/min.

I parametri utilizzati per lo spettrometro di massa sono i seguenti:

- voltaggio del capillare: 4000V
- voltaggio del *fragmentor*: 180 V
- *skimmer* 1: 45 V
- temperatura e flusso del *drying gas* (N₂): 350 °C; 11 l/min
- nebulizzatore: 45 psig
- volume di campione iniettato: 5 µl.

I parametri dello strumento sono stati gestiti dal software MassHunter Data Acquisition rev. B.05.01 (Agilent Technologies).

L'analisi dei dati ottenuti è stata inizialmente indirizzata alla valutazione delle differenze riscontrate nel metaboloma estratto da foglie di olivo trattate con i diversi ceppi o metaboliti di *Trichoderma* spp.. Questo tipo di analisi, definita *untargeted*, in quanto non legata all'identificazione di uno specifico metabolita o ad una classe di composti, consente di effettuare una discriminazione sugli effetti che i diversi trattamenti determinano in pianta in termini di composti differenzialmente accumulati rispetto ai controlli non trattati.

2.4.3. Elaborazione dei dati

Per determinare se e come i diversi trattamenti effettuati in campo hanno determinato cambiamenti sostanziali sul metaboloma delle foglie di olivo, si è proceduto con un'analisi bioinformatica attraverso l'impiego di software dedicati, compatibili con il sistema LC-MS Q-TOF utilizzato. Nello

specifico, l'identificazione dei composti fenolici è stata ottenuta utilizzando il software statistico Mass Profinder, che permette di confrontare i segnali dei picchi cromatografici ottenuti con i database in dotazione nel laboratorio (*in house* database, library METLINE dell'Agilent ed informazioni presenti in letteratura).

La quantificazione dei polifenoli è stata effettuata interpolando i dati ottenuti con una curva di calibrazione, costruita iniettando degli standards con lo stesso metodo utilizzato per i campioni reali. Gli standards utilizzati (Sigma) sono:

- oleuropeina per i secoiridoidi;
- idrossitirosolo per dei fenoli semplici;
- luteolina per i flavonoidi;
- apigenina.

Gli standards sono stati diluiti in un volume finale di 2 ml di una soluzione 50:50 MeOH/H₂O. Le rette di taratura ottenute sono riportate nella Figura 17, mentre le equazioni delle rette e gli intervalli di concentrazione utilizzati sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5. Parametri analitici relativi alle rette di taratura costruite per la quantificazione degli estratti.

Standard	Range [µg/ml]	Equazione della retta	r ²
Oleuropeina	0,625-25	$y = 3264818,79x + 8921367,34$	0,99
Luteolina	0,5-25	$y = 2750905,36x + 2774612,53$	0,99
Apigenina	0,5-50	$y = 1388397,18x + 7259647,69$	0,96
Idrossitirosolo	0,62-62,5	$y = 858369x + 1000000$	0,9961

L'analisi del profilo metabolico degli estratti è stata realizzata con l'ausilio di strumenti bioinformatici dell'Agilent Technologies:

- MassHunter Qualitative Analysis Software (versione B.06.00) - utilizzato per l'analisi qualitativa degli spettri di massa ottenuti (sono stati scelti i picchi cromatografici più intensi e risolti);
- MassHunter Quantitative Analysis Software (versione B.06.00) - utilizzato per la quantificazione degli standards esterni e dei polifenoli;
- Mass Profinder (versione 13.0) – utilizzato per selezionare i picchi caratteristici di ogni corsa;
- Mass Profiler (versione B.06.00) - utilizzato sia per l'analisi statistica che per l'identificazione dei polifenoli.

L'identificazione dei picchi cromatografici è stata realizzata confrontando i dati ottenuti con: a) un database costruito nel laboratorio, contenente informazioni su oltre 2000 metaboliti secondari

prodotti da piante; b) la library METLINE dell'Agilent, contenete oltre 15.000 metaboliti naturali e di e tri-peptidi; c) informazioni reperibili dai lavori presenti in letteratura.

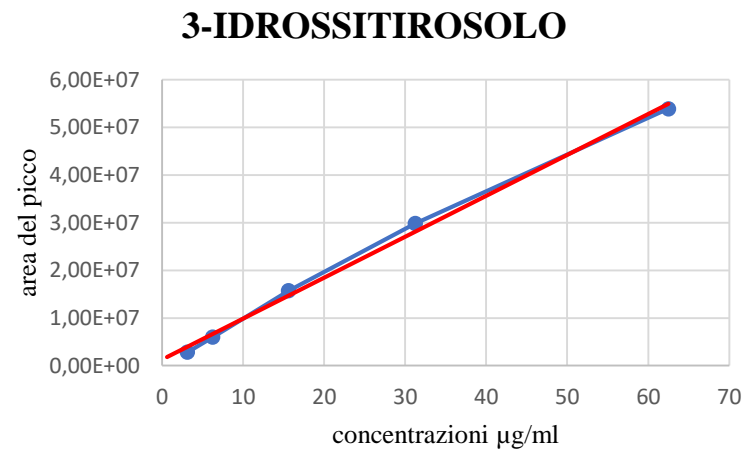
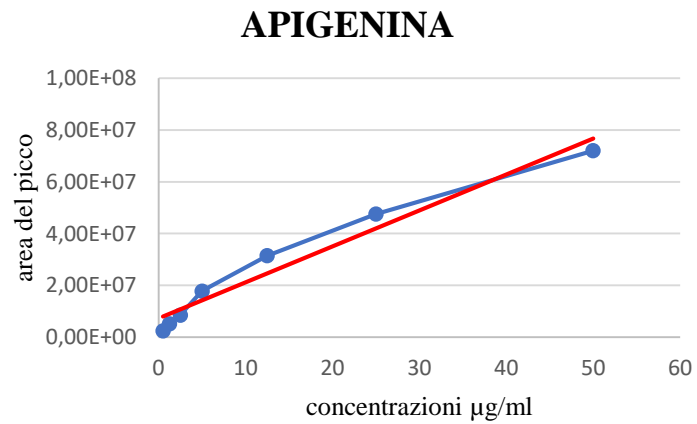
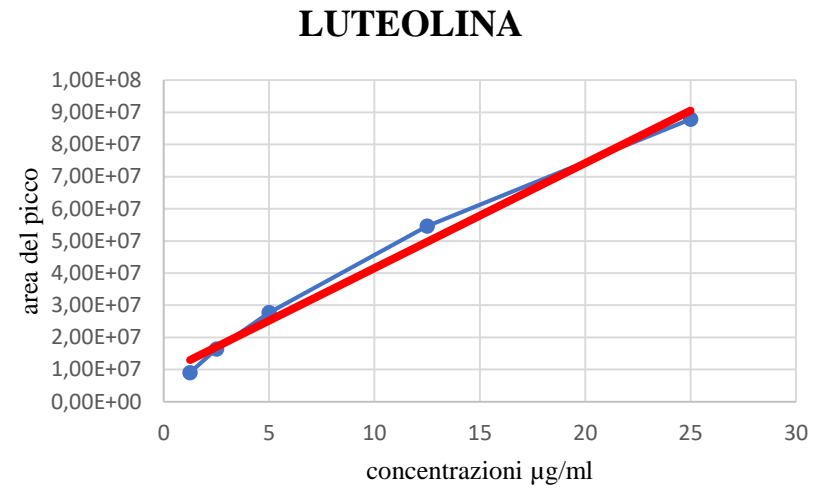
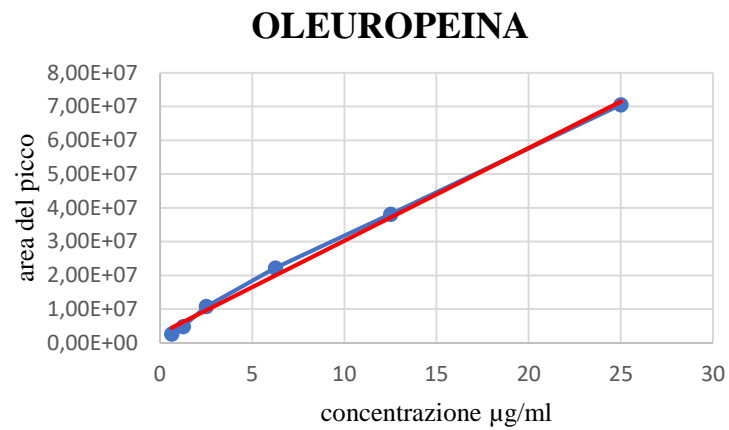


Figura 17. Rette di taratura relative agli standard commerciali dei polifenoli utilizzati per la quantificazione degli estratti da foglie di olivo.

2.5. Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) seguita dal confronto con il test Student Newman Keuls utilizzando il software SPSS (Statistics, v. 21). I dati relativi all'incidenza della malattia sono espressi come media \pm SD (Deviazione Standard). Il livello di significatività è stato impostato con $P < 0.05$.

3. RISULTATI

3.1. Effetto dei trattamenti sulla crescita vegetativa e sulla produzione di piante di olivo

Per la valutazione degli indici biometrici sono stati presi in considerazione la lunghezza dei rami ed il numero di foglie dopo sei mesi dall'inizio della sperimentazione.

I risultati ottenuti hanno evidenziato un incremento positivo della lunghezza dei rami per tutti i trattamenti rispetto alle piante del controllo, mentre, per quanto riguarda l'incremento del numero di foglie unicamente per i trattamenti con T22 e KV906 (Tab. 6). In particolare, le piante trattate con il ceppo T22 di *T. harzianum* hanno evidenziato un aumento significativo del 62% nel numero di foglie e del 55% nella lunghezza dei rami. Un altro trattamento che ha prodotto una promozione della crescita delle piante di olivo è stato quello effettuato con il ceppo KV906 di *T. asperellum*, con cui si è avuto il 2% in più di foglie ed il 42% in più in termini di lunghezza dei rami. Non sono da trascurare anche gli incrementi registrati utilizzando i metaboliti secondari. Infatti, HA e 6PP hanno incrementato rispettivamente del 18% e del 34% la lunghezza media dei rami.

Tabella 6. Incremento del numero di foglie e della lunghezza dei rami in piante di olivo trattate con ceppi o metaboliti del genere *Trichoderma*. I dati, raccolti dopo 6 mesi dall'inizio del I anno di sperimentazione (anno 2015), sono espressi come percentuali (%) rispetto al controllo. Gli asterischi (*) indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Fungo/metabolita	Trattamento	Incremento del numero di foglie	Incremento della lunghezza del ramo
<i>T. virens</i>	GV41	-	+6%
<i>T. harzianum</i>	M10	-	+7%
<i>T. harzianum</i>	T22	+62% *	+55% *
<i>T. harzianum</i>	TH1	-	+16% *
<i>T. asperellum</i>	KV906	+2%	+42% *
Acido harzianico	HA	-	+18% *
6-Pentil- α -pirone	6PP	-	+34% *

Al secondo anno, il diametro dei fusti ha subito un incremento crescente e graduale nel tempo per ciascun trattamento. In particolare, è stato riscontrato un incremento percentuale delle piante trattate con M10, TH1 e 6PP rispetto al controllo (Figura 18). Nel 2016 l'applicazione del trattamento KV906 non ha prodotto alcun tipo d'incremento, al contrario del 2017 in cui è stato registrato un aumento del diametro paragonabile a quello ottenuto con i trattamenti che hanno mostrato una performance migliore (M10, TH1 e 6PP). Gli incrementi registrati in entrambe le annualità non hanno però evidenziato variazioni significative.

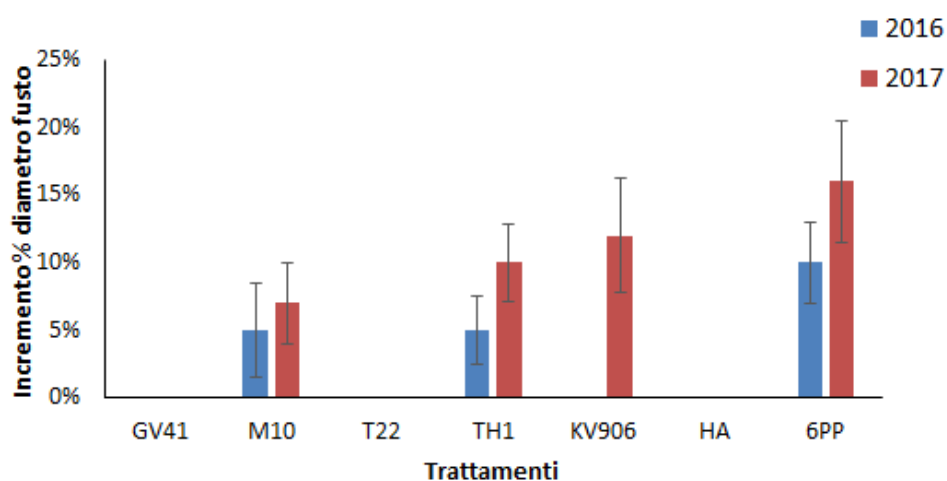


Figura 18. Incremento del diametro del fusto delle piante di olivo trattate con ceppi o metaboliti del genere *Trichoderma*. I dati, raccolti nel 2016 e nel 2017, sono espressi come percentuale (%) rispetto al controllo.

Inoltre, nell'anno 2017 (primo anno di produzione del frutto) è stato valutato il peso medio delle drupe per ciascun trattamento. I risultati riportati in Tabella 7, mostrano che i trattamenti con i ceppi GV41 e T22 e soprattutto con il metabolita secondario HA hanno avuto un effetto positivo sul peso medio delle drupe rispetto al controllo.

Tabella 7. Pesì medi delle drupe raccolte dal campo sperimentale nel corso del 2017. Le lettere indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Trattamento	Peso medio drupa (g)
GV41	8.10 ^b
M10	5.66 ^a
T22	7.61 ^b
TH1	6.63 ^a
KV906	5.90 ^a
6PP	6.12 ^a
HA	9.40 ^b
CTRL	5.85 ^a

3.2. Contenimento delle sintomatologie da *Fusicladium oleagineum*

Nel 2016, dopo un anno di applicazione dei trattamenti, è stata valutata l'incidenza in campo di infezioni naturali causate da *F. oleagineum*.

È stato riscontrato un progressivo aumento del numero di foglie recanti le tipiche lesioni provocate dal fungo, ovvero macchie circolari di color bruno, giallo o verde. Diversi trattamenti, sia quelli effettuati con metaboliti che con ceppi di *Trichoderma*, sono stati efficaci nel diminuire i sintomi della malattia rispetto alle piante malate del gruppo controllo (Figura 19). In particolare, dopo un anno di applicazione, le piante trattate con il metabolita 6PP o con i ceppi T22 e TH1 hanno manifestato una ridotta incidenza della malattia. Riduzioni meno significative sono state osservate a seguito delle applicazioni dei ceppi GV41 e M10, mentre risultati paragonabili al controllo sono stati registrati nelle tesi trattate con il metabolita HA e con il ceppo KV906.

Nel 2017, il 6PP si è confermato essere il trattamento più performante nel tempo. Tale dato è emerso anche dai dati rilevati nel 2018 (Figura 19). Per tale ragione il 6PP è stato selezionato per successivi ed ulteriori esperimenti. Nel 2018 i risultati migliori sono stati registrati nelle piante trattate con il metabolita secondario 6PP e con il ceppo KV906. Sebbene nel lungo termine tutti i trattamenti ad eccezione di M10 hanno avuto azione di contenimento statisticamente significativa rispetto al controllo (Figura 19).

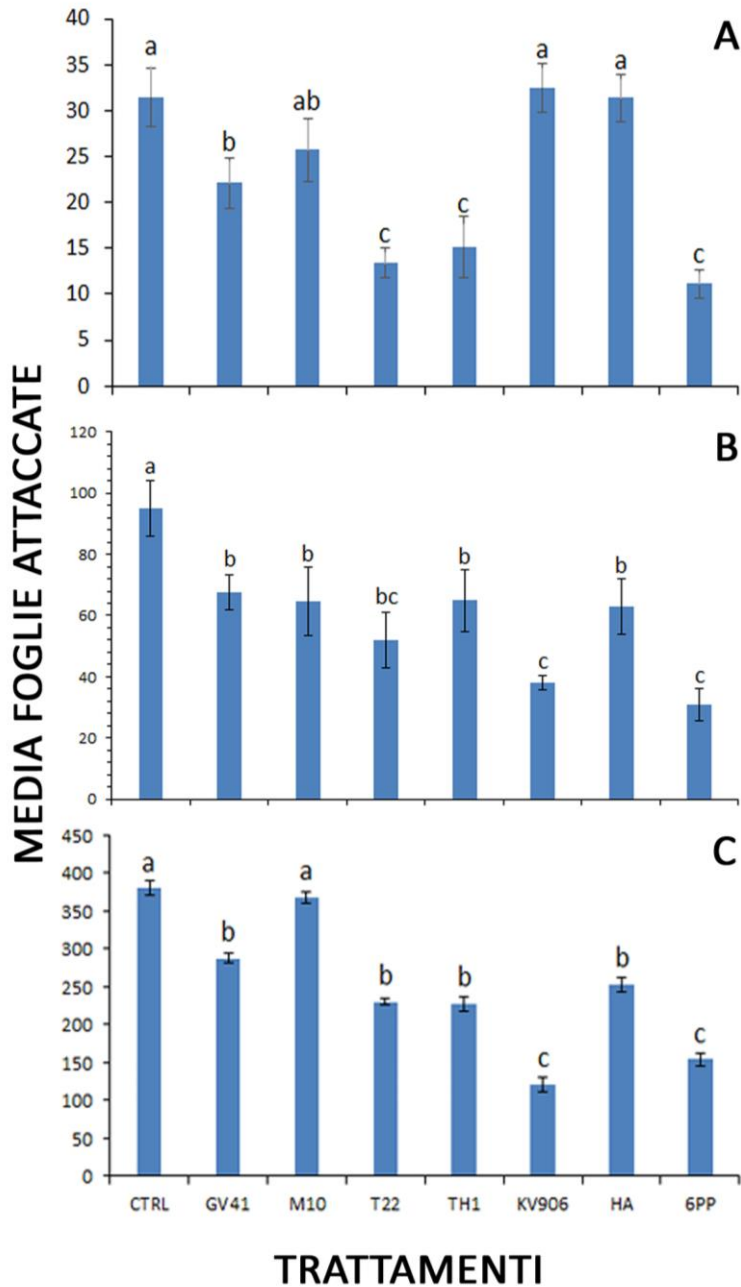


Figura 19. Numero medio di foglie di olivo attaccate da *Fusicladium oleagineum* contate per ciascun gruppo sperimentale negli anni 2016 (A), 2017 (B) e 2018 (C). CTRL= piante controllo trattate con acqua. Le lettere indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

La combinazione di trattamento al suolo con 6PP ed applicazione aerea del galattomannano di carrubo ha prodotto una riduzione considerevole dei sintomi della malattia sia rispetto al gruppo controllo che rispetto ai gruppi singolarmente trattati con 6PP o galattomannano di carrubo (Figura 20). In particolare, questi due ultimi gruppi di piante hanno prodotto risultati

paragonabili, dato che suggerisce l'efficacia del biopolimero utilizzato individualmente nella riduzione dei sintomi causati da *F. oleagineum*.

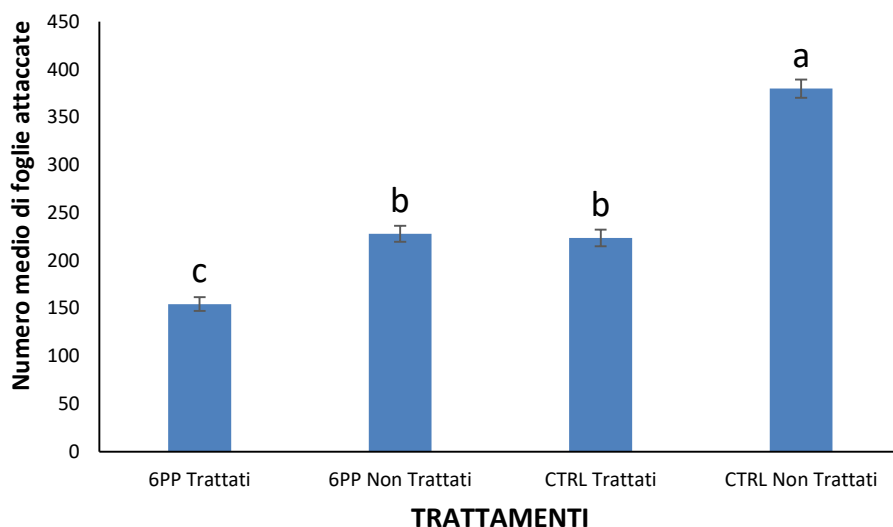


Figura 20. Numero medio di foglie di olivo attaccate da *F. oleagineum* su piante trattate con biopolimero di galattomannano di carrubo nel 2018. Le lettere indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Al fine di ottenere informazioni riguardo la distribuzione del biopolimero di carrubo sulla foglia di olivo è stata realizzata un'analisi al microscopio a scansione elettronica di campioni di foglie.

La figura 21-A mostra la presenza di un tricoma sulla superficie fogliare non colonizzata dal patogeno, come si evince dall'assenza dei conidi sulla lamina.

Dalla figura 21-B si evidenzia che il biopolimero di carrubo si presenta come agglomerati non omogeneamente distribuiti sullo stub.

In figura 21- C le osservazioni ultrastrutturali consentono di rilevare la presenza dei tricomi, dei conidi del fungo patogeno (*) e del biopolimero (+).

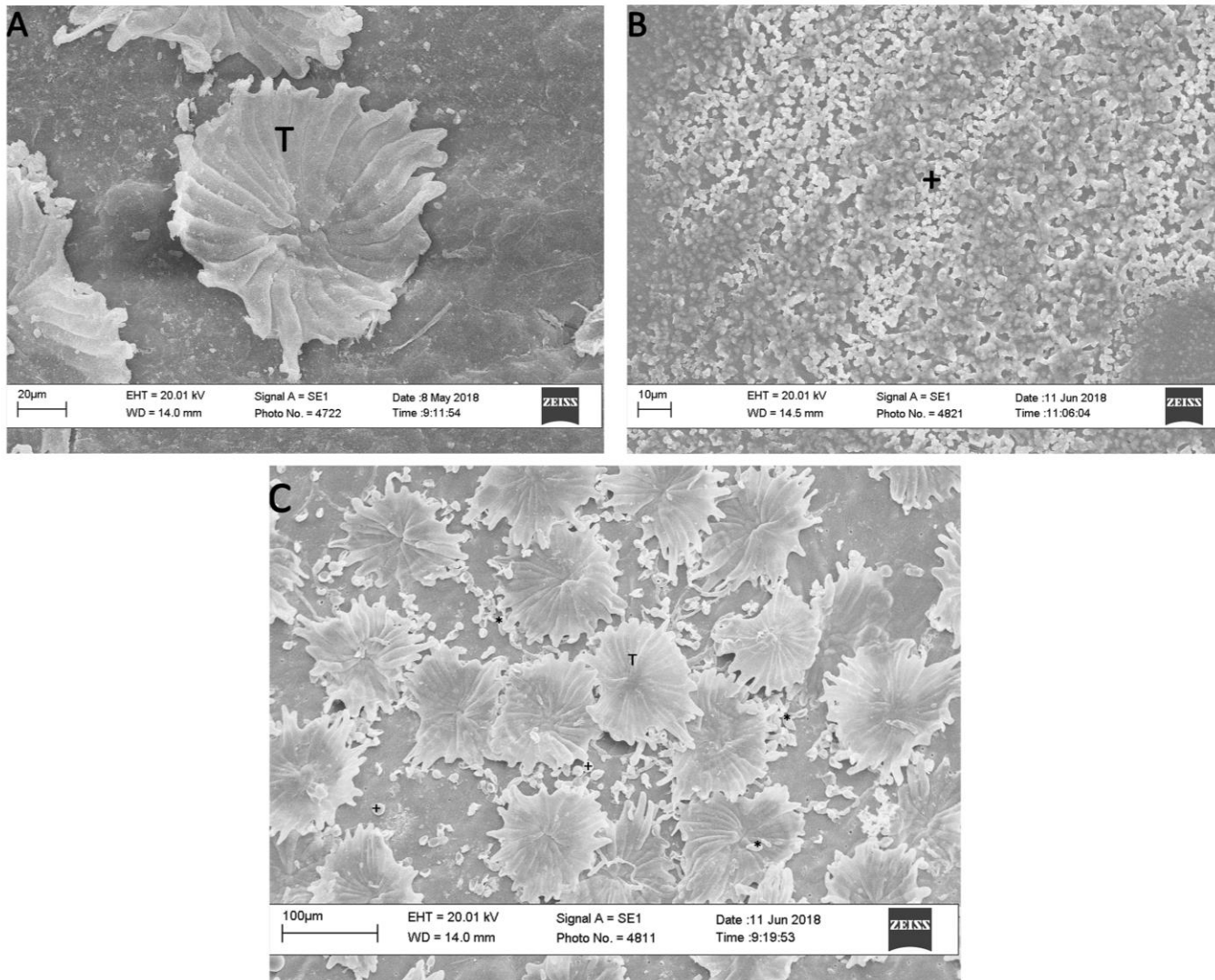


Figura 21. Immagini realizzate al SEM. **A)** tricoma (T) su Lamina fogliare in assenza del patogeno (tricoma, T); **B)** Stub ricoperto esclusivamente dal biopolimero di carrubo (+). **C)** Lamina fogliare in presenza di conidi fungini (*) e del biopolimero di carrubo.

3.3. Analisi dei profili cromatografici dei composti fenolici estratti da foglie

I composti fenolici estratti dalle foglie di olivo sono stati sottoposti ad analisi mediante sistema LC-MS Q-TOF.

Un esempio dei cromatogrammi ottenuti dall'analisi degli estratti da foglie di olivo è riportato in Figura 22.

Dall'analisi dei cromatogrammi ottenuti per i vari campioni è emerso che la separazione cromatografica è stata ottimale, garantendo la presenza di picchi risolti e rilevabili (intensità della TIC > 10⁵). Dopo una prima analisi non sono state rilevate significative differenze in termini di presenza e/o assenza di composti tra i diversi trattamenti. Tuttavia, le aree sottese ai picchi cromatografici, rilevati sia in TIC (rilevatore spettrometro di massa) che in DAD (rilevatore *diode array*), hanno mostrato interessanti differenze.

L'analisi bioinformatica ha permesso di identificare i picchi presenti nei cromatogrammi e, quindi, di individuare i 21 polifenoli presenti nei campioni, come riportato in Tabella 8. Tale identificazione, è stata inoltre confermata e validata mediante il confronto con alcuni standards commerciali di polifenoli: oleuropeina, apigenina, luteolina ed idrossitirosolo. Le corse effettuate utilizzando i suddetti standards hanno dato come risultato tempi di ritenzione e parametri cromatografici paragonabili a quelli presenti negli estratti esaminati. Inoltre, questi composti hanno evidenziato gli stessi segnali di massa (MS) ed UV/Vis (DAD).

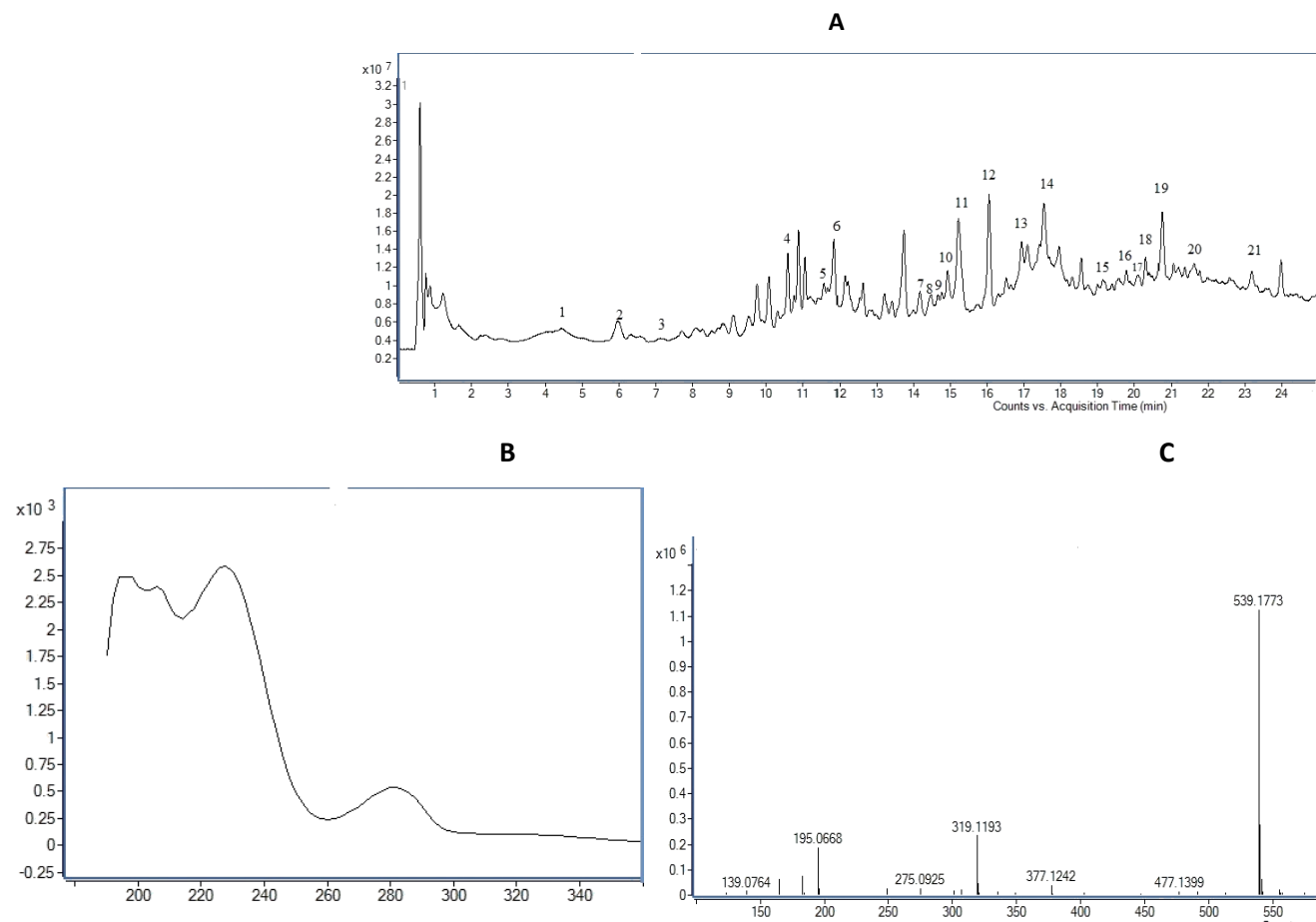


Figura 22. Esempio di cromatogrammi ottenuti dall'analisi effettuata utilizzando il sistema LC-MS Q-TOF sugli estratti di foglie di olivo. A) TIC; B) Oleuropeina UV-vis; C) BPC Oleuropeina I numeri posti sui vertici dei picchi si riferiscono ai composti identificati in Tabella 8.

Tabella 8. Elenco dei composti identificati nei cromatogrammi ottenuti dagli estratti delle foglie di olivo. I dati presentati includono: numero del composto (così come riportato in Fig. 22), tempo di ritenzione (RT, espresso in minuti), il nome del composto, la classe del composto, la formula chimica, la massa sperimentale e quella teorica, la lunghezza d'onda (espressa in nm) del picco massimo di assorbimento di ciascun composto.

N.	RT (min)	Composto	Classe*	Formula	Massa sperimentale (g/mol)	Massa teorica (g/mol)	UV max (nm)
1	4,75	Idrossitirosolo esoso	3	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	316,11	315,10	227; 279
2	6,33	Oleoside metil estere	4	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404,13	404,36	190
3	7,45	Secologanoside	4	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390,11	390,34	234
4	10,9	Oleuropeina aglicone	1	C ₁₆ H ₂₆ O ₁₆	378,15	378,38	235; 271
5	11,84	Acido elenolico glucoside	5	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404,13	404,12	248; 274
6	11,90	Luteolina rutinoside is. a	2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594,15	594,52	248; 267
7	14,55	Verbascoside	1	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624,20	624,59	234; 329
8	14,60	Rutina	2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15	610,52	253
9	14,90	Luteolina rutinoside	2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594,15	594,52	253; 347
10	15,18	Crisoeriol 7-O-glucoside	5	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	462,14	462,40	250; 347
11	15,81	2-metossi-oleuropeina	1	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₄	570,19	570,17	236; 280
12	16,90	Apigenina rutinoside	2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	578,16	578,16	237; 266
13	17,40	Apigenina glucoside	2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,10	432,38	345

Tabella 8. Continuo

N.	RT (min)	Composto	Classe*	Formula	Massa sperimentale (g/mol)	Massa teorica (g/mol)	UV max (nm)
14	17,90	Oleuropeina diglucoside	1	C ₃₁ H ₂₄ O ₁₈	702,24	702,66	235; 277
15	19,10	Oleuropeina isomero a	1	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	540,18	540,18	242; 280
16	19,89	Oleuroside	1	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	540,18	540,51	234; 280
17	20,10	Oleuropeina isomero b	1	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	540,18	540,18	236; 280
18	20,52	Ligstroside	1	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	524,19	524,52	230; 279
19	20,93	Apigenina	2	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,05	270,24	197
20	20,80	Luteolina	1	C ₁₅ H ₃₅ O ₁₄	286,04	286,05	237; 286
21	23,28	Crisoeriololo	5	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300,06	300,26	198

* 1= secoridoidi; 2= flavonoidi; 3 = fenoli semplici; 4= oleosidi; 5= derivati dell'acido elenolico.

3.3.1. Analisi metabolomica dei composti fenolici estratti dalle foglie di olivo

3.3.2. Metabolomica *untargeted*

L'analisi metabolomica *untargeted* è stata realizzata prendendo in esame i campioni di foglie raccolti nel mese di agosto negli anni 2015, 2016 e 2017. L'analisi di questi campioni ha consentito di rilevare l'effetto cronico che i trattamenti in campo hanno avuto sul profilo metabolico degli estratti ottenuti.

L'analisi dei dati relativi agli anni 2015, 2016 e 2017 ha evidenziato, rispettivamente, la presenza di 88, 136 e 96 composti differenzialmente accumulati nelle piante trattate ($p < 0,05$) rispetto a quelle controllo.

Tra i composti con accumulo differenziale, 23, 131 e 87 hanno subito una variazione quantitativa consistente (Fold Change-FC ≥ 2.0 ; Tab. 9.) negli anni 2015, 2016 e 2017, rispettivamente.

Dalla tabella 9 è possibile osservare come nei primi due anni di sperimentazione sia aumentato il numero dei composti down regolati, a seguito dei trattamenti effettuati in campo. Questa tendenza si è invertita nel 2017 per tutti i trattamenti, fatta eccezione per GV41, il numero di composti down regolati è diminuito. Per quanto riguarda il numero di composti up regolati, è interessante notare che per i trattamenti effettuati con i ceppi M10 e KV906 e con i metaboliti HA e 6PP, è stata rilevata una tendenza all'aumento dei composti up regolati durante tutto l'arco temporale dell'esperimento. Di particolare interesse è anche l'effetto del trattamento effettuato con TH1 sul metaboloma delle foglie. Esso, infatti, al contrario di tutti gli altri è apparso uguale al controllo in termini di composti ad accumulo differenziale dopo il primo anno di sperimentazione, salvo poi produrre un accumulo di composti up e down regolati paragonabile a quello ottenuto con gli altri trattamenti negli anni seguenti. (Tabella 9).

Tabella 9. Numero di metaboliti la cui produzione è aumentata (UP) o diminuita (DOWN) rispetto al controllo (CTRL) a seguito dei trattamenti eseguiti in campo con i ceppi o metaboliti di *Trichoderma* nel mese di agosto del 2015, 2016 e del 2017.

Trattamenti	UP vs. CTRL			DOWN vs. CTRL		
	2015	2016	2017	2015	2016	2017
GV41	3	26	15	1	29	31
M10	1	24	20	7	44	19
T22	2	34	21	3	52	27
TH1	-	17	18	-	52	24
KV906	1	6	24	5	44	21
HA	1	25	35	9	38	18
6PP	2	7	18	15	54	14

In figura 23 si riportano i dendrogrammi ottenuti raggruppando i trattamenti sulla base dell'abbondanza delle variabili continue (Hierarchical Clustering). Tali dendrogrammi mostrano graficamente le differenze dei profili metabolici delle piante trattate rispetto a quelle del controllo.

In particolar modo, nel 2015 i composti presi in esame delle piante trattate con i metaboliti 6PP e HA o con il ceppo M10 (produttore di HA) hanno formato un cluster distinto e separato da quello in cui si trova il gruppo controllo (Fig. 2-A). Invece, nel 2016 i ceppi M10 e T22 insieme al metabolita secondario HA hanno mostrato una maggiore differenza rispetto al controllo (Fig. 23-B). Nel 2017, i ceppi GV41 e T22 ed il metabolita HA hanno evidenziato una significativa differenza rispetto al controllo (Fig. 23-C).

Al contrario, i trattamenti che hanno determinato minori variazioni nel metaboloma della pianta rispetto a quello delle piante non trattate, nel 2015 e nel 2016, sono risultati rispettivamente quelli con i ceppi TH1 e GV41. Mentre nel 2017, i trattamenti più simili al controllo sono stati M10 e TH1 (Fig. 23). Inoltre, nella heat-map riportata in Fig. 24, l'abbondanza di ciascun composto viene indicata con un colore in una scala che va dal blu al rosso; questa visualizzazione consente una rapida interpretazione dei dati, mostrando in rosso i composti che hanno valori di abbondanza > 0 ed in blu quelli con abbondanza < 0 . Come già emerso dai dati riportati nella Tabella 9, i metaboliti analizzati e risultati essere significativamente differenziali fra i trattamenti sono soprattutto quelli down regolati (abbondanza < 0 , evidenziati in blu).

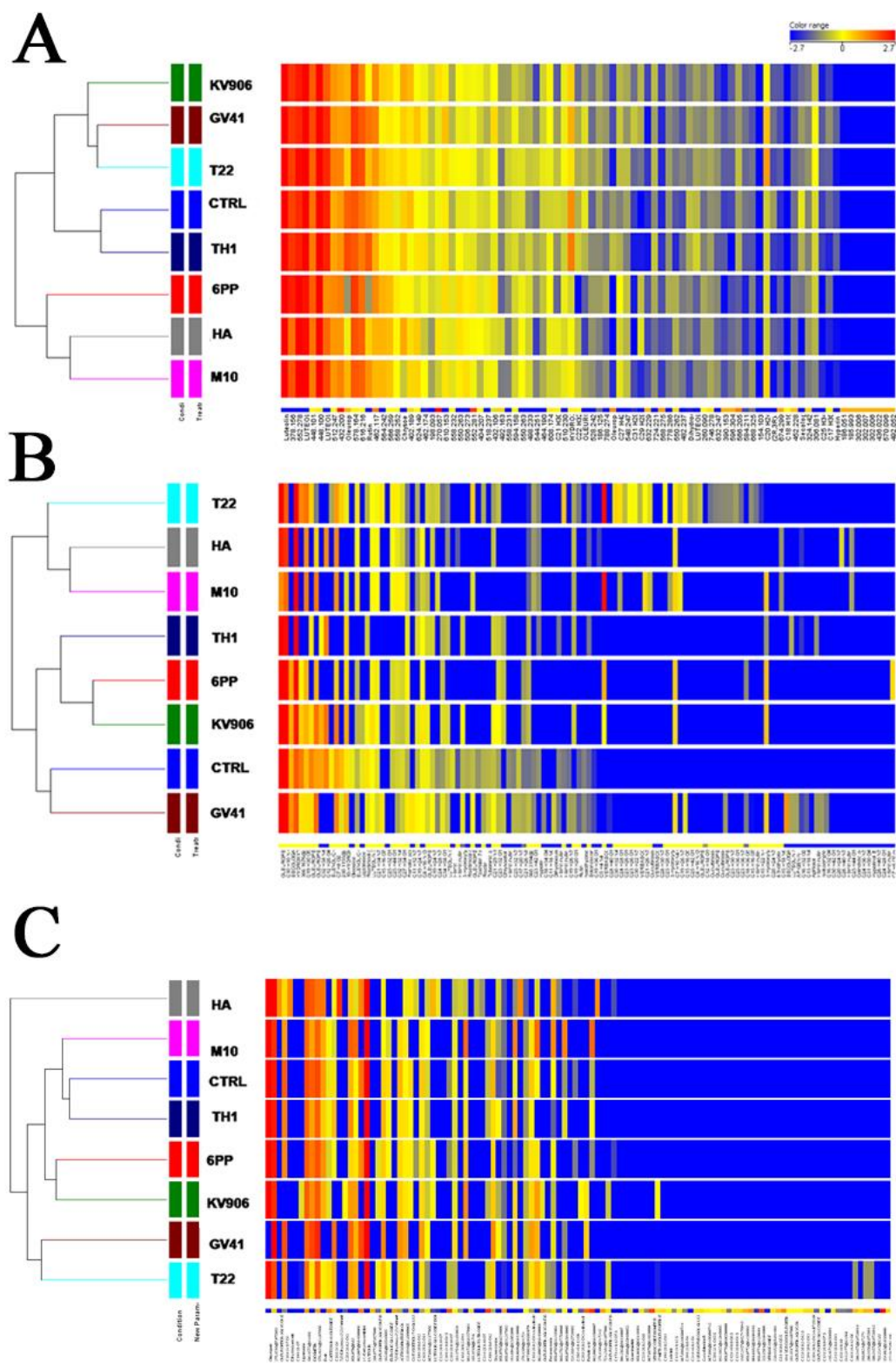


Figura 23. Raggruppamento gerarchico (*Hierarchical clustering*) del mese di agosto negli anni 2015 (A), 2016 (B) e 2017 (C) ottenuto comparando i profili metabolomici differenziali delle piante trattate con i ceppi o metaboliti di *Trichoderma* rispetto al controllo (CTRL). I profili metabolomici differenziali sono distribuiti in un dendrogramma (albero gerarchico, a sinistra), mentre l'abbondanza relativa dei metaboliti differenziali sono suddivisi in righe, una per ciascun trattamento (a destra). Il range di colori dal blu al rosso mostra come variano le concentrazioni dei diversi polifenoli rispettivamente dal meno abbondante al più abbondante.

I trattamenti con M10, T22 e HA sono stati selezionati per le seccessive elaborazioni rappresentate nei diagrammi di Venn (Fig. 24) in quanto hanno evidenziato le differenze maggiormente significative nel corso degli anni di sperimentazione.

Per il 2015, tra i metaboliti down regolati rispetto al controllo (Fig. 24- D), 2 composti sono presenti in tutti e tre i trattamenti, mentre 5 sono presenti esclusivamente nel metaboloma delle piante trattate con HA, 4 in quelle trattate con M10 e 0 con T22. È interessante sottolineare la presenza di 1 metabolita in comune tra quelli differenzialmente accumulati dai trattamenti effettuati con i metaboliti HA e T22 e M10 e HA, mentre nessuno in comune tra M10 e T22. Meno numerosi risultano, invece, i metaboliti differenziali la cui intensità è incrementata rispetto al controllo nei tre trattamenti esaminati: tra questi solo 1 è in comune al trattamento con M10 e T22. (Fig. 24-A).

É possibile osservare dal diagramma di Venn in Fig. 24-B e E che nel confronto M10-T22-HA, relativo ai dati di agosto 2016, tra i metaboliti la cui produzione è diminuita rispetto al controllo (Fig. 24-E), vi sono 28 composti comuni a tutte le tesi, 6 tra il ceppo M10 ed il suo metabolita secondario HA, 6 tra i due ceppi T22 e M10, 3 tra il ceppo T22 ed il metabolita HA. Invece, 1 metabolita è presente solo negli estratti ottenuti dal trattamento con HA, 4 dal trattamento con M10 e 15 dal trattamento con T22 (Fig. 24-E). Tra i metaboliti up-regolati (Fig. 24-B) 11 composti sono comuni a tutti i trattamenti, 3 tra M10-HA, 5 tra M10-T22, 2 tra T22-HA mentre 9 sono presenti esclusivamente in HA, 5 in M10 e 16 in T22.

Le figure 24 C e F sono relative ad agosto 2017. Nel confronto M10-T22-HA tra i metaboliti down regolati si osservano 4 composti in comune a tutti i trattamenti, 2 tra M10-HA, 12 tra M10.T22, 2 tra T22-HA, 1 composto è presente solo in M10, 9 in T22 e 10 in HA (Fig. 24-F). Invece, per gli UP regolati 3 composti sono in comune alle tre tesi, M10-HA, M10-T22 e T22-HA, mentre 26 sono presenti solo in HA, 11 in M10 e 12 in T22.

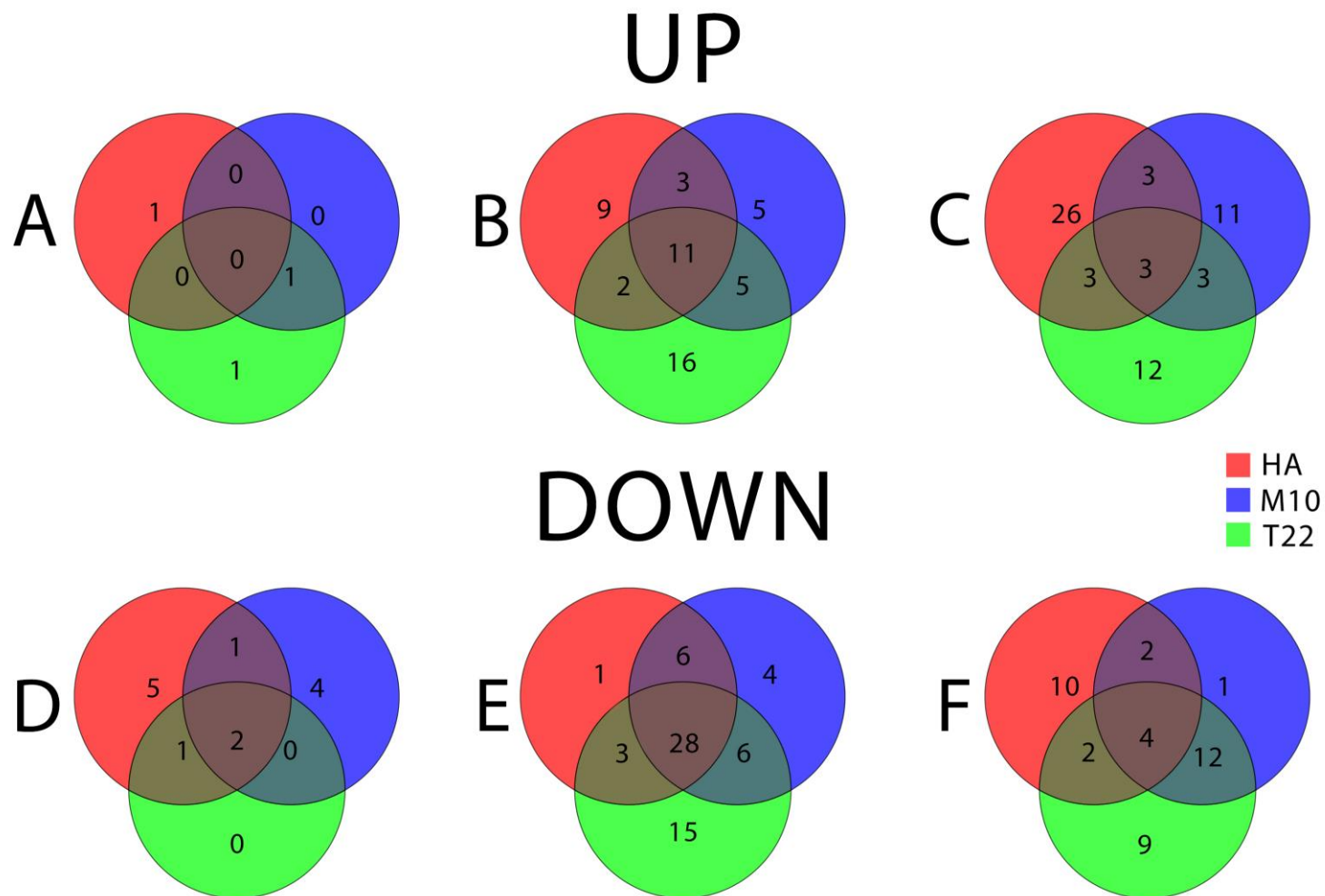


Figura 24. Diagrammi di Venn relativi al numero di composti fenolici la cui intensità nel metaboloma delle foglie di olivo trattate con HA (in rosso), M10 (in blu) o T22 (in verde) è diminuita nel 2015 (D), 2016 (E) e 2017 (F) o aumentata nel 2015 (A), 2016 (B) e nel 2017 (C) rispetto al controllo.

3.3.3. Analisi metabolomica *targeted*

Accanto all'approccio *untargeted*, che consiste nell'analisi generale di tutti i metaboliti presenti in un campione, è possibile eseguire un'analisi metabolomica di tipo *targeted*, rivolta alla quantificazione di gruppi definiti di composti, in modo da evidenziare eventuali associazioni tra composti diversi e, nel caso specifico degli esperimenti condotti durante questo lavoro, verificare la relazione tra la loro produzione ed il trattamento effettuato in campo con microrganismi benefici o loro metaboliti secondari.

L'andamento dei composti è stato monitorato per i diversi trattamenti ed ha riguardato alcuni dei composti più significativi tra quelli emersi dall'analisi *untargeted* descritta nel paragrafo precedente appartenenti alla classe dei secoiridoidi (oleuropeina ed oleuropeina aglicone) e flavonoidi (luteolina).

L'analisi mirata dell'abbondanza dei composti identificati ha consentito di valutare se i trattamenti realizzati avessero un effetto sui singoli composti o gruppi di essi. I risultati ottenuti sono riportati in base alla classe di appartenenza del composto e sono espressi come milligrammo di composto per grammo di foglie disidratate. La quantificazione è stata realizzata utilizzando rette di taratura costruite con standards esterni di oleuropeina (utilizzata per i composti appartenenti alla classe dei secoiridoidi) e di luteolina (utilizzata per i composti appartenenti alla classe dei flavonoidi).

- Secoiridoidi

L'Oleuropeina, il principale componente delle foglie di olivo, è risultata il metabolita più abbondante tra quelli presi in esame. Il contenuto di oleuropeina ha mostrato un andamento variabile nei tre anni presi in esame (Fig. 25). In particolare, nel 2015 l'abbondanza di tale composto è risultata maggiore nei mesi di giugno e luglio. A giugno è stato registrato un incremento nel contenuto di oleuropeina per i trattamenti GV41, T22 e HA; al contrario a luglio l'abbondanza maggiore è risultata relativa ai trattamenti TH1 e 6PP che però non hanno mostrato differenze significative rispetto al controllo. Nel 2016 l'andamento è simile al 2015 leggermente al di sotto in termini di concentrazione. Nel mese di luglio è stato rilevato un incremento in termini di contenuto di oleuropeina per i trattamenti GV41 e T22. Al contrario, per i trattamenti sopra citati è stato osservato un brusco calo nel mese di agosto, periodo nel quale l'oleuropeina è risultata maggiore nel controllo e nelle piante trattate con HA. L'analisi relativa al mese di settembre ha invece

evidenziato un incremento nel contenuto di tale composto solo nelle piante trattate con il ceppo KV906. Per quanto riguarda l'ultimo campionamento effettuato nel mese di ottobre relativamente all'anno 2016, il maggior accumulo si è registrato col trattamento effettuato con il ceppo TH1 ma, incrementi significativi sono stati rilevati anche in seguito ai trattamenti con GV41, T22, HA e 6PP. Nel 2017 il grafico ha evidenziato un andamento a campana, totalmente diverso e con una maggiore concentrazione del metabolita secondario rispetto ai due anni precedenti. M10, TH1, KV906 ed il metabolita secondario 6PP sono risultati i trattamenti che hanno determinato un maggiore accumulo nel mese di giugno. Al contrario, a luglio è stata osservata una brusca diminuzione nella produzione di questo fenolo per poi risalire ad agosto soprattutto con i trattamenti con il ceppo M10 e con i due metaboliti secondari HA e 6PP. A settembre e a dicembre si registra nuovamente un calo nella produzione di oleuropeina per poi incrementarsi considerevolmente ad ottobre, soprattutto per trattamenti con M10, T22, TH1 e KV906.

Oleuropeina

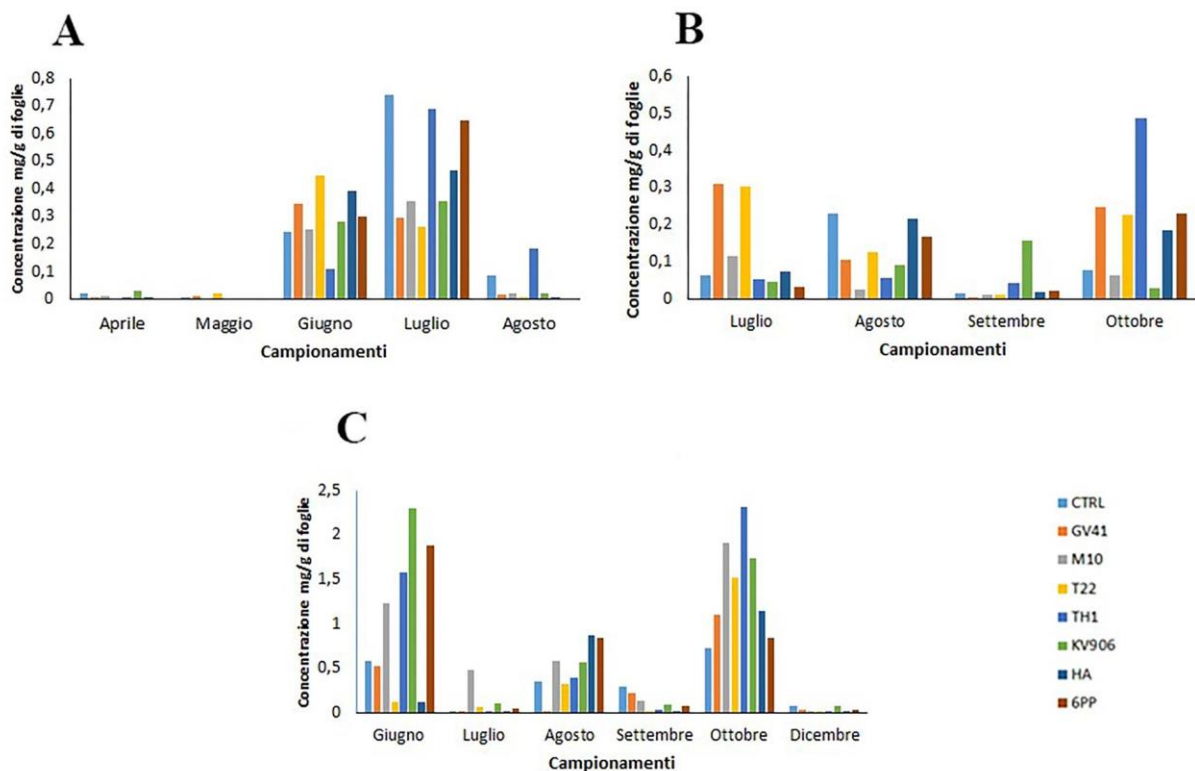


Figura 25. Andamento della concentrazione di oleuropeina nei campioni di foglie prelevati negli anni di sperimentazione. A=2015 B=2016 C=2017.

L'Oleuropeina aglicone è un metabolita prodotto in seguito all'idrolisi dell'oleuropeina. L'aglicone dell'oleuropeina è presente in concentrazione variabile ma significativa nell'olio e contribuisce a conferirgli il tipico gusto amaro. Esso è anche il precursore di una molecola più semplice, l'idrossitirosolo, che si produce a seguito di una seconda idrolisi e che è uno dei più potenti antiossidanti, con un ruolo efficace in vivo nella prevenzione di diverse malattie croniche e dismetaboliche.

Nel 2015 l'andamento della concentrazione di questo composto nei campioni esaminati ha seguito un andamento analogo a quello del composto di origine. A seguito dei primi due trattamenti effettuati nei mesi di aprile e maggio, l'oleuropeina aglicone si è accumulata in maniera simile in tutti i campioni esaminati (Fig. 26). Nei campioni raccolti all'inizio dell'estate, invece, si è osservato un incremento, rispetto al controllo, nel contenuto di questo composto relativamente ai trattamenti effettuati con i ceppi KV906, M10 e T22 o con il metabolita 6PP. I valori di concentrazione sono poi tornati ai livelli iniziali al termine delle sperimentazioni, pur mantenendo nelle foglie di olivo trattato con i ceppi TH1 e M10 o con il 6PP dei valori superiori rispetto al controllo.

Nel 2016 la produzione è simile all'anno precedente. A luglio la maggiore concentrazione dell'oleuropeina aglicone rispetto al controllo si è avuta con il 6PP. Ad agosto i migliori trattamenti sono risultati essere GV41, M10 e T22, mentre a settembre TH1 e KV906.

Nel 2017 l'oleuropeina aglicone ha mostrato una diminuzione di concentrazione rispetto agli anni precedenti. Ad aprile la concentrazione di questo metabolita è in genere molto bassa per tutti i trattamenti ciò si è verificato anche nel mese di agosto. I mesi di maggiore produzione sono stati luglio, settembre, ottobre e dicembre. A luglio tutti i trattamenti hanno determinato una maggiore produzione di oleuropeina aglicone. I trattamenti migliori sono stati TH1, KV906 e 6PP.

Il trattamento che ha fatto registrare una maggiore concentrazione rispetto al controllo è quello effettuato con il ceppo TH1. A settembre l'abbondanza risulta essere maggiore ed associata ai trattamenti M10 e KV906 contrariamente ad ottobre in cui è stata registrata una maggiore concentrazione del metabolita HA. A dicembre, infine, si è verificata una maggiore abbondanza di tale composto nei trattamenti con M10 e HA.

Oleuropeina aglicone

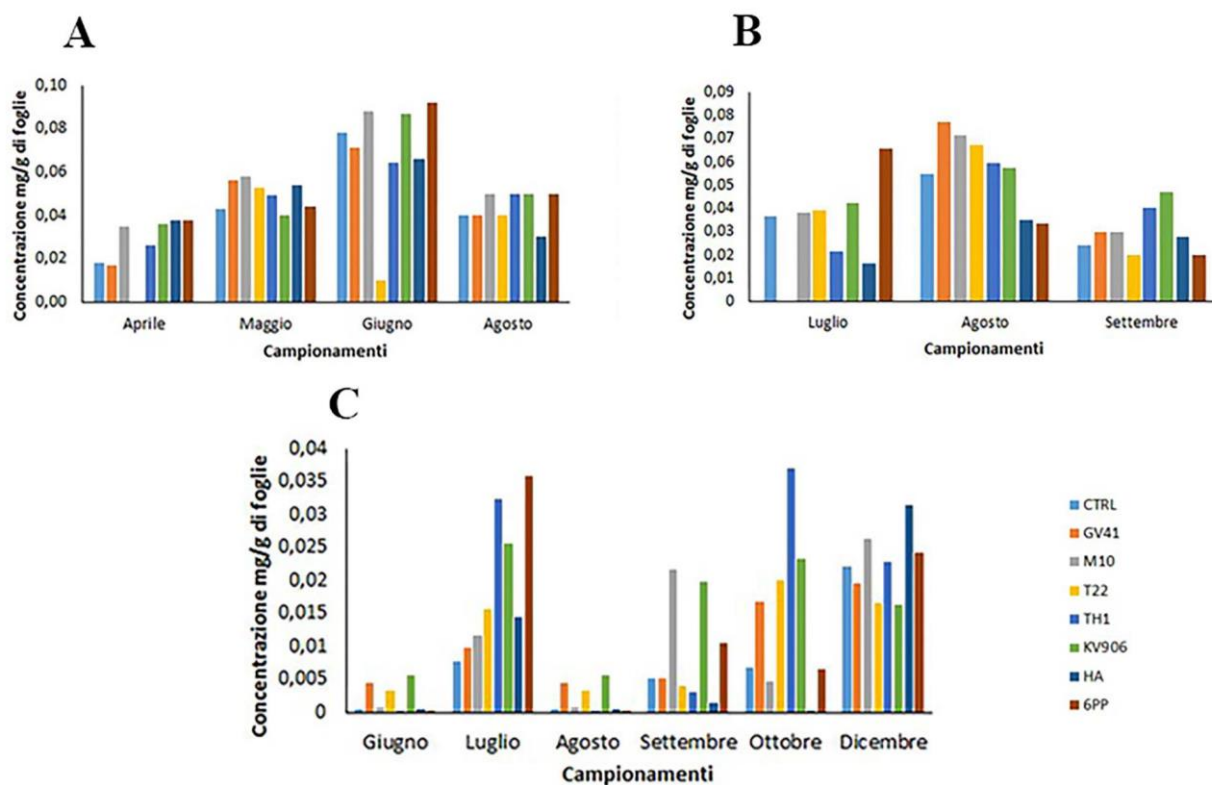


Figura 26. Andamento della concentrazione di oleuropeina aglicone nei campioni di foglie prelevati negli anni di sperimentazione. A=2015 B=2016 C=2017

- Flavonoidi

La Luteolina è uno dei composti fenolici più rappresentativi della classe dei flavonoidi presente nei campioni esaminati (Fig. 27).

Nel 2015 l'andamento della concentrazione di questo composto ha subito un incremento nel mese di giugno (dopo quindi 3 trattamenti in campo), per poi ridursi nei due mesi successivi. Tuttavia, nessuno dei trattamenti effettuati in campo ha determinato un maggior accumulo di luteolina rispetto al controllo (se non in alcuni campionamenti), mentre più spesso è stata notata una diminuzione del contenuto di questo composto. Ad esempio, nei campioni raccolti a giugno il quantitativo di luteolina era nettamente inferiore nelle foglie delle piante trattate con i ceppi M10, KV906 e GV41 rispetto al controllo, mentre in quelle trattate con i metaboliti la concentrazione era raddoppiata.

Nel 2016 invece sono stati diversi i trattamenti che hanno mostrato una maggiore produzione di questo metabolita. Nei mesi di luglio e agosto la concentrazione del flavonoide preso in esame è

stata abbastanza omogenea per i vari trattamenti rispetto al controllo, mentre a settembre i trattamenti con KV906 e col 6PP hanno mostrato una maggiore abbondanza rispetto al controllo. Ad ottobre si è registrata una maggiore produzione di luteolina rispetto agli altri mesi per tutti i trattamenti. escluso per il trattamento effettuato con TH1.

Nel 2017 il maggior accumulo si è verificato a luglio con i trattamenti col ceppo TH1 e con i due metaboliti secondari HA e 6PP. Ad agosto solo HA ma mostrato un maggior contenuto di luteolina rispetto al controllo. A settembre il contenuto di luteolina ha subito un incremento rispetto al controllo per i trattamenti con M10, T22, TH1 e con il metabolita 6PP, mentre ad ottobre il maggior accumulo si è verificato nei trattamenti con GV41 e con HA.

Luteolina

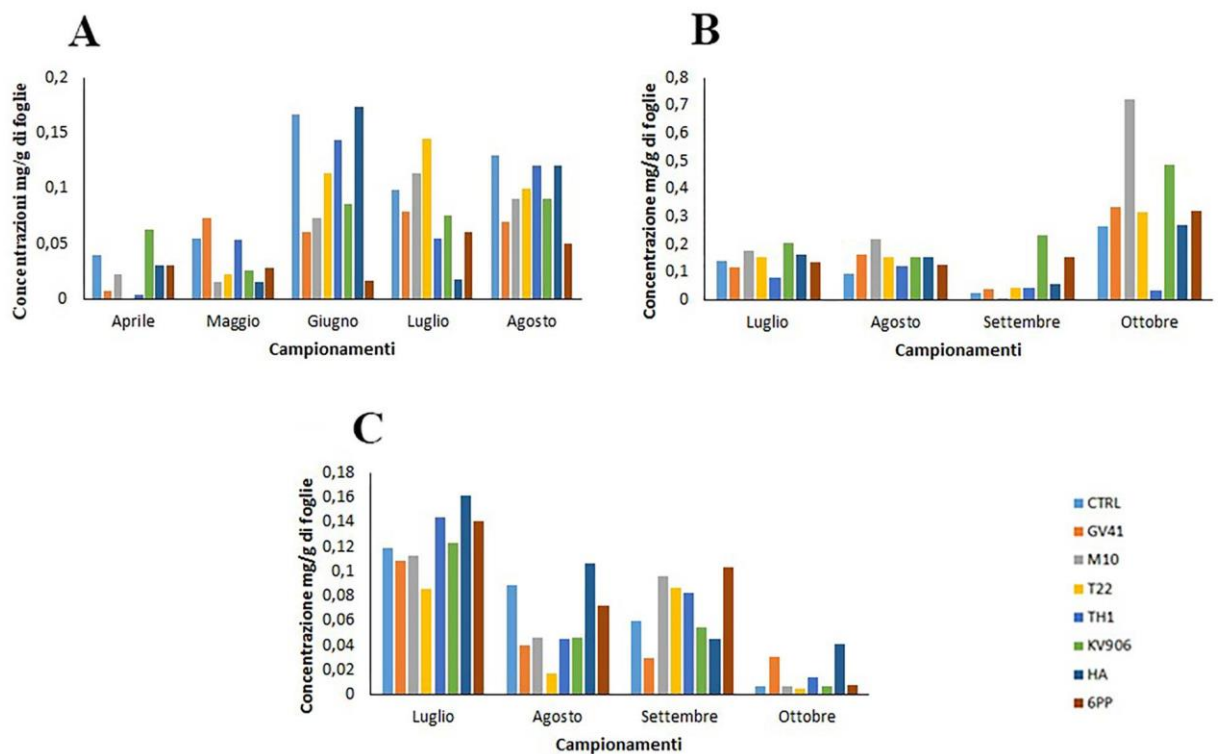


Figura 27. Andamento della concentrazione di luteolina nei campioni di foglie prelevati da aprile ad agosto provenienti da piante di olivo sottoposte in campo ai diversi trattamenti biologici. A=2015 B=2016 C=2017

3.3.4. Analisi dei profili metabolici dei composti fenolici estratti dalle drupe

Nel 2017 sono state effettuate le analisi di metabolomica *untargeted* sulle olive raccolte dalle piante del campo sperimentale. Tra i composti con accumulo differenziale 90 hanno subito una variazione quantitativa consistente (Fold Change-FC \geq 2.0; Tabella 10).

Dalla tabella 10 si può notare come, anche nel caso delle drupe, vi è stata una tendenza di aumento nel numero nei composti down regolati. In generale, è stato osservato un numero maggiore di composti la cui abbondanza è risultata minore se paragonati al controllo. Per quanto riguarda i composti la cui abbondanza è risultata maggiore rispetto al controllo, il metabolita 6PP e i ceppi GV41 e KV906 sono risultati i trattamenti in grado di influenzare maggiormente la risposta metabolica nella drupa.

Tabella 10. Numero di metaboliti la cui produzione è aumentata (UP) o diminuita (DOWN) rispetto al controllo (CTRL) sulle drupe raccolte nel 2017.

	UP vs. CTRL	DOWN vs. CTRL
<i>GV41</i>	21	30
<i>M10</i>	16	44
<i>T22</i>	10	38
<i>TH1</i>	16	35
<i>KV906</i>	21	44
<i>HA</i>	12	36
<i>6PP</i>	28	39

In figura 28 come già visto con gli estratti delle foglie si riportano i dendrogrammi ottenuti raggruppando i trattamenti sulla base dell'abbondanza delle variabili continue (*Hierarchical Clustering*).

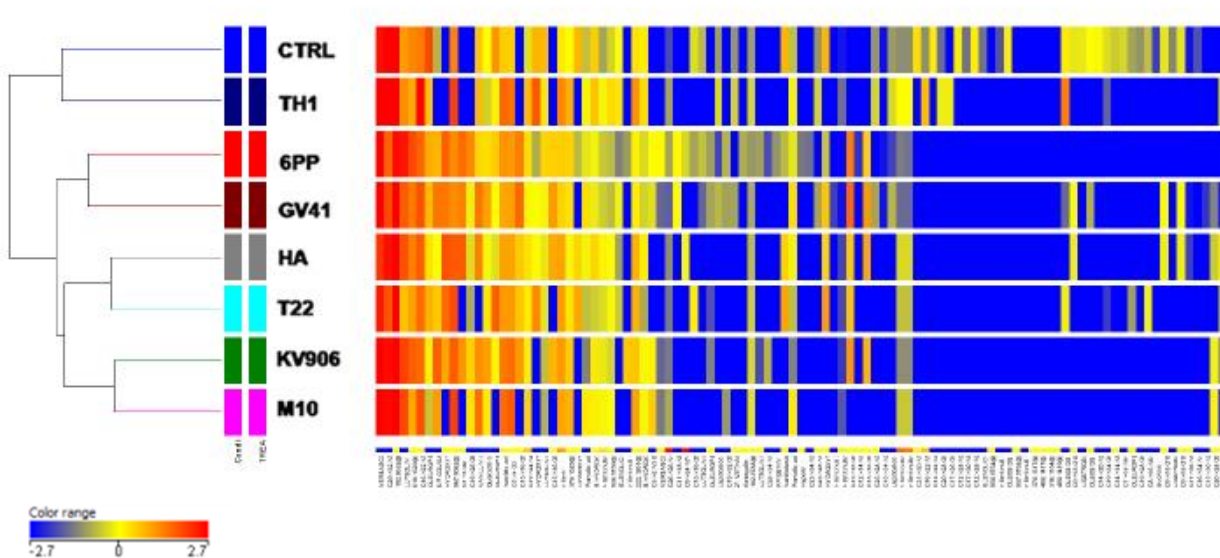


Figura 28. Raggruppamento gerarchico (*Hierarchical clustering*) ottenuto comparando i profili metabolomici differenziali delle drupe delle piante trattate con i ceppi o metaboliti di *Trichoderma* rispetto al controllo (CTRL). I profili metabolomici differenziali sono distribuiti in un dendrogramma (albero gerarchico, a sinistra), mentre l'abbondanza relativa dei metaboliti differenziali sono suddivisi in righe, una per ciascun trattamento (a destra). Il range di colori da blu a rosso mostra come variano le concentrazioni dei diversi polifenoli rispettivamente dal meno abbondante al più abbondante.

Come è possibile evidenziare dal dendrogramma (Fig. 28) è stato riscontrato un profilo metabolomico diverso nelle drupe ottenute dalle piante trattate rispetto al controllo. In particolar modo, nelle drupe delle piante trattate con i ceppi M10, KV906, T22 e col metabolita HA, i metaboliti presi in esame si sono raggruppati separatamente rispetto a quanto osservato nel controllo. Al contrario, il trattamento che ha determinato minori variazioni rispetto a quello delle drupe provenienti dalle piante non trattate è risultato quello con il ceppo TH1. Inoltre, nella heatmap riportata in Fig. 28, l'abbondanza di ciascun composto viene indicata con un colore in una scala che va dal blu al rosso; questa visualizzazione consente una rapida interpretazione dei dati, mostrando in rosso i composti che hanno valori di abbondanza > 0 ed in blu quelli con abbondanza < 0 .

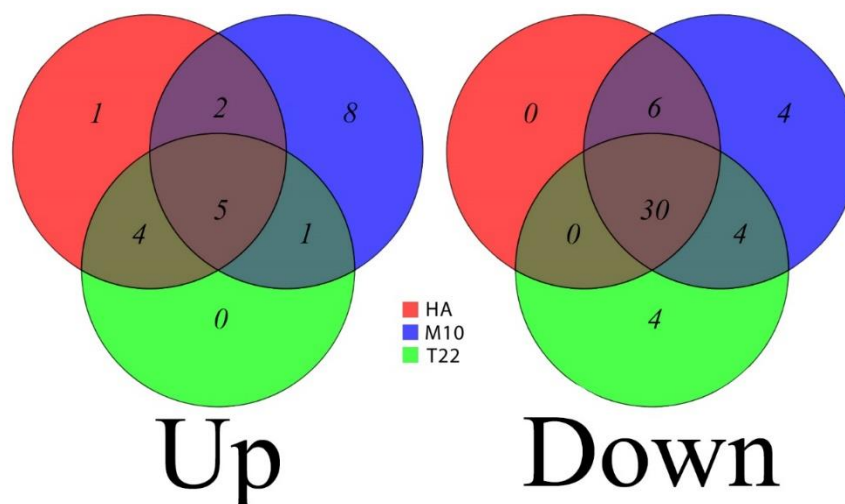


Figura 29. Diagrammi di Venn relativi al numero di composti fenolici la cui intensità nel metaboloma delle drupe tratta con HA (in rosso), M10 (in Blu) o T22 (in verde) è diminuita (Down) o aumentata (UP) rispetto al controllo.

Prendendo in considerazione i trattamenti effettuati con i ceppi T22, M10 e col metabolita HA sono stati costruiti dei diagrammi di Venn per verificare la presenza di metaboliti differenziali comuni. (Fig. 29).

Nell'ambito dei metaboliti la cui intensità è diminuita rispetto al controllo (Down), 30 composti sono presenti in tutti e tre i trattamenti, mentre 4 sono presenti esclusivamente nelle drupe trattate con T22 e 4 in quelle trattate con M10. Nessun composto è risultato specifico per il trattamento con HA (Fig. 29). È interessante notare la presenza di 4 metaboliti comuni ai trattamenti T22 e M10 e di 6 composti comuni tra M10 e HA. Al contrario, nessun composto è risultato comune ai trattamenti T22 e HA. Meno numerosi sono risultati, invece, i metaboliti differenziali la cui intensità è incrementata rispetto al controllo nei tre trattamenti esaminati: 5 sono in comune a tutti i trattamenti, 8 sono presenti solo in M10, 1 solo in HA, 0 in T22, 1 è in comune tra i trattamenti con T22 e M10, 2 in comune tra M10 e HA e 4 in comune tra HA e T22 (Fig. 29).

Come già visto per le foglie anche per le drupe sono stati valutati gli andamenti dei composti fenolici presenti. L'andamento dei composti è stato incentrato sui composti più significativi quali l'oleuropeina e la luteolina.

Questa analisi ci ha consentito di valutare gli effetti dei trattamenti sulle drupe.

Per l'oleuropeina si può osservare dalla figura 30 come il contenuto è sensibilmente aumentando nelle drupe delle piante trattate con il 6PP, GV41 e T22 mentre gli per gli altri trattamenti è inferiore al controllo.

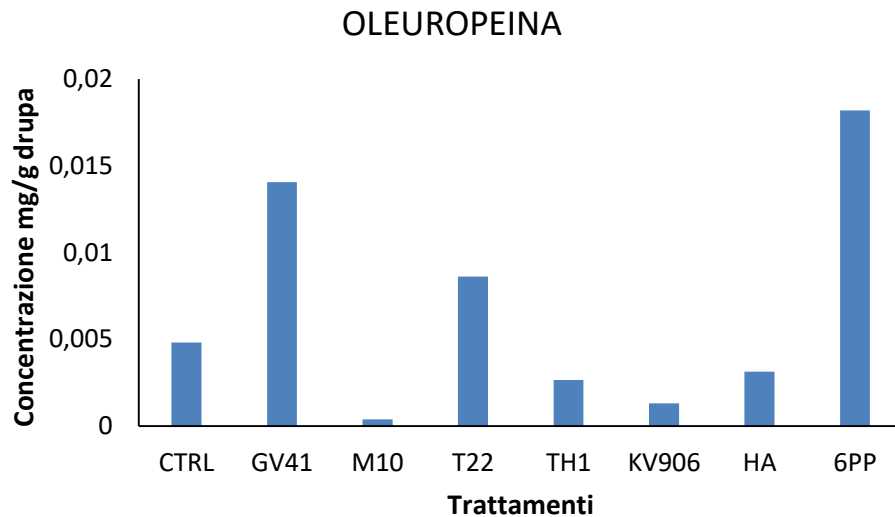


Figura 30. Concentrazione di oleuropeina nei campioni delle drupe raccolte nel 2017.

Per quanto riguarda la concentrazione di luteolina nelle drupe (Fig. 31), il metabolita secondario 6PP ed i ceppi KV906 e GV41 hanno determinato un maggiore accumulo in essa rispetto alle drupe controllo. Contrariamente i trattamenti con TH1 e T22 hanno fatto registrare una minore concentrazione di questo composto rispetto al controllo.

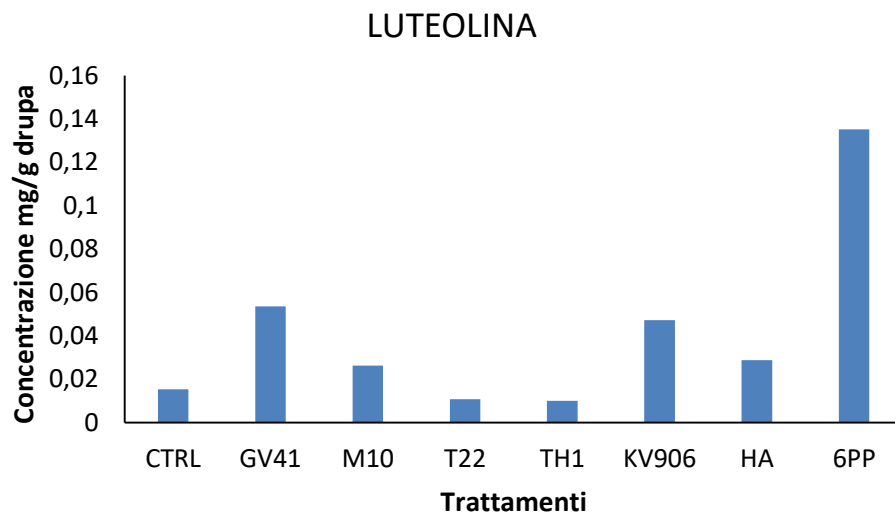


Figura 31. Concentrazione di luteolina nei campioni delle drupe raccolte nel 2017.

4. DISCUSSIONE

In agricoltura, negli ultimi due decenni è emersa la consapevolezza di dover sostituire o limitare l'utilizzo dei prodotti fitosanitari per la lotta agli agenti fitopatogeni mediante l'utilizzo di prodotti di origine biologica. In tal senso l'utilizzo di funghi micoparassiti, in particolare di quelli appartenenti al genere *Trichoderma*, ha riscosso un notevole successo (Lorito et al., 2010; Harman et al., 2004; Woo et al., 2006).

Sul mercato mondiale dei biofitofarmaci, infatti, sono presenti oltre 50 bioformulati che contengono come principio attivo numerosi ceppi di *Trichoderma*. Il notevole impiego di tali funghi si deve principalmente alla loro attività di contenimento di specie patogene, sia terricole che fogliari tra le più dannose, come quelle appartenenti ai generi *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Botrytis* e *Pythium* (Woo et al., 2014; Elad, 2000).

Attualmente l'impiego di inoculi microbici per favorire lo sviluppo delle piante e/o controllare gli agenti fitopatogeni è ancora poco esteso alle colture arboree, di cui l'olivo costituisce in Italia il principale rappresentante, sia in termini di rilevanza storica che produttiva. In letteratura, esistono pochi studi che valutano l'effetto dei microorganismi benefeci sulla fitness dell'olivo e che possano apportare informazioni utili per l'impiego di bioformulati in pieno campo.

In questo contesto, il presente progetto di dottorato vuole essere uno studio pilota, realizzato con l'idea di valutare se e come le applicazioni in campo di ceppi o metaboliti prodotti da *Trichoderma* spp. possano influire positivamente sulla crescita di giovani piante di olivo, contrastare lo sviluppo di infezioni naturali di *Fusicladium oleagineum* e modificare il contenuto in polifenoli delle piante. Per attuare il piano sperimentale sono stati selezionati diversi ceppi di *Trichoderma*, già presenti nella collezione disponibile presso i laboratori di lotta biologica del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Gli isolati sono stati selezionati sulla base di evidenze pregresse in merito alle loro capacità antagonistiche e di promozione della crescita delle piante. Nello stesso tempo, sono stati scelti due metaboliti prodotti da *Trichoderma* spp., HA e 6PP, precedentemente isolati e caratterizzati da membri del gruppo. Entrambi i composti avevano mostrato interessanti attività biologiche sia *in vivo* sia *in vitro*, incluse l'induzione di resistenza, la promozione dello sviluppo della pianta e l'attività antibiotica (Vinale et al., 2006; 2009).

In primo luogo si è valutato l'effetto dei trattamenti sulla crescita mediante la conta delle foglie e la misurazione della lunghezza dei rami e del diametro del fusto.

Per quanto riguarda la lunghezza dei rami si è riscontrato un incremento statisticamente significativo per tutti i trattamenti ad accezione di quelli effettuati con GV41 e M10. In particolare, le applicazioni con metabolita 6PP e con i ceppi KV906 e T22 hanno determinato l'incremento maggiore. Infatti, il trattamento con il 6PP ha dato un incremento del 34%, KV906 del 42% e T22 del 55% rispetto al controllo. Inoltre, proprio quest'ultimo ceppo ha incrementato il numero di foglie del 62%. Ciò è in accordo con quanto descritto in letteratura. Infatti, in precedenti lavori, sia in prove in serra che in pieno campo si è riscontrata la capacità del ceppo T22 di migliorare la crescita di piante di lattuga, pomodori e peperoni (Vinale et al., 2004). La produttività di queste colture è aumentata fino al 300%, confrontando i lotti trattati con i controlli e misurando i pesi freschi e secchi delle radici, la biomassa, l'altezza delle piante, il numero di foglie e di frutti. Inoltre, Doni et al (2014) hanno osservato su riso in serra che gli isolati di sette specie di *Trichoderma* erano in grado di migliorare gli indici biometrici, tra cui l'altezza della pianta, il numero di foglie, il numero di germogli, la lunghezza della radice ed il peso fresco della radice. Recenti studi hanno inoltre posto l'accento sull'effetto positivo che alcuni metaboliti secondari prodotti da funghi benefici esercitano sulle piante (Vinale et al., 2008; 2012; 2014). Effetti di promozione di crescita sono stati ottenuti con il metabolita secondario 6PP in uno studio condotto su vite in cui si è ottenuta una significativa promozione della crescita su piante trattate con tale sostanza naturale e con il ceppo T22 di *T. harzianum* (Pascale et al., 2017). Carrero-Carròn et al. (2016), inoltre, hanno evidenziato che un ceppo di *T. asperellum* induce una significativa promozione della crescita nelle piante di olivo.

Il possibile incremento del fusto a seguito dei trattamenti è stato valutato nell'arco di due anni (2016-2017), nel corso dei quali si è visto che tre gruppi sperimentali hanno prodotto un incremento rispetto al controllo. Il ceppo KV906 ha invece prodotto tale effetto solo nel 2017, per la precisione ha determinato un aumento del diametro pari al 12% rispetto al controllo.

Nello stesso esperimento è stata valutata la produttività degli olivi. Le prove condotte in campo hanno evidenziato che il trattamento con il ceppo T22, che aveva dato effetti positivi nell'incremento di alcuni parametri biometrici, ha fatto registrare l'aumento del 30% del peso medio della drupa rispetto al controllo. Tuttavia, gli effetti positivi di KV906 e 6PP, riscontrati sui parametri biometrici registrati nel corso della sperimentazione, non hanno trovato riscontro quando si è analizzato l'effetto sulla produttività della pianta. Al contrario, il trattamento con HA, che dal punto di vista biometrico non aveva dato effetti, è risultato il più produttivo con un aumento percentuale del peso della drupa del 61% (peso medio 9,4 g) rispetto al controllo. È importante evidenziare che questo dato è superiore alla media generale della cultivar Carolea il cui peso medio della drupa oscilla tra 4 e 8 g, confermando l'ipotesi che questi microrganismi

benefici ed i loro metaboliti possono sinergicamente promuovere la crescita e lo sviluppo vegetale. Questo risultato è supportato da un recente lavoro di Pascale et al. (2017) sulla vite in cui si riporta che i trattamenti con *T. harzianum* T22 e 6PP hanno determinato un sostanziale incremento della produttività. Questi effetti sono tanto più evidenti quando le piante in esame partivano da una condizione di stress ad esempio dovuta ad una cattiva gestione della sostanza organica del suolo. Ciò conferma l'utilità di questi agenti di biocontrollo come fitoprotettori e fitostimolanti capaci di proteggere la coltura in campo quando le condizioni colturali non sono ottimali, come può essere nel caso degli oliveti.

La cultivar di olivo Carolea, utilizzata nel presente lavoro, è particolarmente suscettibile all'attacco del fungo patogeno *F. oleagineum*, agente causale della malattia nota come occhio di pavone. Infatti, al termine del primo ciclo di applicazione (tra gennaio e febbraio 2016) si è osservata la comparsa spontanea sulle foglie di sintomi associabili all'attacco del suddetto patogeno. Tale evento naturale ha fornito l'occasione di valutare anche l'efficacia delle applicazioni dei microrganismi e dei loro metaboliti nel contenimento di *F. oleagineum*.

È interessante notare che tra i vari trattamenti con effetto positivo nel contenimento del patogeno, quelli effettuati con KV906 hanno prodotto degli effetti benefici che si sono manifestati a partire dal secondo anno. Questo dato concorda con gli effetti sulla promozione della crescita osservati con lo stesso ceppo e rafforza l'idea che esso possa esercitare il proprio effetto benefico nel lungo periodo. I risultati migliori nei tre anni di osservazione sono stati ottenuti mediante l'applicazione del metabolita secondario 6PP. Il metabolita 6PP è risultato anche efficace nel contenimento dell'infezione naturale di *Uncinula necator*, agente causale dell'oidio della vite (Pascale et al., 2017).

Successivamente questo metabolita è stato selezionato per verificare se l'associazione con un biopolimero ottenuto da carrubo (polimero a base di galattommannani) potesse potenziarne la sua attività di biocontrollo contro *F. oleagineum*. L'effetto di questa combinazione ha prodotto risultati migliori rispetto a quelli ottenuti con l'applicazione del solo metabolita 6PP. Questo risultato indica che l'effetto positivo di questa combinazione è dovuto ad una somma degli effetti di entrambi i prodotti, confermando l'effetto di contenimento del patogeno prodotto dall'applicazione del solo galattommannano di carrubo (LBG). A differenza delle gomme di "Guar", già sperimentate in agricoltura in aggiunta ai terreni di crescita delle piante (Thombare et al., 2016), LBG non era stato mai applicato in sperimentazioni in pieno campo (Barak, and Mudgil; 2014). I dati presentati in questa tesi di dottorato possono essere un punto di partenza per lo sviluppo futuro di un prodotto biologico con un potenziale effetto di protezione contro i patogeni per piante arboree e non.

Gli effetti dei trattamenti effettuati nei tre anni sono stati valutati anche in termini di caratterizzazione della frazione fenolica degli estratti ottenuti dalle foglie di olivo e dalle drupe.

La maggior parte degli studi metabolomici della frazione fenolica dell'olivo si erano focalizzati soprattutto sulla drupa (Amiot et al., 1986, 1989; Esti et al., 1998), per la sua importanza nell'industria alimentare. Ad essere indagati sono stati soprattutto l'andamento dell'oleuropeina e dei suoi prodotti di degradazione molto abbondanti nella drupa.

La ricerca per trovare nuovi usi per i sottoprodotti delle olive da tavola e dell'industria dell'olio d'oliva è di grande valore sia per l'economia, che per l'ambiente e la salute umana.

Dalle foglie, che rappresentano circa il 10% del peso totale delle olive che arrivano al mulino, è possibile ottenere composti ad alto valore aggiunto per la preparazione di integratori alimentari, butraceutici, ingredienti alimentari funzionali o cosmetici (Altiok et al., 2008; Barón et al., 2015).

In questo lavoro di dottorato è stato analizzato l'accumulo di composti fenolici esclusivamente nelle foglie di piante di olivo dal momento che in letteratura è riportato che non vi sono differenze nella composizione fenolica dei diversi tessuti (frutto, seme, foglie; Ryan et al., 2002, 2003). Inoltre, poiché le piante utilizzate per gli esperimenti nei primi due anni (2015 e 2016) non avevano ancora raggiunto la maturità produttiva, l'analisi metabolomica sulle drupe è stata effettuata solo nel 2017 (prima annualità in cui erano presenti le drupe sulle giovani piante). Molti studi affermano che le foglie di olivo contengono una maggiore quantità di composti fenolici rispetto a quella presente nel frutto o nell'olio vergine di oliva (Silva et al., 2006; Kountouri et al., 2007; Owen et al., 2000) seppure tale contenuto varia sensibilmente in relazione a fattori genetici, fisiologici ed ambientali (Lattanzio, 2003; Ranalli et al., 2006).

La resistenza che alcune cultivar di olivo hanno mostrato nei confronti di funghi patogeni (*Verticillium dahliae*, agente della verticillosi, e *F. oleagineum*, agente dell'occhio di pavone) è stata correlata ad una componente fenolica multipla (composta principalmente dal tirosolo e i suoi derivati, dall'oleuropeina e dalla rutina; Del Río et al., 2003; El Aabidine et al., 2010; Báidez et al., 2007).

Recentemente numerosi articoli hanno indagato sul contenuto dei composti fenolici presenti nelle foglie di olivo appartenenti a varie cultivar ed utilizzando vari approcci analitici. Il più diffuso tra questi è l'HPLC a fase inversa con rivelatore diode-array, accoppiato o meno ad uno spettrometro di massa (Talhaoui et al., 2014, 2015; Bilgin e Şahin, 2013; Silva et al., 2006; Taamalli et al., 2010). L'analisi metabolomica condotta in questo lavoro di dottorato ha messo in relazione il contenuto dei composti fenolici estratti dalle foglie degli olivi con i trattamenti, con ceppi o metaboliti di *Trichoderma*, che le piante avevano subito in campo.

La analisi *untargeted*, condotta sui campioni ottenuti dai tre anni di sperimentazione, è stata effettuata per valutare l'effetto cronico delle somministrazioni di ceppi o metaboliti di *Trichoderma* in campo. Si è osservato negli anni 2015 e 2016 un aumento dei composti down regolati, contrariamente nel 2017 questa tendenza si è invertita. I raggruppamenti gerarchici, creati sul confronto dei profili metabolomici differenziali delle foglie degli olivi trattati, hanno evidenziato una significativa differenza per le piante trattate rispetto al controllo. In particolare, nel 2015 hanno mostrato una maggiore differenza i metaboliti HA e 6PP ed il ceppo M10, nel 2016 i ceppi M10, T22 ed HA e nel 2017 i ceppi GV41, T22 e HA.

L'analisi quantitativa *targeted* dei composti fenolici è stata effettuata utilizzando delle rette di taratura con standard esterni, oleuropeina per i secoiridoidi e luteolina per i flavonoidi. È stato evidenziato un accumulo differenziale dei composti fenolici in funzione dei trattamenti eseguiti ed in relazione alla classe di composti esaminati. Grazie all'approccio della metabolomica "targeted" è stato monitorato l'andamento di alcuni composti fenolici nel corso delle sperimentazioni in campo in tutti e tre gli anni, poiché il loro contenuto varia in funzione del momento in cui avviene il campionamento (Papoti e Tsimidou, 2009).

L'oleuropeina, il composto più abbondante presente nelle foglie di olivo (Hashemi et al., 2010). Molti studi riportano una drastica diminuzione della concentrazione dell'oleuropeina durante il passaggio dallo stadio vegetativo alla formazione dei boccioli, seguito poi da un rapido aumento nella fase iniziale di maturazione dei frutti e, quindi, da un nuovo decremento a completamento della maturazione (Malik e Bradford, 2006). Nel corso della sperimentazione è stato possibile rilevare un aumento di produzione di questo polifenolo nel 2016 e nel 2017 rispetto al 2015 (primo anno di sperimentazione). Ciò suggerisce che i trattamenti effettuati in campo hanno determinato una maggiore abbondanza di questo composto. Durante il primo anno gli incrementi più significativi sono stati osservati nelle foglie delle piante trattate con i ceppi M10, T22 e KV906 o con il metabolita 6PP. Durante il secondo anno, incrementi più consistenti si sono verificati per i trattamenti TH1, GV41, T22 e 6PP, mentre durante il terzo anno per i trattamenti effettuati con M10, KV906, TH1 e 6PP. La cultivar Carolea utilizzata per questa sperimentazione, ha un contenuto in polifenoli più basso e, dunque, è suscettibile all'occhio di pavone (Del Río et al., 2003; El Aabidine et al., 2010; Báidez et al., 2007). A seguito di tre anni di trattamenti con i ceppi e metaboliti secondari di *Trichoderma* è stato osservato un aumento nel corso degli anni in termini di contenuto di polifenoli che può essere associato ad una incrementata resistenza all'occhio di pavone (Del Río et al., 2003; El Aabidine et al., 2010; Báidez et al., 2007).

Più recentemente, l'oleuropeina aglicone ha acquisito crescente interesse a causa del suo effetto benefico sulla neuro-protezione (Pantano et al., 2017) nelle malattie neurodegenerative e nella riduzione dell'infiammazione acuta (pleurite indotta da carrageenan) (Impellizzeri et al., 2011).

L'andamento della concentrazione di questo composto è risultato anch'esso variabile nei tre anni. In generale, è stato osservato un aumento di concentrazione nei primi mesi di campionamento seguito da un decremento di questo composto dovuto presumibilmente all'idrolisi dell'oleuropeina stessa, come riportato da diversi studi (Talhaoui et al., 2014; Briante et al., 2002; Cardoso et al., 2005; Gutierrez-Rosales et al., 2010; Obied et al., 2008; Servili et al., 2009). I trattamenti che maggiormente hanno influito sulla concentrazione di questo composto sono risultati nel 2015 M10, KV906 ed il 6PP; nel 2016 GV41, M10, T22 e 6PP e per il 2017 i due metaboliti secondari 6PP e HA. Alcuni trattamenti che hanno determinato variazioni nel contenuto dell'oleuropeina aglicone sono uguali a quelli che hanno portato ad un maggior contenuto in oleuropeina dimostrando pertanto che la via metabolica che porta alla formazione/degradazione di questi due composti è strettamente correlata.

Per quanto riguarda i flavonoidi, invece, uno dei composti più abbondanti è la luteolina, la cui concentrazione secondo quanto riscontrato anche da Talhaoui et al. (2014) in diverse cultivar di olivo spagnole, non subisce notevoli fluttuazioni nel corso della maturazione della pianta. Al contrario, a seguito degli anni di trattamento eseguiti sulle piante oggetto della sperimentazione in campo, è stato osservato un incremento della concentrazione di questo composto nei mesi estivi, per poi tornare a livelli inferiori successivamente. Nel 2015 il contenuto di luteolina è risultato maggiore nel controllo rispetto ad alcuni trattamenti mentre nel 2016 M10 e nel 2017 il suo metabolita HA hanno determinato un maggior accumulo di luteolina rispetto al controllo.

L'analisi metabolomica *untargeted* e *targeted* è stata condotta sulle olive prodotte nel 2017. Anche in questo caso è stato notato un aumento nel numero nei composti down regolati. Come per le foglie anche per le drupe provenienti da piante trattate è stato riscontrato un profilo metabolico diverso rispetto alle non trattate. Più nello specifico, i trattamenti che hanno determinato una maggiore diversità sono stati M10, KV906, T22 ed il metabolita HA. Inoltre, a seguito dei trattamenti effettuati nei tre anni di sperimentazione è aumentata anche la concentrazione in polifenoli. In particolare, è stato rilevato un maggior accumulo di oleuropeina per i trattamenti con GV41, T22 e 6PP. Per la luteolina, invece, i trattamenti che ne hanno determinato un incremento in termini di contenuto sono stati GV41, KV906 e soprattutto il 6PP. Questi risultati, ed in particolare quelli ottenuti con i metaboliti fungini, sono in accordo con lo studio condotto da Pascale et al. (2017), dove si riporta un incremento del contenuto di polifenoli totali nelle uve trattate in campo con spore di *T. harzianum* ceppo T22 o con 6PP.

In conclusione, a seguito dei trattamenti ripetuti in campo nei tre anni di sperimentazione è stato possibile registrare un incremento degli indici biometrici (lunghezza dei rami, diametro fusto ed aumento di produttività), nonché una riduzione del numero di foglie colpite da occhio di pavone rispetto al controllo. L'effetto dei trattamenti sul metaboloma della pianta è stato valutato mediante analisi LC-MS che consente di effettuare una rapida caratterizzazione degli estratti fogliari e delle drupe, nonché una quantificazione dei composti fenolici in essi contenuti. Gli effetti dei trattamenti in campo si sono manifestati con una variazione del contenuto di composti fenolici accumulati nelle foglie di olivo e nelle drupe rispetto al controllo. Tra i diversi trattamenti effettuati, il 6PP è complessivamente risultato il migliore sia in termini di controllo della malattia, sia in termini di accumulo di luteolina ed oleuropeina nelle drupe. Queste evidenze, accanto alla applicazione combinata con biopolimeri naturali, offrono nuove opportunità per lo sviluppo di bioformulati a base di microrganismi o loro metaboliti da utilizzare anche su colture arboree, come l'olivo, per promuovere la crescita o la resistenza delle piante alle avversità.

5. BIBLIOGRAFIA

- A. Mishra, A.J. Malhotra (2009) **Tamarind xyloglucan: a polysaccharide with versatile application potential.** *J. Mater. Chem.* 19 8528–8536.
- Adom, Kafui Kwami, Mark E. Sorrells, and Rui Hai Liu (2005). **Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties.** *J. Agric. Food Chem.* 53.6: 2297-2306.
- Agrios GN (1997) **Control of plant diseases.** *Plant pathology*, Academic Press.
- Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., and Ülkü, S. (2008). **Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin.** *Separation and Purification Technology*, 62(2), 342-348.
- Andary C., Wylde R., Laffite C., Privat G., Winternitz F. (1982). **Structure of verbascoside and orobancoside, caffeic acid sugar esters from *Orobancha rapum-genistae*.** *Phytochemistry* 21,1123-1127.
- Ashraf, M. Y., and Lin Wu (1994). **Breeding for salinity tolerance in plants.** *Crit. Rev. Plant Sci.* 13.1: 17-42.
- Baker, K.F., Cook, R.J. (1974). **Biological Control of Plant Pathogens.** *Freeman*, San Francisco, CA, USA.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006). **Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** *Food Chem.* 99, 191–203.
- Barak, S., & Mudgil, D. (2014). **Locust bean gum: processing, properties and food applications—a review.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 74-80.
- Bargabus, R. L., Zidack, N. K., Sherwood, J. E. and Jacobsen, B. J. (2002). **Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent.** *Physiological and molecular plant pathology*, 61(5), 289-298.
- Barón, Á. R., Arráez-Román, D., & Fernández, I. (2015). **Bioactive compounds in the olive leaf: introducing hands-on HPLC-MS and NMR in the undergraduate curricula.** *Chem Educ*, 20, 321-326.
- Bautista-Bañós, S., Hernandez-Lopez, M., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L. (2003). **Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit,** *Crop Protection*, 22, 1087–1092.

- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., and Codon, A. C. (2004). **Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains.** *International microbiology*, 7(4), 249-260.
- Berg, G., and Smalla, K. (2009). **Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere.** *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.
- Betina C. Agaras, Mercedes Scandiani, Alicia Luque, Leticia Fernández, Florencia Farina, Marcelo Carmona, Marcela Gally, Ana Romero, Luis Wall, Claudio Valverde. (2015) **Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates.** *Biological Control*, Volume 90, Pages 173-186.
- Bisset J.F. (1991) **A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification,** *Can. J. Bot.*, 69:2357-2372.
- Bloem, J., Hopkins D.W. Benedetti, A., (2005) **Free-living plant-beneficial microorganisms and soil quality. In Microbiological methods for assessing soil quality,** *CABI Publishing, Wallingford Oxon, UK, pp.*, 270-284 (eds).
- Bonanomi, G., Antignani, V. Pane, C. Scala, F. (2007). **Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments.** *J. Plant Pathol.* 89: 311-340.
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2005). **Phenolic compounds in olive oil and olives.** *Curr. Top. Nutraceutical Res*, 3, 125-136.
- Boyd, R., R. T. Furbank and D. J. Read. (1986). **Ectomycorrhiza and the water relations of trees.** P. 689-693 in: V. Gianinazi-Pearson and S. Gianinazi (eds.). Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceedings of the 1st European symposium on mycorrhizae, Dijon, 1-5 July 1985.
- Brenes M., Hidalgo F. J., García A., Rios J. J., García P., Zamora R., Garrido A. (2000a). **Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil.** *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 715-720.
- Bressan W. (2003). **Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes.** *BioControl*, Volume 48, Issue 2, pp 233–240.
- Cabras Paolo and Aldo Martelli. (2004) **Chimica degli alimenti.** *Piccin.*
- Calvet C., Pera J. and Barea J. M. (1989). **Interaction of *Trichoderma* spp. with *Glomus mosseae* and two wilt pathogenic fungi.** *Agriculture, Ecosystem and Environment.* 29: 59-65.
- Castoria R, Caputo L, De Curtis F, De Cicco V., (2003). **Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action.** *Phytopathology* 93(5):564-72.

- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J. and Grant, W. P. (2011). **The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987-1998.
- Chandrkrachang, S. (2002). **The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand.** *In: Advances in Chitin Science.* K. Suchiva, S. Chandkrachang, P. Methacanon, M.G. Peter (eds.), vol. 5, Bangkok, pp. 458–462. ISBN 974-229-412-7.
- Chérif, M., Sadfi, N., Benhamou, N., Boudabbous, A., Boubaker, A., Hajlaoui, M. R., and Tirilly, Y. (2002). **Ultrastructure and cytochemistry of in vitro interactions of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *B. thuringiensis* 55T with *Fusarium roseum* var. *sambucinum*.** *Journal of Plant Pathology*, 83-93.
- Chibu, H. and Shibayama, H. (2001). **Effects of chitosan applications on the growth of several crops. In: Chitin and Chitosan in Life Science.** T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (eds.), pp. 235–239, ISBN 4-906464-43-0.
- Couteaudier, Y. (1992). **Competition for carbon in soil and rhizosphere, a mechanism involved in biological control of *Fusarium* wilts.** *In Biological control of plant diseases* (pp. 99-104). Springer, Boston, MA.
- Cutler H.G., Cox R.H., Crumley F.G., Cole P.D., (1986). **6-Pentyl- α -pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties.** *Agricultural and Biological Chemistry*, 50:2943–2945.
- de la Puerta, R., Ruiz-Gutierrez, V., Houtl, J.R. (1999). **Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil.** *Biochem. Pharmacol.*, 57, 445-449.
- Dechamplain N., Gosselin L. (2002). **Les champignons mycorhiziens (PISTES) (CRBF)/Université Laval.**
- Dekanski, D., Ristic, S., Radonjic, N. V., Petronijevic, N. D., Dekanski, A. and Mitrovic, D. M. (2011). **Olive leaf extract modulates cold restraint stress-induced oxidative changes in rat liver.** *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(9), 1207-1218.
- Demain A.L. and Fang A., **The natural functions of secondary metabolites,** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* 2000, 69:1–39.
- Devendra K. Choudhary, Bhavdish N. Johri. (2009) **Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR).** *Microbiological Research*, Volume 164, Issue 5, Pages 493-513, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>.

- Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. (2004). **Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables.** *Food Microbiology*, 703–714.
- Domiguez L. and Barbagallo M., (2007). **Mediterranean diet and longevity: role of extravirgin olive oil.** *G. Gerontol*, 55: 231-238.
- Doni, F., Isahak, A., Zain, C. R. C. M., & Yusoff, W. M. W. (2014). **Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants.** *Amb Express*, 4(1), 45.
- Doumbou C.L., Hamby Salove M.K, Crawford D.L. and Beaulieu. C. (2001) **Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth.** *Phytoprotection* Volume82, Issue3, p. 85–102.
- Duijff, B. J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C. and Lemanceau, P. (1998). **Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47.** *European Journal of Plant Pathology*, 104(9), 903-910.
- El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., Hardy, G. S. J. and Sivasithamparam, K. (2009). **Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes.** *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 13-26.
- Esti, M.; Cinquanta, L.; La Notte, E. (1998) **Phenolic compounds in different olive varieties.** *J. Agric. Food Chem.*, 46,3235.
- Felse, P.A. and Panda, T. (1999). **Studies on applications of chitin and its derivatives.**
- Fitò M., de la Torre R., Albaladejo M. F., Khymenez O., Marrugat J. and Covas M. I., (2007). **Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review.** *375 Ann Its super sanità*, vol. 43 (4): 375-381.
- Fleming H. P., Walter W.M., and Etchells J. L., (1973). **Antimicrobial Properties of Oleuropein and Products of Its Hydrolysis from Green Olives.** *Applied Microbiology*, vol.26 (5): 777-782.
- G.N Agrios., (2005) *.Plant Pathology* 5th Edition, Academic Press, London.
- Gabriel, C.J. and Cook, R.J. (1991) **Biological control of plant pathogens.** *FAO Plant Protection Bulletin*, 38:95-99.
- Ganino T., Bartolini G., Fabbri A. (2006). **The classification of olive germplasm.** *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81(3):317-334.
- Gariboldi P., Jommi G., Verotta L. (1986). **Secoiridoids from *Olea europaea*.** *Phytochemistry* 25 865-869.

- Garrido Fernández A., Fernández Díez M. J., and Adamos M. R. (1997). **Physical and chemical characteristics of the olive fruit**, in: *Table olives*, pp. 67-109. Chapman & Hall, London, UK.
- Ghisalberti, E. L., and K. Sivasithamparam. (1991) **Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp.** *Soil Biology and Biochemistry* 23.11: 1011-1020.
- Glazebrook Jane. (2001) **Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* — 2001 status.** *Current Opinion in Plant Biology*. Volume 4, Issue 4, Pages 301-308.
- Green P.S. and G.E. Wickens (1989). **The *Olea europaea* complex.** *The Davis & Hedge Festschrift ed.*, Edinburg University Press, 287-299.
- Haas, D. and Défago, G. (2005). **Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonads*.** *Nature reviews microbiology*, 3(4), 307.
- Hahn, M., and Mendgen, K. (2001). **Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces.** *Current Opinion in Plant Pathology*, 4: 322-327.
- Halvorson, J.J., Gonzalez, J.M., Hagerman, A.E. and Smith, J.L. (2009). **Sorption of tannin and related phenolic compounds and effects on soluble-N in soil.** *Soil Biol. Biochem.* 41, 2002–2010.
- Harley, J. L., and S. E. Smith.(1983). **Mycorrhizal symbiosis.** Academic Press, London.
- Harman and C.P. Kubicek, eds. 2: 73-99, Taylor & Francis, London.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004). ***Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts.** *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43.
- Harms CT (1992). **Engineering genetic disease resistance into crops: biotechnological approaches to crop protection.** *Crop protection*, 11: 291-306.
- Hoitink, H.A.J. and Boehm M.J. (1999). **Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon.** *Annual Review of Phytopathology* 37: 427-446.
- Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. (1999). **Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability.** *Food Chem. Toxicol.* 37, 937–942.
- Hornby D. (1990). **Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens**, CAB International Wallingford UK, pp. 479 (eds).
- Hwang, J., and Benson, D. M. (2003). **Expression of induced systemic resistance in poinsettia cuttings against *Rhizoctonia* stem rot by treatment of stock plants with binucleate *Rhizoctonia*.** *Biological control*, 27(1), 73-80.

- Impellizzeri, D., Esposito, E., Mazzon, E., Paterniti, I., Di Paola, R., Bramanti, P. and Cuzzocrea, S. (2011). **The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy.** *Clinical Nutrition*, 30(4), 533-540.
- Iriti Marcello e Varoni Elena Maria (2015) **Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants.** *Environmental Science and Pollution Research*, Volume 22, Issue 4, pp 2935–2944
- Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., and Maas, C. (1995). **Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco.** *The Plant Journal*, 8(1), 97-109.
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C. (2007). **Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators?** *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1-23.
- Jeffery L. Dangl and Jonathan D. G. Jones. (2001) **Plant pathogens and integrated defence responses to infection.** *Nature volume* 411, pages826–833
- Jennings D.H. and Lysek G. 1996. **Fungal biology: understanding the fungal lifestyle.** (Bios Scientific publishers eds).
- Jones J. D. G. and Dangl J. L (2006) **The plant immune system;** *Nature* 444, 323-329.
- Joseph W. Kloepper, Choong-Min Ryu, and Shouan Zhang (2004). **Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by Bacillus spp.** *Phytopathology* Vol. 94, No. 11.
- Joseph W. Kloepper, John Leong, Martin Teintze and Milton N. Schroth. (1980) **Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria.** *Nature volume* 286, pages885–886.
- K. Reddy, G.K. Mohan, S. Satla, S. Gaikwad, (2011) *Asian J. Pharm. Sci.* 6 (6) 275–286.
- Karou, D., Dicko, M.H., Simpore, J. and Traore, A.S. (2005). **Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso.** *Afr. J. Biotechnol.* 4, 823–828.
- Kendrick, M. J. (1992). **Metals in biological systems.** Ellis horwood ltd.
- Koller M., Salerno A., Muhr A., Reiterer A., Chiellini E., Casella S., Horvat P., Braunegg G., (2012). **Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters.**
- Kothari, I. L., and Patel, M. (2004). **Plant immunization.**
- Kraus, T.E.C., Dahlgren, R.A. and Zasoski R.J. (2003). **Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems – a review.** *Plant Soil*, 256, 41–66.

- Kubicek, C.P. and Harman G.E. (1998). ***Trichoderma and Gliocladium***. *Basic biology* Volume I, , taxonomy and genetics. Taylor & Francis Ltd., London, UK, pp.278 (eds).
- Kumar, N.V.R.M. (2000). **A review of chitin and chitosan applications**. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Kurita, K. (1998). **Chemistry and application of chitin and chitosan**. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 117-120.
- Langcake, P., Irvine, J.A. and Jeger, M.J. (1981). **Alternative chemical agents for controlling plant disease**. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 295, 83–101.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T. and Cardinali, A. (2006). **Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects**. In: *Phytochemistry Advances in Research (Imperato, F. ed.)*, pp. 23–67.
- Lay Nge, K., New, N., Chandrkrachang, S., Willem F., Stevens, W.F. (2006). **Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture**. *Plant Science*, 170, 1185–1190.
- Lenka Burketova, LucieTrda, Peter G. Ott, OlgaValentova. (2015) **Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens**. *Biotechnology Advances*. Volume 33, Issue 6, Part 2, Pages 994-1004. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.004>.
- Linderman, R.G. (1988). **Mycorrhizal interaction with the rizosphere microflora: the mycorrhizzosphere effects**. *Phytopatology* 78: 366-371.
- Lorito M. (1998). **Chitinolytic enzymes and their genes**. In *Trichoderma and Gliocladium* G.E.
- Lorito M. and Cervone F. (2004) **Lotta Biologica**; *Enciclopedia del Novecento*; Treccani.
- Lynn, D. G., & Chang, M. (1990). **Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development**. *Annual review of plant biology*, 41(1), 497-526.
- Mandeel, Q. and Baker, R. (1991). **Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum***. *Phytopathology*, 81(4), 462-469.
- Montedoro G. F., Servili M., Baldioli M., Miniati E. (1992a). **Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantification and semiquantitative evaluation by HPLC**. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1571-1577.
- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S. and Uknes, S. (1998). **Induced resistance responses in maize**. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 11, 643–658.
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. (2003). **Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes**. *Cell*, 113(7), 935-944.

- Nandkishore Thombarea, Usha Jhab, Sumit Mishrab, M.Z. Siddiquia (2016). **Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review** *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 361–372.
- Newman, M.A., Dow, J.M., Molinaro, A. and Parrilli, M. (2007). **Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacteria lipopolysaccharides.** *J. Endotoxin Res.* 13, 69–84.
- Ninfali, Paolino, and Mara Bacchiocca (2003). **Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions.** *Journal of Agricultural and food chemistry* 51.8: 2222-2226.
- Northup, R.R., Dahlgren, R.A. and McColl, J.G. (1998). **Polyphenols as regulators of plant–litter–soil interactions in northern California's pygmy forest: a positive feedback?** *Biogeochemistry*, 42, 189–220.
- Oszamianski J, Ramos T, Bourzeix M. (1988). **Fractionation of phenolic compounds in red wine.** *Am. J. Enol. Vitic.* 39:259-262.
- Owen R. W., Giocosa WE, Hull A., Haubner R., Spiegelhaider B. & Bartsch H., (2000a). **The antioxidant/anticancer potential of fenolic compounds isolanted from olive oil.** *Eur. J. Cancer*,36: 1235-1247.
- Owen R. W., Haubner R., Wurtele G., Hull W E., Spiegelhalder B. and Bartsch H., (2004). **Olive and Olive oil in carcer prevention.** *European Journal of Cancer Prevention*, 13: 319-326.
- Owen R. W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., spiegelhalder B., Bartsch H. (2000). **Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil.** *Food Chem. Toxicol.* 38: 647-659.
- Ozyigit, I.I., Kahraman, M.V. and Ercan, O. (2007). **Relation between explant age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L).** *Afr. J. Biotechnol.* 6, 3–8.
- Pantano, D., Luccarini, I., Nardiello, P., Servili, M., Stefani, M. and Casamenti, F. (2017). **Oleuropein aglycone and polyphenols from olive mill waste water ameliorate cognitive deficits and neuropathology.** *British journal of clinical pharmacology*, 83(1), 54-62.
- Parker R.S., Cutler H.G., Jacyno J.M., Hill R.A. (1997) **Biological activity of 6-pentyl-2H-pyran-2-one and its analogs.** *J Agric Food Chem.*, 45:2774–2776.
- Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., et al. (2017). **Trichoderma and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes.** *Crop Protect.* 92, 176–181. doi: 10.1016/j.cropro.2016.11.010
- Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W.J. (2000). **Molecular basis of symbiotic promiscuity.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 180–201.

- Pieterse, C.M. and Van Loon, L.C. **NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 456-464
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., Nagar, B. J., Naikwadi, N. N. and Variya, B. C. (2013). **Galactomannan: a versatile biodegradable seed polysaccharide.** *International journal of biological macromolecules*, 60, 83-92.
- [Raederstorff](#) Daniel (2009). **Antioxidant Activity of Olive Polyphenols in Humans: a Review.** *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79, pp. 152-165.
- Ragaee, Sanaa, El-Sayed M. Abdel-Aal, and Maher Noaman (2006). **Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use.** *Food Chemistry* 98.1: 32-38.
- Renshaw, J. C., Robson, G. D., Trinci, A. P., Wiebe, M. G., Livens, F. R., Collison, D. and Taylor, R. J. (2002). **Fungal siderophores: structures, functions and applications.** *Mycological Research*, 106(10), 1123-1142.
- Robards, Kevin (2003). **Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables.** *Journal of chromatography A* 1000.1: 657-691.
- Romani A., Lapucci C., Cantini C., Ieri F., Mulinacci N., and Visioli F. (2007). **Evolution of Minor Polar Compounds and Antioxidant Capacity during Storage of Bottled Extra Virgin Olive Oil,** *J. Agric. Food Chem.*, 55 (4), pp 1315–1320, DOI: 10.1021/jf062335r.
- Rozes, N., and C. Peres (1998). **Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of Lactobacillus plantarum.** *Applied microbiology and biotechnology* 49.1: 108-111.
- Ruocco M., Lanzuise S., Lombardi N., Woo S. L., Vinale F., Marra R., Varlese R., Manganiello G., Pascale A., Scala V., Turrà D., Scala F., and Lorito M. (2015) **Multiple Roles and Effects of a Novel Trichoderma Hydrophobin.** *Am Phytopath Society Volume* 28, Number 2 Pages 167-179.
- Sahai AS and Manocha MS (1993). **Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction.** *FEMS Microbiology Reviews*, 11: 317-338.
- San Antonio, James P. (1952). **The Role of Coumarin in the Growth of Roots of Melilotus alba.** *Contributions from the Hull Botanical laboratory* 365. *Botanical Gazette* 114.1: 79-95.
- Sawa R, Mori Y, Iinuma H, Naganawa H, Hamada M, Yoshida S, Furutani H, Kajimura Y, Fuwa T, Takeuchi T. (1994) **Harzianic acid, a new antimicrobial antibiotic from a fungus.** *Journal of Antibiotics*.
- Scalbert, Augustin, and Gary Williamson (2000). **Dietary intake and bioavailability of polyphenols.** *The Journal of nutrition* 130.8: 2073S-2085S.

- Seneviratne, G. and Jayasinghearachchi, H.S. (2003). **Mycelial colonization by bradyrhizobia and azorhizobia.** *J. Biosci.* 28, 243–247.
- Servili M, Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A., Montedoro G.F. (1999). **HighPerformance Liquid Chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic Resonance characterization.** *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76,873.
- Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G. F., Morozzi G. (2004). **Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil.** *J. Chromatogr.* 1054: 113-127.)
- Singh, Nilesh C. Sharma, Sheo Mohan Prasa, Nawal Kishor Dubey, Devendra Kumar Chauhan. (2017) **An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity.** *Plant Physiology and Biochemistry* Volume 110, Pages 2-12.
- Sivasithamparam, K., and E. L. Ghisalberti (1998). **Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*.** *Trichoderma and Gliocladium basic biology taxonomy and genetics* 1: 139-191.
- Sukwattanasinitt, M., Klaikherd, A., Skulnee, K., Aiba, S. (2001). **Chitosan as a releasing device for 2,4-D herbicide.** *In: Chitin and Chitosan in Life Science*, T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Eds.), Yamaguchi, pp. 142–143.
- Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N.A.A.Q. (2003). **Mycelia of *Mucor rouxi* as a source of chitin and chitosan.** *Food Chemistry.* 60, 605-610.
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. (2015). **Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits.** *Food Research International*, 77, 92-108.
- Taylor, L.P. and Grotewold, E. (2005). **Flavonoids as developmental regulators.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 317–323.
- Termorshuizen, A.J. and Jeger, M.J. (2008). **Strategies of soilborne plant pathogenic fungi in relation to disease suppression.** *Fungal Ecology* 1: 108-114.
- Thomas, P. and Ravindra, M.B. (1999). **Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment.** *J. Hortic. Sci.* 72, 713–722.

- Torsten Stein (2005) ***Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions.** *Molecular Microbiology*. Volume 56, Issue 4 Pages 845-857.
- Trichopoulou A., Costacou T., Bamia C., Trichopoulos D. (2003). **Adherence to a Mediterranean diet and serviva in a Greek population.** *N. Engl. J. Med.*, 348: 2599-2608.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Sharma, N. C., and Chauhan, D. K. (2017). **An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity.** *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 2-12.
- Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S. and La Guardia M., (2005). **The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health.** *Nutr Res Rev*, 18: 98-112.
- Tsimidou M., Lytridou M., Boskou D., Paooa-Lousi A., Kotsifaki F., Petrakis C. (1996). **On the determination of minor phenolic acids of virgin olive oil by RPHPLC.** *Grasas y Aceites* 47: 151-157.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., and Pieterse, C. M. J. (1998). **Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria.** *Annual review of phytopathology*, 36(1), 453-483.
- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., & Pieterse, C. M. (2008). **Plant immune responses triggered by beneficial microbes.** *Current opinion in plant biology*, 11(4), 443-448.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Barbetti M.J., Li H., Woo S.L. and Lorito M. (2008). **A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants.** *Physiological and molecular plant pathology*, 72:80–86
- Vinale, F., Flematti, G., Sivasithamparam, K., Lorito, M., Marra, R., Skelton, B. W. and Ghisalberti, E. L. (2009). **Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*.** *Journal of Natural Products*, 72(11), 2032-2035.
- Visioli F., Paola Mogani P., Simona grande S. and Claudio Galli C., (2004). **Olive oil and oxidative stress.** *Grassa y Aceites* 66 Vol.55 Fasc., 1: 66-75.
- Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Terezinha Zani, V., de Souza, D. and Morelo Dal Bosco, S. (2015). **Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health.** *Nutrición hospitalaria*, 31(3).

- Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Terezinha Zani, V., de Souza, D., & Morelo Dal Bosco, S. (2015). **Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health.** *Nutrición hospitalaria*, 31(3).
- Walters, D., and Daniell, T. (2007). **Microbial induction of resistance to pathogens.** *Induced Resistance for Plant Defence*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 143-156.
- Wanichpongpan, P., Suriyachan, K., Chandkrachang, S. (2001). **Effects of chitosan on the growth of *Gerbera* flower plant (*Gerbera jamesonii*),** In: *Chitin and Chitosan in Life Science*, T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (eds.), Yamaguchi, pp. 198–201.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M, Thomashow, L.S. (2002). **Microbial population responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens.** *Annual Review of Phytopathology* 40: 309-349.
- Whipps, J.M.. (2001) **Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere.** *Journal of Experimental Botany* 52, Roots special issue, pp. 487-511.
- Zipfel, C. (2008). **Pattern-recognition receptors in plant innate immunity.** *Curr. Opin. Immunol.* 20, 10–16.