UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

DIPARTIMENTO DI AGRARIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SUSTAINABLE AGRICULTURAL AND FORESTRY SYSTEMS AND FOOD SECURITY
XXXIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

PRODUZIONE DI MICRORGANISMI BENEFICI DALLE CARATTERISTICHE MIGLIORATE

Candidata: Dott.ssa Angela Pironti

Relatore:
Dott.ssa Roberta Marra

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Albino Maggio

Correlatori:
Chiar.mo Prof. Matteo Lorito
Chiar.ma Prof.ssa Sheridan L. Woo

A mia sorella

INDICE

1. INTRODUZIONE 1

1.1 Microrganismi benefici per l'agricoltura 1

1.2 Biostimolanti 5

1.3 Funghi micorrizici 8

1.4 Rizobatteri promotori della crescita 9

1.5 Caratteristiche e attività antagonista di *Trichoderma* spp. 11

1.5.1 Micoparassitismo 13

1.5.2 Antibiosi 14

1.5.3 Competizione 15

1.6 Interazione *Trichoderma*-pianta 16

1.6.1 Induzione dei meccanismi di difesa 16

1.6.2 Promozione della crescita 18

1.7 La manipolazione genetica nei funghi 19

1.7.1 Fusione di protoplasti nei funghi 21

1.8 Interazione di *Trichoderma* con *Fusarium* micotossigeni 24

1.9 SCOPO DEL PROGETTO DI TESI 27

2. MATERIALI E METODI 29

2.1 Ceppi di *Trichoderma* e produzione di protoplasti 29

2.2 Fusione di protoplasti 31

2.3 Selezione degli ibridi 33

2.3.1 Saggi di biocontrollo 33

2.3.2 Saggi di promozione della crescita in pianta 34

2.3.3 Isolamento dei nuovi ibridi da suolo rizosferico 35

2.4 Caratterizzazione degli ibridi 36

2.4.1 Analisi morfologica 36

2.4.2 Sequenziamento delle regioni ITS 37

2.4.3 Analisi RAPD 38

2.4.4 Saggi di antagonismo 42

2.4.5 Saggi di promozione della crescita 43

2.5 Analisi LC-MS 45

2.6 Esperimenti in co-coltura su mais 47

2.6.1 Ceppi fungini e condizioni di co-coltura 47

2.6.2 Estrazione del deossinivalenolo da mais 49

2.6.3 Analisi GC-MS 49

3. RISULTATI 53

3.1 Ottenimento e fusione di protoplasti 53

3.2 Selezione e isolamento degli ibridi 55

3.2.1 Attività di biocontrollo delle miscele di fusione 55

3.2.2 Attività di promozione della crescita delle miscele di fusione 58

3.2.3 Isolamento degli ibridi 61

3.3 Caratterizzazione degli ibridi selezionati 63

3.3.1 Caratterizzazione morfologica 63

3.3.2 Caratterizzazione molecolare 65

3.4 Attività di antagonismo 70

3.5 Attività di plant growth promotion 74

3.6 Analisi metabolomica 85

3.7 Effetti in co-coltura su mais 87

3.7.1 Attività di biocontrollo contro *F. graminearum* 87

3.7.2 Effetti sulla produzione della micotossina deossinivalenolo (DON) 88

4. DISCUSSIONE 91

5. CONCLUSIONI 100

6. BIBLIOGRAFIA 102

ABSTRACT

I funghi del genere *Trichoderma* sono considerati tra i principali microrganismi benefici impiegati in agricoltura grazie alla loro capacità di controllare numerosi agenti fitopatogeni, unita agli effetti benefici esercitati sulle piante, come la promozione della crescita (PGP) o l'induzione di meccanismi di resistenza (ISR). Per migliorare l'efficienza di questi funghi sono state adottate diverse tecniche di manipolazione genetica, come la trasformazione, la mutagenesi o la fusione di protoplasti (PF). Tra queste, la PF presenta numerosi vantaggi; in particolare permette di superare i vincoli dello scambio genetico che, nella maggior parte dei casi, conduce ad un'inevitabile incompatibilità vegetativa della progenie. Lo scopo di questo progetto di dottorato è stato quello di produrre mediante PF ibridi intragenici di *Trichoderma* con caratteristiche migliorate rispetto ai ceppi parentali, selezionati tra quelli che già presentavano capacità di biocontrollo, PGP o ISR. Sono state allestite due PF, la prima tra *T. harzianum* ceppo M10 e *T. virens* ceppo GV41 (fusione "MG"); la seconda tra *T. harzianum* ceppo T22 e *T. asperellum* ceppo KV906 (fusione "TK"). La progenie ottenuta è stata selezionata sfruttando un innovativo approccio *high throgouhtput* basato sull'osservazione in vivo dell'attività contro diversi agenti fitopatogeni (*Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*) e/o PGP. Dalla rizosfera di piante di *Solanum lycopersicum* inoculate con le miscele di fusione sono stati isolati in coltura monosporica 13 ibridi, successivamente caratterizzati sotto il profilo morfologico, genetico, metabolomico e funzionale. Dall'analisi delle sequenze ITS1-4 è emerso che 5 degli 8 ibridi derivanti dalla fusione MG sono geneticamente più simili alla specie *harzianum*, mentre 4 dei 5 ibridi ottenuti dalla fusione TK sono risultati più affini al parentale *T. asperellum*.

A dimostrazione dell'effettivo rimescolamento genetico ottenuto con le PF, l'analisi PCR-RAPD ha evidenziato differenze nei profili di espressione degli ibridi, anche rispetto ai ceppi parentali. Gli ibridi isolati hanno dimostrato in vitro attività antagonista contro *R. solani*, *B. cinerea* e *F. graminearum*, nonché di promuovere significativamente la crescita delle piante trattate rispetto al controllo e ai ceppi parentali (i.e. in termini di allungamento di fusto e radice e peso fresco/secco della pianta). L'analisi metabolomica degli ibridi, effettuata mediante LC-MS Q-TOF, ha indicato la produzione in coltura liquida di numerosi metaboliti secondari tipici dei ceppi di *Trichoderma* utilizzati in questo lavoro, ma anche di altri composti, come il 6- pentil-alfa-pirone (6PP), non riscontrati nelle colture dei parentali. Infine, in esperimenti in co-coltura con *F. graminearum* su mais, l'ibrido A3 ha inibito sia la crescita del patogeno, sia la produzione della micotossina deossinivalenolo (DON), come osservato dall'analisi GC-MS. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la PF unita allo screening fenotipo-guidato può rappresentare un'utile strategia per l'ottenimento di ceppi di *Trichoderma* dalle caratteristiche migliorate. Gli individui così ottenuti possono trovare immediata applicazione quali ingredienti attivi di bioformulati utili in agricoltura e, inoltre, rappresentano una valida alternativa agli OGM prodotti mediante tecniche convenzionali di manipolazione genetica.

1. INTRODUZIONE

1.1 Microrganismi benefici per l'agricoltura

La Food and Agriculture Organization (FAO) ha stimato che ogni anno fino al 40% delle colture di interesse alimentare viene perduto a causa di parassiti e fitopatie; questo compromette gravemente l'agricoltura e, di conseguenza, provoca un aumento dei prezzi al consumo (FAO, 2020). In passato c'è stato un eccessivo impiego di fertilizzanti chimici e prodotti fitosanitari di sintesi per soddisfare l'aumento della domanda di prodotti alimentari, carburanti e prodotti destinati alla trasformazione, dovuto soprattutto alla crescita della popolazione globale.

Tuttavia, se da un lato l'eccessivo utilizzo di fertilizzanti, erbicidi, insetticidi e fumiganti chimici e/o di natura sintetica ha favorito l'aumento delle rese produttive, dall'altro lato ha determinato numerosi effetti negativi sulla salute umana e sull'ambiente. Tra questi vi sono l'aumento di fenomeni di resistenza negli organismi bersaglio (Naseby et al., 2000) e la riduzione della soppressività dei suoli, ovvero della naturale capacità dei suoli di limitare lo sviluppo di malattie causate da vari patogeni tellurici (Baker e Cook 1974; Janvier et al., 2007).

La riduzione dell'utilizzo di prodotti fitosanitari sintetici può essere promossa con l'utilizzo di nuove strategie incentrate sulla lotta mirata agli organismi fitopatogeni ed alla restituzione della naturale soppressività ai suoli, puntando alla salvaguardia degli agro-ecosistemi. Tra le diverse alternative proposte, le più diffuse sono:

1. *la **lotta integrata** (Integrated Pest Management o IPM), che prevede l'impiego combinato di tecniche agronomiche, chimiche, fisiche, meccaniche e biotecnologiche al fine di contenere le popolazioni dei fitopatogeni al di sotto delle soglie di danno economico (Kogan, 1998);*

2. *la **lotta biologica** definita come "l'utilizzo di organismi viventi quali virus, batteri, funghi, protozoi, nematodi, artropodi o vertebrati, o di un loro derivato, capaci di contenere l'attività di un patogeno o di un parassita" (Lorito e Cervone, 2004).*

Nonostante la Direttiva UE 128/2009 abbia sancito l'obbligo dell'introduzione della lotta integrata in tutte le aziende agricole dell'Unione Europea, purtroppo i prodotti fitosanitari a base di microrganismi antagonisti (i cosiddetti "biopesticidi") risultano avere ancora una scarsa applicazione. Gli svantaggi principalmente legati all'impiego dei biopesticidi sono la minore efficienza rispetto ai tradizionali prodotti di sintesi e le maggiori difficoltà di gestione (come ad esempio nelle fasi di stoccaggio e nelle modalità di applicazione). Le difficoltà di gestione sono il risultato di diversi fattori: cattiva applicazione del bioformulato, un ambiente sfavorevole per il microrganismo e/o interazione con organismi autoctoni del suolo, lisciviazione del prodotto, temperatura e umidità non ottimale per il microrganismo, trattamenti ravvicinati con fungicidi o batterici.

I funghi e i batteri utilizzati come integrazione ai trattamenti chimici già effettuati o come sostituti di questi, essendo stati isolati da suoli soppressivi, riescono ad avere

un’attività di biocontrollo legata a fattori quali composizione e diversità della comunità microbica, fattori abiotici, produzione di antibiotici o alla sovrapposizione delle nicchie ecologiche tra gli organismi benefici ed i patogeni (Mazurier et al., 2009; Raaijmakers et al., 2010). Tutto ciò può far sì che il microrganismo isolato e selezionato, posto in un nuovo contesto biologico, non sia in grado di svolgere la sua attività antagonista.

Per cercare di limitare le possibili cause di “fallimento” di un bioformulato, la ricerca si è spinta verso lo studio di nuovi microrganismi capaci di adattarsi alle più svariate condizioni ambientali, dotati di attività di antagonismo o di promozione della crescita sempre maggiori e in grado di agire su differenti colture. Grazie alle innovazioni avvenute in ambito genetico/molecolare, come le nuove tecniche di sequenziamento dei genomi (NGS, Next Generation Sequencing), si è assistito alla diffusione delle scienze “omiche” come la genomica, la metabolomica, la proteomica, etc.

La genomica, occupandosi della caratterizzazione molecolare del genoma di un organismo, è stata fin dall’inizio una disciplina utilissima per poter velocizzare e ottimizzare i processi di selezione e identificazione dei nuovi agenti di biocontrollo (BCA, BioControl Agents). In particolare, sono state utilizzate tecniche di manipolazione genetica come la trasformazione, la mutagenesi e la fusione di protoplasti per cercare di migliorare le caratteristiche dei BCA già conosciuti e commercializzati.

Numerosi studi sono stati condotti sinora su diverse specie di funghi appartenenti al genere *Trichoderma*, che rappresentano senza dubbio uno degli esempi più noti ed applicati su scala mondiale di microrganismi benefici utilizzati in agricoltura per il

controllo degli organismi fitopatogeni e per il miglioramento della fitness delle piante (Woo et al., 2014).

Utilizzando vari approcci, diversi autori hanno analizzato le capacità di ceppi isolati da differenti habitat, ma sono state anche sperimentate diverse strategie per l'ottenimento di individui dalle caratteristiche migliorate rispetto ai ceppi già presenti in commercio.

1.2 Biostimolanti

La crescita continua della popolazione globale ha indotto ad una più attenta ricerca sull'incremento della disponibilità e della produzione intensiva dei prodotti agricoli. È indispensabile aumentare la resa delle coltivazioni e far sì che le produzioni agrarie siano continue e costanti nel tempo. In questo contesto giocano un ruolo fondamentale i fertilizzanti e i pesticidi che permettono di ridurre i tempi di maturazione delle colture e che evitano o riducono le perdite dei raccolti. Purtroppo, anche a causa degli effetti dei cambiamenti climatici, le coltivazioni sono sempre più vulnerabili ed è per questo che diventa necessario l'utilizzo di sostanze chimiche e/o biologiche per preservare la produttività e garantire le caratteristiche delle coltivazioni.

L'utilizzo a volte indiscriminato degli agrofarmaci si ripercuote sulla qualità dei prodotti e sulla contaminazione dei suoli, cosa che ha indotto gli organi di controllo ad introdurre norme sempre più restrittive per limitarne l'utilizzo e promuovere una maggiore tutela dell'ambiente e della salute umana. Ad esempio il glifosato, un noto erbicida usato in agricoltura e orticoltura per combattere le piante infestanti prima della semina, è balzato recentemente agli onori della cronaca a causa di una sua sospetta cancerogenicità, accusa non ancora accertata ma che ne ha limitato le condizioni di impiego (DM del 9 agosto 2016).

A supporto di un'agricoltura più sostenibile e rispettosa degli equilibri naturali presenti negli agro-ecosistemi, è possibile sfruttare i cosiddetti biostimolanti, ovvero prodotti a base di sostanze naturali e/o microrganismi capaci di promuovere lo sviluppo delle piante durante l'intero ciclo di vita della coltura. Nel 2012 la Commissione Europea ha definito i biostimolanti come "*sostanze e materiali, ad*

eccezione dei nutrienti e dei pesticidi, che, se applicati alle piante, ai semi o ai substrati di coltivazione in formulazioni specifiche, hanno la capacità di modificare i processi fisiologici delle piante in un modo che fornisce potenziali benefici alla crescita, allo sviluppo e/o alle risposte allo stress" (Jardin et al., 2015). Con questa definizione, però, non erano inclusi prodotti commerciali a base di microbi benefici e/o loro derivati. Per questo nel 2019 è stata introdotta una nuova definizione che comprendesse anche queste componenti: "*un prodotto fertilizzante dell'UE con la funzione di stimolare i processi nutrizionali delle piante indipendentemente dal tenore di nutrienti del prodotto, con l'unico obiettivo di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche delle piante o della loro rizosfera: Efficienza dell'uso dei nutrienti; Tolleranza allo stress abiotico; Caratteristiche qualitative; Disponibilità di nutrienti contenuti nel suolo e nella rizosfera.*"

I biostimolanti contribuiscono fin dalla fase di germinazione del seme o del trapianto, ove presente, sino alla raccolta, stimolando i processi naturali della pianta che contribuiscono al miglioramento dell'assorbimento e uso dei nutrienti, della tolleranza agli stress abiotici e della qualità delle colture, tutto questo utilizzando un ridotto dosaggio del prodotto.

Ad oggi è possibile dividere i biostimolanti di natura microbica in tre classi principali (Colla e Rouphael, 2015):

1. *funghi micorrizici;*
2. *rizobatteri promotori della crescita delle piante;*
3. *funghi del genere Trichoderma.*

Attualmente i biostimolanti regolamentati in Italia sono 10, ma la loro lista può essere aggiornata ogniqualvolta il Ministero dell'Agricoltura approvi un nuovo prodotto:

3. *Idrolizzato proteico di erba medica*
4. *Epitelio animale idrolizzato*
5. *Estratto liquido di erba medica, alghe e melasso*
6. *Estratto solido di erba medica, alghe e melasso*
7. *Estratto acido di alghe della famiglia Fucales*
8. *Inoculo di funghi micorizzici*
9. *Idrolizzato enzimatico di Fabacee (leguminose)*
10. *Filtrato di crema di alghe e soluzione di filtrato di crema di alghe*
11. *Estratto umico di leonardite*
12. *Estratto fluido azotato a base di alga Macrocystis integrifolia*

Sull'etichetta dei biostimolanti sono riportate per legge le dosi di impiego e le modalità d'uso, e in genere vengono somministrati alle colture in forma liquida, diluendo o disperdendo in acqua il prodotto commerciale. Ci sono prodotti a distribuzione fogliare, come ad esempio gli estratti di alghe, e prodotti con cui si realizzano invece trattamenti al terreno.

L'effetto dei biostimolanti è diverso a seconda delle specie, della fase del ciclo colturale, del luogo di coltivazione (all'aperto o in serra), ma in generale trovano un ampio impiego in orticoltura.

1.3 Funghi micorrizici

I funghi micorrizici fanno parte principalmente dei *Basidiomycota*, alcuni *Ascomycota* e pochissimi *Zygomycota*, ma i più diffusi nei prodotti commerciali appartengono ai generi *Rhizophagus* e *Funneliformis* (Smith e Read, 2008; Domínguez-Núñez et al., 2019). Il ciclo vitale di questi funghi è strettamente correlato alla presenza delle piante (Berruti et al., 2016), infatti quando nel terreno sono secreti gli essudati radicali e/o alcuni tipi di metaboliti, si sviluppa il tubo germinale primario (Tamasloukht et al., 2000). Successivamente il fungo produce una struttura simile ad un appressorio che gli permette di penetrare la pianta (Genre et al., 2005) e, una volta all'interno della pianta, si ramifica. Contemporaneamente sviluppa le ife anche nella rizosfera circostante per poter assorbire sostanze nutritive, interagire con altri microrganismi e colonizzare altre piante vicine appartenenti alla stessa specie o a specie diverse.

Il ruolo fondamentale di questi miceti è quello di aumentare la difesa delle piante contro alcuni fitopatogeni del suolo (St-Arnaud et al., 2007), infatti è stato visto che le micorrize *Rhizophagus intraradices* e *Funneliformis mosseae* riducono l'incidenza dell'attacco del nematode *Nacobbus aberrans* in piante di pomodoro (Marro et al., 2018). Alcuni studi hanno dimostrato anche che i funghi micorrizici riescono a veicolare nutrienti fondamentali per la crescita delle piante come azoto, fosforo, acqua e altri nutrienti (Mikkelsen et al., 2008; Meding et al., 2008).

1.4 Rizobatteri promotori della crescita

I rizobatteri promotori della crescita (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR), sono un gruppo di batteri capaci di colonizzare la rizosfera di alcuni tipi di piante, in particolare di leguminose. La loro presenza nel suolo è dovuta soprattutto alla presenza di nutrienti come carbonio organico, mucillagini, composti a basso peso molecolare, ossigeno etc. (Bertin et al., 2003). Sono importanti nello sviluppo e nella crescita delle piante perché possono influire in modo diretto e/o indiretto sul metabolismo vegetale. Infatti, riescono a favorire la crescita delle piante (accrescimento di germogli e radici, la ramificazione delle radici laterali, il ciclo cellulare, l'embriogenesi) attraverso la mobilitazione delle sostanze nutritive del suolo e controllano i livelli di ormoni della crescita nelle piante. Il meccanismo principale che permette ai rizobatteri di promuovere la crescita delle piante è la fissazione biologica dell'azoto. Infatti, l'azoto è presente nel suolo in una forma non biodisponibile per le piante e questi batteri lo convertono in ammoniaca che può essere usata dalle piante come fonte di azoto (Huebert et al., 1999).

Seppur in maniera più contenuta, riescono anche a stimolare la resistenza delle piante contro una vasta gamma di fitopatogeni responsabili di varie malattie delle piante (Dakoraet al., 2015; Spence e Bais, 2015). Recenti studi hanno dimostrato che alcuni rizobatteri producono enzimi e metaboliti secondari dotati di attività biologica come cellulasi, chitinasi, lipasi e proteasi contro alcuni fitopatogeni. Queste molecole sono capaci di agire direttamente sul patogeno inducendo la lisi delle cellule oppure possono agire indirettamente producendo dei siderofori i quali rendono non biodisponibile il ferro (Lochet al., 2016). È stato dimostrato che alcuni ceppi di

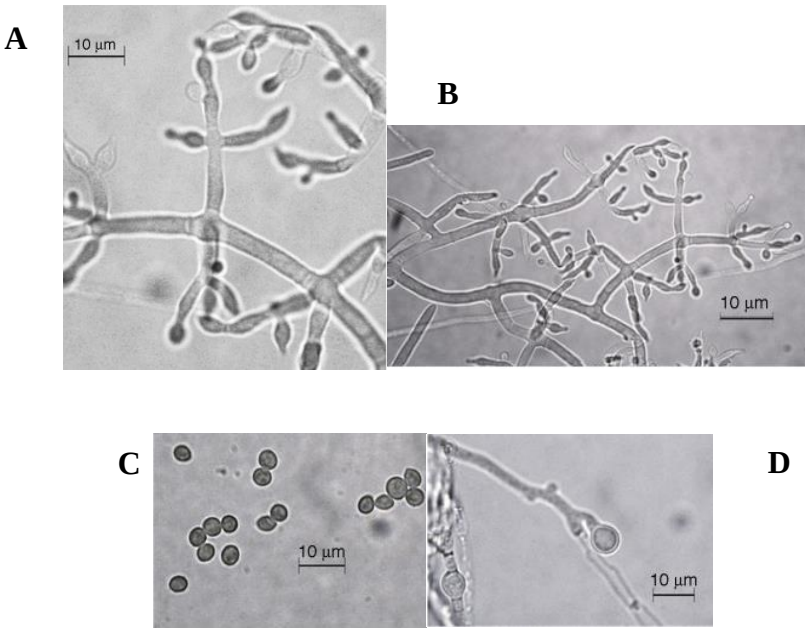
Pseudomonas sono capaci di stimolare la germinazione e la crescita di semi di *Setaria italica* (Niu et al., 2017) e del peso fresco e secco in *Vigna radiate* (Sarma e Saikia, 2014); o ancora ceppi appartenenti al *Bacillus* spp. sono noti per aumentare il contenuto di acqua nel sorgo (Grover et al., 2014).

1.5 Caratteristiche e attività antagonista di *Trichoderma* spp.

I funghi appartenenti al genere *Trichoderma* sono oggetto di studio fin dalla loro scoperta grazie alla spiccata attività di biocontrollo che si esplica sia nella capacità di micoparassitizzare i microrganismi patogeni, che di produrre metaboliti secondari dotati di attività biologica (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991; Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998). Queste caratteristiche, a cui si aggiungono l'abbondante sporulazione, l'attitudine saprofitaria e la grande adattabilità a diverse condizioni climatiche, hanno supportato l'impiego di questi miceti come biopesticidi e biofertilizzanti (Harman et al., 2004; Vinale et al., 2008; Woo et al., 2014).

I funghi del genere *Trichoderma* fanno parte della famiglia delle *Hypocreaceae* (Divisione *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordine *Hypocreales*). Questi funghi sono saprofiti contraddistinti dall'aspetto filamentoso e dal micelio dall'aspetto fioccoso. Producono tre diversi tipi di propaguli asessuati: ife ramificate con cellule polinucleate, clamidospore e conidi (Papavizas, 1985; Gans e Bissett, 1998; Chaverri e Samuels, 2003; Fig. 1.1).

Figura 1.1. Forme riproduttive agamiche di *Trichoderma* spp.: fialidi (A); conidioforo (B); conidi (C); clamidospore (D) (De la Cruz-Pérez et al., 2015).



Trichoderma spp. crescono molto rapidamente producendo un elevato quantitativo di spore, di colore variabile dal verde al giallo, e proprio questo aspetto insieme alle spiccate attività di biocontrollo, ha permesso, una rapida diffusione ed impiego in bioformulati destinati a differenti colture e contro diversi fitopatogeni (Elad, 2000; Harman et al., 2004). I principali meccanismi di antagonismo utilizzati dai ceppi di *Trichoderma* nei confronti dei funghi fitopatogeni comprendono il micoparassitismo, l'antibiosi e la competizione (Lorito et al., 1993, 1994, 2010; Sanz et al., 2004; Vinale et al., 2008).

1.5.1 Micoparassitismo

Il processo di micoparassitismo si può dividere in quattro fasi principali: riconoscimento del patogeno, attacco, penetrazione e morte dell'ospite. *Trichoderma* rileva la presenza dei fitopatogeni nella nicchia ecologica grazie alla produzione di esochitinasi extracellulari (Chet et al., 1998), le quali una volta entrate a contatto con la parete cellulare di quest'ultimo, la degradano liberando oligomeri che attivano il riconoscimento da parte di *Trichoderma* (Brunner et al., 2003). Nel momento in cui avviene il contatto, l'antagonista produce una struttura appressoria per legarsi e penetrare l'ospite. In questa fase vengono prodotti numerosi enzimi litici atti a degradare la parete cellulare del patogeno (Inbar et al., 1996; Zeilinger et al., 1999). Infine, il contenuto intracellulare del fungo bersaglio viene digerito e quindi si ha la morte dovuta a mal funzionamento cellulare (es: eventi di citolisi, degradazione delle ife fungine etc.) (Benhamur e Chet, 1996).

1.5.2 Antibiosi

Con il termine “antibiosi”, in biologia, si intende la capacità di un organismo di inibire l’attività di un altro microrganismo grazie alla produzione di metaboliti secondari, molecole dotate di attività biologica.

In particolar modo i *Trichoderma* spp. sono famosi produttori di metaboliti secondari che svolgono ruoli nel trasporto di nutrienti, nella simbiosi, nella differenziazione e nel processo di antagonismo (Demain e Fang, 2000). In quest’ultimo caso, sono prodotte delle molecole ad attività antibiotica e antifungina convenzionalmente divise in tre gruppi: composti volatili (es: 6 pentil-α-pirone), composti solubili in acqua (es: acido eptilico) e peptaiboli (oligopeptidi). Proprio queste differenze nella struttura chimica fanno sì che i target di queste molecole siano differenti; infatti, i metaboliti a basso peso molecolare (molecole polari e volatili) si diffondono nell’ambiente riuscendo a inibire anche patogeni fisicamente distanti dall’antagonista, mentre i composti ad alto peso molecolare (metaboliti polari e peptaiboli) svolgono la loro funzione nell’ambiente circostante alle ife da cui sono prodotti (Vinale et al., 2008). È stata inoltre dimostrata un’azione sinergica tra i metaboliti ad attività antibiotica e antifungina e la produzione di enzimi litici (Lorito et al., 1996a, b; Vinale et al., 2008).

1.5.3 Competizione

Nell'ambito dell'ecologia microbica, per competizione si intende quel fenomeno che si instaura tra popolazioni microbiche che condividono la stessa nicchia ecologica. La competizione può riguardare gli spazi vitali o la disponibilità di nutrienti influendo, quindi, sulle condizioni di accrescimento e sopravvivenza dei microrganismi stessi. Un esempio è rappresentato dal ferro perché, rappresentando un micronutriente fondamentale per la crescita e lo sviluppo di molti microrganismi, i funghi del genere *Trichoderma* producendo siderofori riescono a limitare e/o bloccare la crescita di patogeni (Chet et al., 1994; Eisendle et al., 2004; Benítez et al., 2004). È bene ricordare che la competizione dei nutrienti è un meccanismo importantissimo per il controllo di alcuni fitopatogeni come *Rhizoctonia solani* (Vyas et Vyas, 1995), *Botrytis cinerea* (Latorre et al., 2001) e *Fusarium graminearum* (Sivan et al., 1989).

1.6 Interazione *Trichoderma*-pianta

Diverse specie di *Trichoderma,* oltre ad avere un'attività antagonista contro numerosi patogeni, sono in grado di colonizzare le radici delle piante per stabilire dei rapporti simbiotici. In questo modo riescono a favorire la crescita della pianta e a stimolarne i meccanismi di difesa (Harman et al., 2004).

1.6.1 Induzione dei meccanismi di difesa

L'interazione che *Trichoderma* spp. instaurano con le radici delle piante determina un cambiamento nei processi biochimici di quest'ultima (Vinale et al., 2008; Bonfante et al., 2010). Questo fenomeno favorisce il manifestarsi della resistenza sistemica acquisita (SAR), provocata dall'azione del patogeno, e della resistenza sistemica indotta (ISR), innescata da microrganismi mutualistici come *Trichoderma* spp. (Pocurull et al., 2020).

Ad oggi sono conosciuti differenti modi in cui *Trichoderma* spp. stimolano la risposta difensiva della pianta quali: la produzione di proteine con funzioni enzimatiche, omologhi di proteine codificate da geni di avirulenza (Avr), produzione di oligosaccaridi e metaboliti secondari dotati di attività biologica come l'acido harzianico e il 6 pentil-α-pirone.

Inoltre, è stato dimostrato che *Trichoderma* spp. stimola l'immunità di base attivata dai pattern molecolari associati ai microbi (Microbe-associated molecular patterns triggered immunity – MTI) riducendo la suscettibilità innescata dagli effettori (Effector-Triggered Susceptibility – ETS; Dangl e Jones, 2006; Lorito et al., 2010).

Inoltre, nel momento in cui la pianta è attaccata dal patogeno, attiva i meccanismi di difesa chiamati immunità innata (PTI, PAMP- Triggered immunity) che porta all'ispessimento delle pareti cellulari e alla produzione di fitoalessine. Il patogeno, per eludere questa risposta della pianta e favorire la patogenesi, produrrà degli effettori in grado di ripristinare la ETS. Ciò comporterà un nuovo adattamento da parte della pianta che potrà riconoscere nuovi PAMP del patogeno o selezionerà nuovi geni produttori di recettori (PRR) in grado di riconoscere gli effettori prodotti dal patogeno (Dangl e Jones, 2006; Lorito et al., 2010).

In letteratura sono presenti tantissimi studi condotti su colture diverse in cui si dimostra che ceppi di *Trichoderma* sono capaci di inibire l'attacco o i sintomi delle malattia causata da diversi organismi fitopatogeni, così come di aumentare la tolleranza agli stress abiotici. Per esempio, è stato dimostrato che *T. harzianum* e *T. asperellum* hanno modulato l'espressione dei geni PR1 e PR2 (geni di difesa della pianta) favorendo una miglior risposta della pianta alle infezioni di *Colletotrichum truncatum* (Saxena et al., 2020).

La Spada et al. (2020) hanno studiato l'interazione tra piante di pomodoro, *Trichoderma* (specie *atroviride* e *asperellum)* e il patogeno *Phytophthora nicotianae.* In questo studio i ceppi di *Trichoderma* hanno indotto in pianta l'espressione di un gene legato al micoparassitismo in modo tale da contrastare in modo più efficiente l'infezione causata dal patogeno. Infine, ceppi di *T. viride* e *T. harzianum* hanno mostrato una spiccata attività di controllo del patogeno *Rhizoctonia solani* su riso (*Oryza sativa L.*) (Singh et al., 2016).

1.6.2 Promozione della crescita

In piante trattate con alcuni ceppi fungini appartenenti al genere *Trichoderma* è stato osservato un migliore assorbimento dei nutrienti e una maggiore crescita di radici e germogli (Shoresh e Harman, 2008). Questi effetti potrebbero essere dovuti a diverse attività messe in atto da *Trichoderma* spp., come l'acidificazione del pH del suolo che favorirebbe la solubilizzazione dei nutrienti ivi presenti, rendendoli maggiormente disponibili per le piante; oppure al rilascio di molecole dotate di attività biologica nella nicchia ecologica. In particolare, alcuni composti organici volatili (VOCs) prodotti da questi ceppi fungini hanno mostrato di favorire la crescita del fusto e delle radici di diversi tipi di piante, nonché di aumentare il contenuto di clorofilla (Lee et al., 2016).

Sono stati identificati diversi metaboliti secondari capaci di favorire la crescita della pianta, come il 6 pentil-α-pirone, l'acido harzianico, l'harzianolide e l'idrofobina MK1 (Garnica-vergara et al., 2015; Vinale et al., 2008, 2009 Ruocco et al., 2015). Martinez-Medina et al. (2017) hanno studiato come dei VOC prodotti da diversi ceppi di *Trichoderma*, oltre che a stimolare le risposte di difesa delle piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) e *Arabidopsis thaliana* contro il patogeno *Botrytis cinerea*, miglioravano anche le capacità di assorbimento del ferro, favorendo la crescita delle piantine. In un altro recente lavoro è stato dimostrato che piante di pomodoro trattate con il ceppo T22 di *T. harzianum* hanno avuto un incremento della resa (+40%) e del contenuto di licopene (+49%) rispetto alle piantine non trattate (Carillo et al., 2020).

1.7 La manipolazione genetica nei funghi

La ricerca di agenti di biocontrollo dotati di caratteristiche antagoniste migliori e più facilmente coltivabili ha spinto gli studi verso l'ottenimento di ceppi migliorati utilizzando metodi fisici e tecniche di manipolazione genetica. In passato, per ottenere ceppi dalle caratteristiche potenziate rispetto agli isolati naturali sono stati utilizzati agenti mutageni fisici come le radiazioni ultraviolette (UV) o agenti chimici per ottenere ceppi resistenti a fungicidi (Papavizas et al., 1982).

I mutanti ottenuti prendono il nome di mutanti auxotrofi e vengono utilizzati principalmente per la caratterizzazione fenotipica e per studi di approfondimento sullo studio genetico molecolare. Ad esempio, possono essere utilizzati per lo studio del ciclo biologico di un elemento (tipo azoto, zolfo carbonio), mediante caratterizzazioni sui diversi substrati o per lo studio di gruppi di compatibilità vegetativa (VCG) e parasessualità dei funghi, mediante colture duali e caratterizzazioni fenotipiche della progenie o con la tecnica della fusione di protoplasti, osservazione della variabilità in assenza di ostacoli di tipo genico tra diversi organismi.

È possibile ottenere mutanti auxotrofi con ridotte capacità di utilizzare il nitrato (nit) o il solfato (sul) mediante l'utilizzo di clorato di potassio o selenato di sodio che sono i substrati contenenti gli analoghi tossici di nitrato e solfato (Correll et al., 1987). Gli effetti degli analoghi tossici riguardano l'interruzione della via metabolica dell'azoto o dello zolfo in punti diversi, che vengono poi rilevati attraverso caratterizzazioni fenotipiche su diversi substrati contenenti varie fonti di azoto o zolfo.

Tuttavia, la progenie risultante (mutanti auxotrofi) è risultata spesso instabile e i caratteri d'interesse non erano mantenuti nel tempo. Al contrario, con l'impiego delle

tecniche genetiche, come la fusione di protoplasti, si riusciva a superare diversi problemi, quali ad esempio l'incompatibilità tra i diversi ceppi impiegati e la stabilità della progenie. Un esempio sono i diversi mutanti auxotrofi di *Aspergillus oryzae* che in passato venivano sintetizzati usando irradiazione UV, agenti chimici mutageni, o interruzione dei geni bersaglio per omologo ricombinazione, mentre oggi principalmente ottenuti per il metodo PMT (Plasmid Mediated Trasformation) (Jin et al., 2014; Yamada et al., 2014; Yoon et al., 2011; Zhu et al., 2013). *A. oryzae* è un fungo filamentoso ufficialmente approvato dalla U.S. Food and Drug Administration con capacità di secrezione di grandi quantità di enzimi nei terreni di coltura (Abe et al., 2006; Oda et al., 2006).

Un altro esempio è la mutagenesi di *Volvariella volvacea* mediante esposizione ai raggi UV, che è stata ampiamente utilizzata per migliorare la tolleranza al freddo e il tempo di conservazione a basse temperature, ma non per aumentare la produttività (Mukherjee e Sengupta, 1986; Zhang e Guo, 2011; Zhu et al., 2016).

Di solito i mutanti auxtrofi nei funghi venivano utilizzati anche per studi di caratterizzazione fenotipica, genetica e/o metabolica. Ma il problema principale riscontrato nel corso dei lavori era legato alla tossicità dei prodotti utilizzati, al rischio per la salute dell'operatore e l'inefficacia dei prodotti finali ottenuti (Harman, 1992; Harman et al., 2019).

1.7.1 Fusione di protoplasti nei funghi

I funghi filamentosi appartenenti alla divisione *Ascomycota* e *Basidiomycota* vanno spesso incontro ad eventi di anastomosi, cioè alla fusione dei conidi (spore asessuate) e dei germogli conidiali. In alcuni casi la fusione avviene tra ife fungine appartenenti allo stesso fungo e l'organismo prodotto è definito *omocariotico* (senza modifiche al corredo genetico) (Trinci et al., 1994). Questo processo viene utilizzato per favorire la ramificazione della colonia fungina e regolare la sua omeostasi complessiva attraverso lo scambio di nutrienti, acqua, molecole di segnalazione, nuclei e altri organelli (Fricker et al., 2007; Read et al., 2010).

L'anastomosi può avvenire anche tra conidi ifali di funghi appartenenti a specie diverse, portando alla formazione di cellule contenenti più nuclei geneticamente differenti. In quest'ultimo caso quello che ne risulta è un *eterocarion*, ovvero uno stato nel quale nuclei aploidi condividono lo stesso citoplasma. Nella maggior parte dei casi, l'*eterocarion* dà origine ad un'incompatibilità vegetativa dovuta a differenze alleliche in loci specifici, che causano la morte della cellula poiché le modifiche avvenute non consentono la vita del nuovo organismo (Leslie e Zeller, 1996; Jacobson et al., 1998; Glass et al., 2000). Ad oggi, nonostante i numerosissimi studi per capire cosa c'è alla base dell'incompatibilità da *eterocarion* nei funghi, non esiste ancora una risposta precisa. Molto probabilmente questo sistema può servire a limitare i danni ottenuti da un incidente evolutivo, come quando in altri organismi si assiste alla sterilità del soggetto portatore di polimorfismo non neutro per la specie (Coyne, 1992).

Utilizzando la tecnica della fusione dei protoplasti tra organismi fungini si realizza *in vitro* quello che normalmente accade in natura, ovvero un'*anastomosi* inter- o intra-specifica. Molti studi sottolineano l'importanza e il successo di questa tecnica applicata ad organismi fungini, ed in particolare a specie appartenenti al genere *Trichoderma*, perché permette di superare i vincoli dello scambio genetico che, nella maggior parte dei casi, conducono ad un'inevitabile incompatibilità vegetativa della progenie. La tecnica è definita come cito-trasformazione e prevede la formazione di *eterocarion*, fusione nucleare, diploidizzazione e aploidizzazione della cellula (Reymond et al., 1986).

Le cellule derivanti dall'evento di fusione possono presentare caratteristiche di entrambi i ceppi parentali e/o singole caratteristiche potenziate. Grazie a queste importanti aspetti, la tecnologia, anche se scoperta e applicata da tantissimo tempo, resta ancora tra le più utilizzate per ottenere dei microrganismi potenziati impiegati nella bioingegneria, nella biotecnologia e l'industria della fermentazione (Muralidhar et al., 2000).

Esistono due tipologie di fusione protoplastica: la chemiofusione e l'elettrofusione. Entrambe prevedono una prima fase di digestione della parete cellulare fungina tramite utilizzo di enzimi digestivi come le chitinasi. La procedura deve avvenire in presenza di un buffer stabilizzante a base di cloruro di sodio, mannitolo o altri osmostabilizzanti per evitare la rottura della membrana cellulare. Una volta ottenuti i protoplasti è possibile procedere con la chemiofusione utilizzando un fusogeno chimico, come il glicole di polietilene (PEG) (Toyama et al., 1983), oppure si può optare per l'elettrofusione in cui si favorisce l'evento di fusione sfruttando degli impulsi elettrici specifici. Infine, è possibile caratterizzare gli ibridi ottenuti

utilizzando differenti tecniche genetiche, come la RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), gli RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism) e i marcatori SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (Skoneczny et al., 2015).

In letteratura esistono molti studi di fusione protoplastica nei funghi, in particolar modo con *Trichoderma* spp., come la fusione tra *T. reesei*, noto produttore di cellulasi, con *T. harzianum*, produttore di chitinasi, entrambi enzimi di interesse industriale (Gracheck, 1984; Lalithakumari, 2000). Il ceppo *T. harzianum* T22 (KRL-AG2), ingrediente attivo di numerosi bioformulati commerciali, è stato ottenuto tramite fusione di protoplasti, ottenendo un miglioramento dell'attività di biocontrollo rispetto ai parentali usati (Vitale et al., 2012; Harman, 2000).

1.8 Interazione di *Trichoderma* con *Fusarium* micotossigeni

I funghi del genere *Trichoderma* si sono dimostrati in grado di tollerare diversi contaminanti ambientali e possiedono elevate capacità metaboliche per degradare questi xenobiotici tossici (Tripathi et al., 2013). Ad esempio, *Trichoderma* spp. ha dimostrato di bio-mineralizzare *in vitro* suoli contaminati da arsenico e piombo (Govarthanan et al., 2019).

In quest'ottica, alcuni studi si sono concentrati sull'eventuale capacità di questi miceti di contrastare i funghi micotossigeni e i loro metaboliti secondari, le micotossine. Queste ultime rappresentano una delle principali fonti di contaminazione di alimenti e mangimi (Bezerra da Rocha et al., 2014), nonché un serio rischio per la salute umana e animale a causa della loro tossicità (Zain, 2011).

Alcune specie di *Fusarium* (tra cui *F. graminearum, F. asiaticum, F. verticilloides*) sono gli agenti causali di importanti fitopatie, come la fusariosi (Fusarium Head Blight, FHB) e il marciume rosato della spiga in mais e orzo (Bakker et al., 2018; D'Mello et al., 1999), oltre che importanti produttori di micotossine sia in campo che in post-raccolta. Il meccanismo utilizzato da questi funghi per causare l'infezione comprende la secrezione di enzimi degradativi della parete cellulare (Cell Wall Degrading Enzymes", CWDE), come poligalatturonasi, pectinmetilesterasi e xilanasi, capaci di degradare la parete cellulare vegetale per consentire la penetrazione delle ife fungine (Hammer et al., 1997).

Contemporaneamente, per inibire le risposte di difesa della pianta e facilitare il processo infettivo, *Fusarium graminearum* produce delle micotossine, come il tricotecene deossinivalenolo (DON). Il meccanismo d'azione di questa tossina è dovuto principalmente alla sua forma chimica, ovvero un 12,13-epossi-tricotec-9ene tetraciclico (Fig. 1.2). Grazie a questa particolare conformazione riesce a inibire la sintesi proteica della cellula, interferendo con i pathway metabolici di proliferazione, differenziazione e apoptosi, ma riesce anche ad influenzare le funzionalità della membrana cellullare (Pestka, 2007). Nei mammiferi può causare: vomito, immunosoppressione, effetti dermatossici ed emorragici (Kouadio et al., 2007).

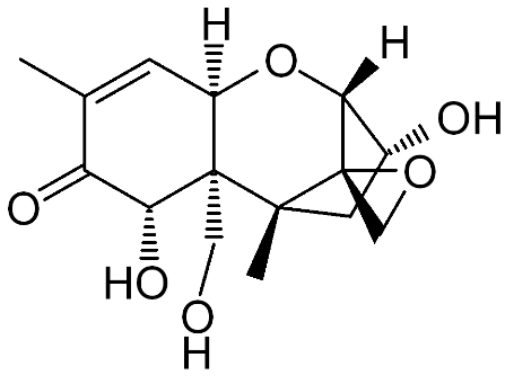


Figura 1.2. Formula di struttura della micotossina deossinivalenolo (DON). *Fonte: Chemspider.com*

Il controllo della fusariosi causata da *F. graminearum* è quindi fondamentale perché il patogeno, oltre a causare un graduale disseccamento della spiga del cereale con una conseguente perdita in termini economici, provoca anche un accumulo di micotossine che se ingerite possono causare gravi danni per la salute umana. L'unica via per cercare di contenere le infezioni di questo come di altri patogeni simili, è la prevenzione da attuare in campo attraverso tecniche agronomiche, quali la rotazione

delle colture, l'utilizzo di appropriate tecniche di irrigazione e fertilizzazione, o mediante l'uso di biopesticidi (Kabak et al., 2006). Una valida alternativa per il contenimento delle micotossine potrebbe essere rappresentata dall'impiego di funghi e batteri benefici capaci di controllare il patogeno e/o la produzione dei metaboliti secondari tossici.

In letteratura sono presenti studi che propongono l'utilizzo di batteri del genere *Propionibacterium* (*P. jensenii*, *P. acidipropionici*, *P. thoenii*) dotati di attività antimicotica (Lind et al., 2005); oppure del fungo *Aspergillus parasiticus* che riesce ad inibire del 53% della crescita del patogeno (Munimbazi e Bullerman, 1998) o dei funghi appartenenti al genere *Trichoderma* (Matarese et al., 2017; Tian et al.,2020). L'utilizzo di antagonisti benefici potrebbe rappresentare una strategia sostenibile ed ecologica per il controllo dei funghi micotossigeni sia in pre- che in post-raccolta.

L'efficacia di *Trichoderma* spp. nel contrastare *Fusarium* spp. è risultata dipendente non solo dalle specie/ceppi coinvolti, ma anche dalle condizioni sperimentali. In saggi di competizione diretta, i ceppi *T. atroviride* Q710251 e *T. asperellum* Q710682 hanno mostrato maggiore attività di biocontrollo nei confronti del patogeno, mentre *T. koningii* GIM3.137 ha influenzato la crescita del patogeno e la produzione di micotossine attraverso la produzione di composti volatili (Tian et al., 2020). Gli stessi autori ipotizzano inoltre che alcune specie di *Trichoderma* siano in grado di trasformare le micotossine prodotte da *Fusarium* spp. (in particolare, i tricoteceni tra cui l'acido fusarico) nei rispettivi derivati glicosilati, meno tossici. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per chiarire quali enzimi siano effettivamente coinvolti nella bioconversione delle micotossine in *Trichoderma* (Tripathi et al., 2013).

1.9 SCOPO DEL PROGETTO DI TESI

La continua ricerca di alternative ai fertilizzanti chimici e ai pesticidi di sintesi per migliorare la fertilità dei suoli e la produttività delle colture ha posto l'accento sulle interazioni che hanno luogo a livello della rizosfera e sul ruolo che i microrganismi associati alle piante possono avere nel promuovere la salute delle piante e ridurre la dipendenza dagli agrofarmaci.

Negli ultimi anni la manipolazione del microbioma vegetale è stata proposta come potenziale strategia per attuare un efficace biocontrollo in campo. Secondo Berg e collaboratori (2017) l'utilizzo di organismi capaci di modificare la struttura e le interazioni del microbioma vegetale può contribuire efficacemente a stimolare le difese delle piante nei confronti dei loro nemici naturali.

Lo scopo di questo progetto di dottorato è stato quello di produrre, studiare ed applicare nuovi ceppi di *Trichoderma* spp. come bioformulati in campo agrario per la lotta biologica ai fitopatogeni e/o come biofertilizzanti. L'obiettivo è quello di produrre nuove specie con caratteristiche migliorate rispetto ai parentali e/o che presentino contemporaneamente peculiarità di entrambi, come ad esempio l'attività di biocontrollo, la promozione della crescita in pianta, la produzione di metaboliti secondari dotati di attività biologica.

La prima fase del progetto di dottorato si è concentrata sull'ottimizzazione del protocollo di ottenimento degli ibridi di *Trichoderma* mediante fusione di protoplasti. Questa tecnica di manipolazione genetica permette di superare eventuali problemi di incompatibilità vegetativa della progenie e di sviluppare una progenie che manifesta caratteristiche derivanti da entrambi i ceppi parentali impiegati. La fusione di

protoplasti, inoltre, non richiede l'utilizzo di agenti mutageni (irraggiamento UV) e/o metodi chimici, come accade per i mutanti auxotrofici. La progenie risultante da questi eventi di mutazione è spesso instabile e non idonea al processo di selezione *high throughput* mentre, nel caso della fusione di protoplasti, gli ibridi ottenuti risultano essere molto più stabili e presentano caratteristiche di entrambi i ceppi parentali e/o singole caratteristiche potenziate rendendoli così, idonei a questo nuovo approccio di selezione basato sull'osservazione del fenotipo. La scelta dei quattro ceppi è stata fatta in base alle caratteristiche ricercate, ossia: il ceppo M10 di *T. harzianum* e il ceppo KV906 di *T. asperellum*, noti per l'attività di biocontrollo contro patogeni come *Botrytis cinerea*, *Pythium irrregulare* e *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum* (Vinale et al., 2008; Yu et al., 2020); i ceppi T22 di *T. harzianum* e il ceppo GV41 di *T. virens* dotati di attività di promozione della crescita e aumento della resa su alcune colture come lattuga, fragola e lenticchie (Fiorentino et al., 2018; Lombardi et al., 2020; Bazghaleh et al., 2020).

Nella seconda fase del lavoro sono stati isolati gli ibridi ottenuti dalle miscele di fusione, mediante un approccio fenotipico "*high throughput*" basato sull'osservazione *in vivo* di contenimento di alcuni microrganismi patogeni e la promozione della crescita delle piante. Dalla rizosfera delle piantine che hanno mostrato avere una fitness migliore rispetto a quelle trattate con parentali sono stati isolati nuovi ibridi sui quali sono state ulteriori indagini volte a caratterizzarne gli aspetti molecolari, metabolici e biologici. I nuovi ibridi sono stati poi saggiati singolarmente sia per il biocontrollo che per la promozione della crescita, per valutare l'effettivo miglioramento delle attività di biocontrollo e/o di promozione della crescita rispetto a i ceppi parentali.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi di *Trichoderma* e produzione di protoplasti

I ceppi fungini parentali utilizzati in questo lavoro di tesi per la creazione di ibridi dalle caratteristiche migliorate sono stati:

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

Le colture fungine sono state ottenute da collezioni disponibili presso il Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. I microrganismi sono stati allevati a 25 °C per due giorni su piastre Petri contenenti substrato nutritivo (Potato Dextrose Agar, PDA; HIMEDIA, Pvt. Ltd., Mumbai, India).

Per la produzione di protoplasti fungini è stato utilizzato il protocollo descritto da Stasz et al. (1988) con qualche modifica. Per ogni ceppo parentale sono stati prelevati da colture in crescita attiva su PDA 50 dischetti di micelio non sporulato (diametro 5 mm) e trasferiti in beute contenenti 200 mL di Potato Dextrose Broth (PDB; HIMEDIA) arricchito con 1,5% (p/v) di estratto di lievito (Scharlau Microbiology, Barcellona, Spagna). Al fine di ottenere dei microtalli di dimensioni comprese tra 1 e 2 cm di diametro, le beute sono state incubate a 25 °C e 140 rpm di agitazione per 24h. Successivamente le colture sono state filtrate utilizzando carta da filtro (Whatman No. 4, Brentford, UK) e una parte (1 g) della biomassa ottenuta per

ciascun ceppo è stata trasferita in tubi da centrifuga da 50 mL contenenti 10 mL di Novozyme (13 mg/mL in 0,7 M NaCl; Novo Laboratories, Wilton Connecticut) contenente un mix di enzimi per la digestione delle pareti cellulari fungine. La miscela è stata incubata a 30 °C e 70 rpm di agitazione. A intervalli regolari l'andamento della digestione enzimatica è stato monitorato mediante osservazione al microscopio ottico. Dopo circa 4 h di digestione, la miscela è stata filtrata asetticamente e centrifugata a 2000 rpm per 5 minuti; il surnatante è stato eliminato e i protoplasti sono stati stabilizzati mediante risospensione in 2 mL di soluzione osmoregolatrice (Sorbitol-Tris-HCl-$CaCl_2$, STC) contenente 0,6 M sorbitolo, 0,01 M Tris-HCl, 0,01 M $CaCl_2$, pH 7,5.

I prodotti utilizzati per la preparazione di questa e delle altre soluzioni utilizzate in questo progetto di tesi sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), se non diversamente specificato.

La concentrazione di protoplasti è stata determinata mediante l'utilizzo di un vetrino contaglobuli (BlauBrand, DE) e aggiustata al valore desiderato mediante l'aggiunta di un opportuno volume della soluzione STC.

2.2 Fusione di protoplasti

Le colture di protoplasti ottenute dai ceppi parentali di *Trichoderma* sono state utilizzate per preparare due miscele di fusione, denominate MG e TK (Tab. 2.1). In ciascuna miscela sono stati utilizzati come parentali un ceppo di *T. harzianum* (M10 e T22, rispettivamente nelle miscele MG e TK) e un ceppo di un'altra specie (*T. virens* ceppo GV41 per la miscela MG e *T. asperellum* ceppo KV906 per la miscela TK).

I quattro ceppi di *Trichoderma* sono stati selezionati in quanto già caratterizzati per capacità di biocontrollo e/o promozione della crescita vegetale. Il ceppo T22 di *T. harzianum* è l'ingrediente attivo di numerosi biopesticidi e biostimolanti registrati ed applicati in tutto il mondo (Woo et al., 2014). Il ceppo GV41 di *T. virens* e il ceppo KV906 di *T. asperellum* hanno mostrato in prove di campo attività di promozione della crescita ed incremento del contenuto nutrizionale degli alimenti ottenuti dalle piante trattate (Marra et al., 2019; Lombardi et al., 2020; Rouphael et al., 2020; Visconti et al., 2020). Infine, il ceppo M10 di *T. harzianum*, attraverso la produzione di un suo metabolita secondario, l'acido harzianico, ha dimostrato sia attività di biocontrollo, sia di promozione della crescita in pianta (Vinale et al., 2009, 2013).

Tabella 2.1. Composizione delle miscele di fusione utilizzate per la produzione di ibridi di *Trichoderma*.

Miscela di fusione	Parentale 1	Parentale 2
MG	*T. harzianum* ceppo M10	*T. virens* ceppo GV41
TK	*T. harzianum* ceppo T22	*T. asperellum* ceppo KV906

Per la preparazione delle miscele di fusione, 1 mL di protoplasti (1×10^8 per mL) di ciascun parentale è stato trasferito in tubi da centrifuga di 15 mL contenenti 200 µL della soluzione di fusione, composta da polietilene glicole (PEG, 60% p/v), 10 mM $CaCl_2$ e 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Le miscele sono state agitate manualmente per 1 minuto molto lentamente per evitare la rottura delle cellule di protoplasti. Successivamente sono stati aggiunti altri 500 µL della soluzione di fusione; questo passaggio è stato ripetuto due volte.

Dopo un'incubazione a 30 °C per 15 minuti e 40 rpm di agitazione, le miscele di fusione sono state stabilizzate aggiungendo 1,1 mL di STC e quindi centrifugate a 2000 rpm per 3 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 3 mL di STC. Da questa soluzione sono stati prelevati 150 µL e inoculati in piastre Petri contenenti un substrato nutritivo che favorisce la rigenerazione della parete cellulare [PRM; composizione per litro: 2,8g $(NH_4)_2SO_4$; 600mg CH_4N_2O; 4g KH_2PO_4; 40g glucosio; 20g Agar; 600mg $CaCl_2$; 200mg $MgSO_4$; 10mg $FeSO_4$; 2,8mg $ZnSO_4$; 3,2mg $MnSO_4$; 4mg CoCl; 10% (p/v) saccarosio come agente osmoticante]. Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente per 3 giorni.

Le spore prodotte dalle miscele di fusione sono state raccolte in una soluzione al 20% (v/v) di glicerolo, contate e conservate a -20 °C fino al loro utilizzo.

2.3 Selezione degli ibridi

La selezione degli ibridi ottenuti mediante fusione di protoplasti è stata condotta mediante valutazione dell'effetto fenotipico *in vivo* su piante di pomodoro in termini di attività di biocontrollo e promozione della crescita. Nello specifico le colonie potenzialmente ibride sono state selezionate dalla rizosfera delle piante trattate che hanno mostrato minore attacco da parte di un microrganismo patogeno o un maggiore sviluppo rispetto a quelle inoculate con i singoli parentali o ai controlli (piante trattate con acqua).

2.3.1 Saggi di biocontrollo

Semi di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) cv. San Marzano nano sono stati posti in contenitori alveolari in polistirolo (ogni alveolo conteneva 20 mL di suolo sterilizzato) ed allevati in camera di crescita in condizioni controllate (25 °C, 16/8 h fotoperiodo).

Dopo 10 giorni, le piantine sono state traferite in polistiroli alveolati contenenti 200 mL di terreno infetto dal patogeno tellurico *Rhizoctonia solani* Kuhn. Per la preparazione del suolo infetto il patogeno è stato preventivamente cresciuto in PDB per circa 4 giorni. La biomassa ottenuta è stata filtrata (Whatman n.4), pesata e successivamente omogenizzata in acqua. Il suolo è stato quindi miscelato alla sospensione fungina considerando una concentrazione di 5g di biomassa fungina per kg di suolo sterile.

Il giorno successivo al trapianto le piante sono state trattate mediante irrigazione del suolo con 2 mL di sospensioni di spore di *Trichoderma* [1 x 10^7 spore/mL] per ciascuna condizione considerata (miscele di fusione e parentali singoli). Le piante trattate con acqua sterile sono state utilizzate come controlli negativi. Sono state considerate 10 repliche per ciascuna condizione saggiata.

Dopo 5 giorni, si è proceduto con la valutazione dei sintomi della malattia, registrando il numero di piante avvizzite (con evidente imbrunimento delle radici e strozzatura della zona del colletto) e il numero di piante morte a causa del marciume al colletto.

2.3.2 Saggi di promozione della crescita in pianta

Semi di pomodoro cv. San Marzano nano sono stati sterilizzati superficialmente con una soluzione all'1% (v/v) di ipoclorito di sodio, poi sciacquati in acqua sterile e immersi per 24 ore in 2 mL della sospensione di spore [1 × 10^7 spore/mL] delle miscele di ceppi di *Trichoderma* derivati dalle fusioni di protoplasti e dei rispettivi parentali, considerando 20 semi/mL. Le piante trattate con acqua sterile sono state utilizzate come controlli negativi. Per ciascuna condizione saggiata sono state effettuate 10 repliche biologiche.

Successivamente i semi sono stati trasferiti in terreno sterile ed allevati in camera di crescita in condizioni controllate (25 °C, 16/8 h fotoperiodo). Dopo 15 giorni, i trattamenti sono stati nuovamente effettuati mediante irrigazione del suolo (2 mL/pianta di una sospensione di spore 1 × 10^7 spore/mL). Trascorso un mese dalla

messa a dimora dei semi, sono state misurate la lunghezza del fusto e delle radici di tutte le piante ed è stato valutato l'aspetto generale delle piante trattate.

I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante l'analisi statistica ANOVA one-way e le differenze significative tra i trattamenti sono state confrontate utilizzando test post hoc S–N-K (Student-Newman-Keuls) e Fisher's least significant difference (LSD) con livello di significatività pari a 0,05.

2.3.3 Isolamento dei nuovi ibridi da suolo rizosferico

Dalla rizosfera delle piante trattate con le miscele di fusione (par. 2.3.1 e 2.3.2) sono stati isolati gli ibridi che hanno mostrato una migliore fitness comparata a quella delle piante trattate con i parentali o con acqua. Allo scopo sono stati utilizzati protocolli standard che prevedono diluizioni seriali e successiva crescita su substrati nutritivi selettivi per i funghi del genere *Trichoderma* (Elad e Chet, 1983).

Nel dettaglio, 10 g di suolo rizosferico prelevato in prossimità dell'apparato radicale delle piante trattate sono stati risospesi in 50 mL di acqua sterile e posti in agitazione a 100 rpm per 40 minuti. Da questa sospensione sono state ottenute diluizioni seriali che sono state piastrate (100 µL delle diluizioni 10^{-7}, 10^{-8} e 10^{-9}) in triplicato su piastre Petri contenenti PDA e incubate a 25 °C per 24-36 h. Appena risultavano visibili i filamenti ifali, si è proceduto a trasferirli in nuove piastre Petri. Questo procedimento finalizzato all'ottenimento di colture monosporiche, cioè derivanti da una singola spora, è stato ripetuto 3 volte per assicurare la purezza della nuova coltura.

Le colture ottenute sono state allevate su piastre di PDA con aggiunta di acido lattico (0,1% v/v) a 25 °C fino a completa sporulazione; le spore sono state raccolte in una soluzione al 20% (v/v) di glicerolo, contate e conservate in aliquote da 1 mL a -80 °C fino al loro utilizzo.

2.4 Caratterizzazione degli ibridi

2.4.1 Analisi morfologica

Per ciascuna coltura ibrida isolata e per i rispettivi parentali è stata valutata la capacità di crescita su diversi substrati nutritivi addizionati di acido lattico (0,1% v/v): Rose Bengal + cloramfenicolo, TSAB (*Trichoderma harzianum* selective agar base) e PDA (tutti HI-MEDIA). Un dischetto di agar (5 mm di diametro) è stato prelevato dai margini di una coltura in crescita attiva su PDA e trasferito al centro di una piastra di Petri contenente il substrato di crescita. Le piastre sono state incubate a 25 °C e la crescita radiale è stata monitorata giornalmente. Per ciascuna coltura sono state realizzate 5 repliche biologiche.

2.4.2 Sequenziamento delle regioni ITS

Le colture ibride ottenute a partire dalle due miscele di fusione (MG e TK, Tab. 2.1) e risultate morfologicamente diverse dai corrispettivi parentali sono state sottoposte a identificazione della specie mediante amplificazione e sequenziamento di regioni non codificanti presenti nel DNA ribosomiale, comprendenti le regioni ITS (Internal Transcribed Spacer) 1 e 2 e il gene 5.8S. A tale scopo sono stati utilizzati i primer universali ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). L'utilizzo di questo gene, così come quello di altri marcatori (translation elongation factor 1-alpha, *tef1*, beta-tubulina e gamma-actina), consente di discriminare tra specie affini, anche se a volte può essere utile abbinare i sequenziamenti ad analisi RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Le sospensioni di spore (100 μL concentrate 10^8 sp/mL) di ogni ceppo sono state inoculate in 25 mL di PDB e incubate a 25 °C per 48 h in agitazione. I germinelli fungini sono stati separati dal substrato mediante filtrazione asettica e sottoposti ad estrazione del DNA mediante il DNA NucleoSpin Soil kit (Machery-Nagel GmbH & Co., Dueren, Germany) seguendo le indicazioni del produttore.

Il DNA ottenuto è stato amplificato mediante PCR impiegando il kit PCR Master Mix 2X-ready to use (ThermoFisher Scientific, CA, USA). Gli oligonucleotidi impiegati (ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') relativi alla regione ITS 1-4, hanno consentito di amplificare una regione di circa 600 bp. La reazione d'amplificazione è stata eseguita in un termociclatore (Applied Biosystems 2700, USA) con un ciclo di 1

min. a 95 °C, seguito da 35 cicli suddivisi in: 45 sec. a 95 °C, 50 sec. a 55 °C e 1 min. a 72 °C, ed un'estensione finale a 72 °C per 10 min.

I prodotti ottenuti sono stati visualizzati su gel di agarosio 1,2 % (p/v) in TBE 1X (54 g di Tris-base, 27,5 g di acido borico, 20 mL 0,5 M di EDTA pH 8,0) e quantificati mediante analisi fluorometrica (Qubit, ThermoFisher Scientific).

Il sequenziamento delle regioni ITS1-4 è stato eseguito dalla Eurofins Scientific (Eurofins Genomics Italy, Milano, IT). Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma di allineamento multisequenze Clustal V method (Higgins e Sharp, 1989) compreso nel pacchetto Megalign (DNAStar, Madison, WI, USA).

2.4.3 Analisi RAPD

Il DNA estratto dagli ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalle due fusioni di protoplasti è stato sottoposto ad analisi RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). La reazione RAPD è stata eseguita in un volume totale di 25.0 μL, contenenti 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1.5 mM $MgCl_2$, 0,01% (p/v) gelatina, 2 mM di ciascun dNTP (ThermoFisher Scientific), 40 pmol di ciascun primer, 1.5 U di Taq DNA polimerase (ThermoFisher Scientific) e 30 ng di DNA stampo. L'elenco dei primer utilizzati è riportato nella Tabella 2.2. Le sequenze dei primer sono state ottenute da precedenti lavori presenti in letteratura o appositamente disegnati per questo lavoro di tesi.

La reazione è stata eseguita in un termociclatore (Applied Biosystems 2700) con un ciclo di 5 min. a 95 °C, seguito da 35 cicli suddivisi in: 45 sec. a 95 °C, 30 sec. a 36 °C e 1 min. a 72 °C ed un'estensione finale a 72 °C per 5 min.

Tabella 2.2. Elenco di primer utilizzati per le analisi RAPD.

Sequenza (5'-3')	Sigla	Referenze	Sequenza (5'-3')	Sigla	Referenze
GTTTCGCTCC	**OPB-01**		TCGGCGATAG	**OPA 12**	Narayanasamy et al.,2009
CAGGCCCTTC	**OPB-01**		CAGCACCCAC	**OPA 13**	El Komy et al., 2015
TGATCCCTGG	**OPB-02**		TCTGTGCTGG	**OPA 14**	Sharma et al., 2009
CATCCCCCTG	**OPB-03**		TTCCGAACCC	**OPA 15**	Sharma et al., 2009
TGCGCCCTTC	**OPB-05**	El Komy et al., 2015	AGCCAGCGAA	**OPA 16**	Kumar et al., 2011
TGCTCTGCCC	**OPB-06**		GACCGCTTGT	**OPA 17**	Sharma et al., 2009
GGTGACGAG	**OPB-07**		AGGTGACCGT	**OPA 18**	El Komy et al., 2015
GTCCACACGG	**OPB-08**	Shanmugam et al., 2008	CAAACGTCGG	**OPA 19**	Kumar et al., 2011
TGGGGGACTC	**OPB-09**		GTTGCGATCC	**OPA 20**	Kumar et al., 2011
CTGCTGGGAC	**OPB-10**		CTACGGAGGA	**OPG-01**	
GTAGACCCGT	**OPB-11**		GGCACTGAGG	**OPG-02**	
CCTTGACGCA	**OPB-12**		GAGCCCTCCA	**OPG-03**	
TTCCCCCGCT	**OPB-13**		AGCGTGTCTG	**OPG-04**	
TCCGCTCTGG	**OPB-14**		CTGAGACGGA	**OPG-05**	El Komy et al., 2015
AGGGAACGAG	**OPB-17**		CAGACAAGCC	**OPX-15**	
CCACAGCAGT	**OPB-18**		TCTCAGCTGG	**OPH-16**	Gurumurthy et al., 2013
ACCCCCGAAG	**OPB-19**	El Komy et al., 2015	CACTCTCCTC	**OPH-17**	Gurumurthy et al., 2013

Tabella 2.2. *Continuo*

GGACCCTTAC	**OPB-20**		GAATCGGCCA	**OPH-18**	Gurumurthy et al., 2013
CAGGCCCTTC	**OPA 01**	Kumar et al., 2011	CTGACCAGCC	**OPH-19**	Abbasi et al., 1999
TGCCGAGCTG	**OPA 02**	El Komy et al., 2015	GGGAGACATC	**OPH-20**	Abbasi et al., 1999
Sequenza (5'-3')	**Sigla**	**Referenze**	**Sequenza (5'-3')**	**Sigla**	**Referenze**
AGTCAGCCAC	**OPA 03**	Kumar et al., 2011	CTGGGCAACT	**OPM-06**	Shafique et al., 2011
GGACTGGAGT	**OPA 04**	El Komy et al., 2015	CCGTGACTCA	**OPM-07**	Shafique et al., 2011
AGGGGTCTTG	**OPA 05**	El Komy et al., 2015	TCTGTTCCCC	**OPM-08**	Shafique et al., 2011
GGTCCCTGAC	**OPA 06**	Kumar et al., 2011	GTCTTGCGGA	**OPM-09**	Shafique et al., 2011
GAAACGGGTG	**OPA 07**	Kumar et al., 2011	TCTGGCGCAC	**OPM-10**	Shafique et al., 2011
Sequenza (5'-3')	**Sigla**	Referenze	Sequenza (5'-3')	**Sigla**	Referenze
GTGACGTAGG	**OPA 08**	Kumar et al., 2011	GGAGCCTCAG	**OPX-11**	
GGGTAACGCC	**OPA 09**	Sharma et al., 2009	TCGCCAGCCA	**OPX-12**	Góes et al., 2002
GTGATCGAG	**OPA 10**	El Komy et al., 2015	ACGGGAGCAA	**OPX-13**	
CAATCGCCGT	**OPA 11**	El Komy et al., 2015	ACAGGTGCTG	**OPX-14**	

2.4.4 Saggi di antagonismo

Per valutare la capacità degli ibridi di *Trichoderma* di inibire *in vitro* la crescita di agenti fitopatogeni sono state allestite prove di antagonismo mediante confronto diretto in piastra. I funghi patogeni utilizzati nelle prove sono stati *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Botrytis cinerea* (Pers., 1794) e *Fusarium graminearum* Schwabe. Le colture fungine provenivano dalla collezione del Leibniz Institute DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Germany). I patogeni sono stati allevati su piastre Petri contenenti come substrato nutritivo PDA (Hi-Media). Le colture sono state incubate a 25 °C e trasferite ogni 2 settimane.

Per ciascun saggio è stato prelevato un dischetto di 5 mm diametro di micelio fungino da una coltura in crescita attiva di *Trichoderma* ed è stato posto su piastre (diametro 90 mm) di PDA con aggiunta di acido lattico (0,1% v/v), a 1 cm dal bordo. Dal lato opposto è stato posizionato il micelio del patogeno.

Nel caso di *Fusarium graminearum*, presentando una crescita più lenta, il patogeno è stato inoculato 2 giorni prima dell'antagonista. Per ciascun esperimento sono state utilizzate 3 repliche biologiche. I controlli sono rappresentati dalle piastre inoculate solo con il micelio del patogeno. Le piastre sono state incubate a 25 °C e giornalmente è stata valutata la crescita radiale dei due funghi per 1 settimana o comunque fino al contatto tra i due miceli. Le misure ottenute sono state utilizzate per valutare la percentuale di inibizione della crescita del patogeno utilizzando la seguente formula:

$$\text{inibizione \%} = [(R_c\text{-}R) / Rc] \times 100$$

dove R_c indica il raggio di crescita del patogeno nel controllo ed R indica, invece, il raggio di crescita del patogeno in presenza dell'antagonista.

Il raggio del micelio delle piastre controllo e quello delle co-culture, le medie di questi e la percentuale di inibizione calcolata per ogni singola piastra sono state analizzate mediante l'analisi statistica ANOVA one-way e le differenze significative tra i trattamenti sono state confrontate utilizzando test post hoc S–N-K (Student-Newman-Keuls) e Fisher's least significant difference (LSD) con livello di significatività 0,05.

2.4.5 Saggi di promozione della crescita

La capacità degli ibridi di *Trichoderma* di stimolare la crescita di piante di pomodoro è stata valutata mediante saggi analoghi a quelli descritti precedentemente (par. 2.3.2) Due mL di sospensioni di spore [1×10^7 spore/mL] dei ceppi ibridi di *Trichoderma* e dei rispettivi parentali utilizzati singolarmente o in combinazione sono stati impiegati per la concia di semi di pomodoro cv. San Marzano nano. Le piante trattate con acqua sterile sono state utilizzate come controlli negativi. Per ciascuna condizione saggiata sono state effettuate 15 repliche biologiche.

Successivamente i semi sono stati trasferiti in polistiroli alveolati contenenti terreno sterile ed allevati in camera di crescita in condizioni controllate (25 °C, 16/8 h fotoperiodo). Dopo 15 giorni, i trattamenti sono stati ripetuti mediante irrigazione del suolo (2 mL di una sospensione 10^7 spore/mL). Trascorso un mese dalla messa a dimora dei semi, sono stati misurati per ciascuna pianta il numero medio di foglie, la

lunghezza del fusto e delle radici, così come il peso fresco e il peso secco delle piante. Il contenuto in clorofilla delle foglie di pomodoro è stato determinato calcolando la media di 20 letture per campione, effettuate mediante l'utilizzo di un misuratore di clorofilla (SPAD-502Plus, Konica Minolta Sensing Europe B.V., Nieuwegein, The Netherlands) come riportato in letteratura (Yamamoto et al., 2002).

Un saggio analogo è stato condotto anche su piante di pomodoro (cv. San Marzano nano) allevato in serra a tunnel. In questo esperimento gli ibridi ottenuti dalla fusione MG (Tab. 2.1) sono stati inoculati (50 mL/pianta di una sospensione 1×10^6 spore/mL) in prossimità del colletto di piantine di circa 2 settimane. Per ogni condizione saggiata (ceppi ibridi o i rispettivi parentali, utilizzati singolarmente o in combinazione) sono state considerate 15 repliche biologiche, disposte secondo uno schema a blocchi randomizzati. Le piante trattate con acqua sterile sono state utilizzate come controlli negativi. I trattamenti sono stati ripetuti ogni 15 giorni per 3 mesi, al termine dei quali sono state valutate per ciascuna pianta: l'altezza del fusto, la lunghezza delle radici, il peso secco e il peso fresco delle piante.

I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante l'analisi statistica ANOVA one-way e le differenze significative tra i trattamenti sono state confrontate utilizzando test post hoc S–N-K (Student-Newman-Keuls) e Fisher's least significant difference (LSD) con livello di significatività 0,05.

2.5 Analisi LC-MS

Gli ibridi selezionati dalle due fusioni (Tab. 2.1) sono stati inoculati come descritto precedentemente (par. 2.1) in beute da 2L contenenti 1L di PDB (HI-MEDIA) e 0,1% (v/v) di acido lattico a temperatura ambiente ed in condizioni statiche. Dopo 1 mese, la biomassa è stata allontanata mediante filtrazione con carta da filtro (Whatman No. 4), ed il filtrato colturale risultante è stato sottoposto ad estrazione liquido-liquido utilizzando come solvente estrattivo 1L di acetato di etile. L'estratto è stato portato a secco con un rotovapor e risospeso in 1mL di metanolo per essere poi sottoposto ad analisi mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS).

L'analisi metabolomica è stata condotta con uno strumento della Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) che accoppia un HPLC (Agilent HP 1260 Infinity Series dotato di rivelatore UV a diode array-DAD) ad uno spettrometro di massa con quadrupolo a tempo di volo (Time Of Flight, Q-TOF). Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna Ascentis® Express C18 (3.0 x 50 mm, 2.7 µm; Supelco, USA). L'analisi è stata effettuata con un flusso di 0.4 mL/min e a temperatura costante di 37 °C, utilizzando un gradiente lineare composto da 0.1% (v/v) acido formico in acqua (eluente A) e 0.1% (v/v) acido formico in acetonitrile (eluente B). Il gradiente è stato modificato secondo il programma seguente: da 5% a 100% eluente B in 6 min., 100% dell'eluente B da 6 a 8 min., da 100% a 5% dell'eluente B da 8 a 10 min. Il volume di campione iniettato è stato di 7 µL. Gli spettri UV sono stati raccolti tramite il DAD ogni 0,4 s in un range compreso tra i 190 e i 750 nm con una risoluzione di 2 nm.

Il sistema MS è equipaggiato con una sorgente Dual Electrospray Ionization (ESI) operante in modalità positiva e gestito dal Software Agilent MassHunter Data Acquisition, ver. B.05.01. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in un range compreso tra 50 e 1700 *m/z*, con 3 acquisizioni al secondo. Il capillare è stato mantenuto a 4000 V, il frammentatore a 180 V, il cono 1 (skimmer 1) a 45 V. La temperatura del gas era fissata a 350 °C durante la corsa ad un flusso di 11 L/min e il nebulizzatore è stato impostato a 45 psig. Lo spettrometro di massa è stato calibrato utilizzando la soluzione mix ESI-L Low Concentration Tuning (Agilent Technologies). I solventi erano di grado LC-MS e tutti gli altri reagenti utilizzati per questa analisi erano di grado analitico (Sigma-Aldrich, Germania), se non diversamente specificato.

Per ogni trattamento sono stati analizzati tre campioni biologici e ciascuna corsa è stata ripetuta 3 volte. I dati sono stati valutati utilizzando MassHunter Qualitative Analysis Software versione B.06.00 (Agilent Technologies) e sono stati effettuati confronti con composti noti in un database creato in laboratorio combinato con i dati presenti in letteratura. Le identificazioni dei metaboliti fungini sono state prese in considerazione per l'analisi se il composto è stato rilevato con un errore di massa inferiore a 10 ppm e con un punteggio sufficiente.

2.6 Esperimenti in co-coltura su mais

In questo esperimento è stata valutata sia l'attività di biocontrollo esercitata dai ceppi selezionati di *Trichoderma*, sia il loro effetto sull'accumulo della micotossina deossinivalenolo (DON) da parte del patogeno.

2.6.1 Ceppi fungini e condizioni di co-coltura

Per questo esperimento sono stati utilizzati i seguenti ceppi di *Trichoderma* e *Fusarium*:

- *T. harzianum* ceppo A3 (ibrido derivante dalla fusione MG tra *T. harzianum* ceppo M10 e *T. virens* GV41; Tab. 2.1);
- *T. harzianum* ceppo M10 (ceppo parentale dell'ibrido A3);
- *T. harzianum* ceppo T22 (ceppo noto agente di biocontrollo e ingrediente attivo di molti biopesticidi presenti in commercio; Woo et al., 2014);
- *F. graminearum* ceppo 434, agente causale della fusariosi della spiga o Fusarium Head Blight (FHB) nei cereali a granella.

I microrganismi sono stati allevati in piastre Petri contenenti PDA (HI-MEDIA) e incubati a 25 °C per 7 giorni.

I semi di mais sono stati sterilizzati con una soluzione all'1% di ipoclorito di sodio e lavati con acqua sterile. Per ogni condizione, sono state allestite 3 repliche biologiche in beute da 1 L contenenti ciascuna 100 g di semi. Dopo aver sterilizzato le beute e il

mais, è stato effettuato l'inoculo con 5 dischetti (0,5 mm di diametro) di micelio del ceppo di *Trichoderma* e 5 di *F. graminearum*. Le condizioni di co-cultura ottenute sono riportate in Tabella 2.3. Le beute inoculate sono state incubate a temperatura ambiente (25 °C) per 30 giorni.

Tabella 2.3. Elenco delle condizioni di co-coltura utilizzate nel saggio di competizione su mais. (T): *Trichoderma*; (P): *F. graminearum*; CTRL: controllo contenente solo *F. graminearum*.

Co-coltura		
	Ceppo T	**Ceppo P**
1	*T. harzianum* M10	*F. graminearum* 434
2	*T. harzianum* T22	*F. graminearum* 434
3	*Trichoderma* A3	*F. graminearum* 434
4	CTRL	*F. graminearum* 434

Al termine dell'incubazione è stata effettuata la conta delle spore prelevando 10 g di campione da ciascuna beuta. I campioni sono stati lavati con 2 mL di acqua sterile, messi in agitazione per 5 minuti e filtrati asetticamente ottenendo così la soluzione contenente le spore fungine. La concentrazione di spore per ciascuno dei due funghi è stata determinata con l'utilizzo di un vetrino contaglobuli.

2.6.2 Estrazione del deossinivalenolo da mais

Campioni di mais (10 g) prelevati da ciascuna co-coltura di *Trichoderma* e *Fusarium* (par. 2.6.1) sono stati frullati con un macinino (Imetec) fino ad ottenere una polvere fine. Ogni campione è stato trasferito in una beuta da 1L ed è stata effettuata l'estrazione della micotossina utilizzando una soluzione all'84% (p/v) di metanolo (Sigma-Aldrich) per un volume finale di 225 mL, seguendo il protocollo descritto da Zhao et al. (2014). Le beute sono state incubate a temperatura ambiente su un agitatore rotante (Stuart, UK) a 100 rpm per una notte. Il giorno seguente, ciascun campione è stato trasferito in tubi da 50 mL e centrifugato a 5000 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato prelevato ed utilizzato per le successive analisi.

2.6.3 Analisi GC-MS

L'analisi qualitativa e quantitativa del DON dai campioni estratti è stata effettuata mediante gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). I campioni, prima di essere analizzati, sono stati derivatizzati secondo il protocollo descritto da Ferreira et al. (2012) e di seguito riportato brevemente.

Fase 1: preparazione dei campioni

Sono stati prelevati 15mL di estratto e posti in un tubo da 50 mL in cui sono stati aggiunti 10 mL di acetonitrile (Merck, DE), 4 g $MgSO_4$ (Sigma-Aldrich) e 1 g di NaCl (Sigma-Aldrich). Il campione è stato agitato a mano per 2 minuti, centrifugato ad una velocità di 4500 rpm per 5 minuti ed infine è stato prelevato il surnatante.

Fase 2: clean up

Un’aliquota di 9 mL di surnatante è stata miscelata con 1,35 g di $MgSO_4$ e 0,45 g di PSA (Primary - Secondary Amine) e poi centrifugata ad una velocità di 2000 rpm per 1 min. È stata prelevata un’aliquota di 2 mL di surnatante, trasferita in una vial ambrata da 4 mL e portata a secco con azoto gassoso.

Fase 3: derivatizzazione

All’estratto secco sono stati aggiunti 50 µL di miscela di salinizzazione contenente BSA [N,O-Bis (trimethylsilyl) acetamide] + TMCS (Chlorotrimethylsilane) + TMS [esametildisilossano (HMDS) + TMCS] (3:2:3) e miscelato sul vortex per 30 secondi. Per favorire la reazione la miscela è stata riscaldata a 80 °C per 30 minuti. A questo punto la miscela è stata lasciata raffreddare e successivamente sono stati aggiunti 150 µL di n-esano, per estrarre il composto derivatizzato, e 400 µL di tampone fosfato 0.1M pH 4.2, per lavare via eventuali residui di miscela di salinizzazione. La soluzione così ottenuta è stata miscelata su vortex per 30 secondi per favorire la separazione dei vari componenti. A questo punto il composto derivatizzato, presente in superficie, è stato prelevato e iniettato al GC-MS.

È stata preparata una curva di calibrazione utilizzando uno standard commerciale di DON (Sigma-Aldrich), diluito con acetonitrile a partite da una soluzione di 1 µg/mL. Le diluizioni analizzate e le corrispondenti concentrazioni di DON per grammo di campione sono state:

1. *2000 ng/mL* → *1667 ng/g*
2. *1000 ng/mL* → *832 ng/g*
3. *500 ng/mL* → *416 ng/g*
4. *250 ng/mL* → *208 ng/g*
5. *125 ng/mL* → *104 ng/g*

Per le analisi è stato utilizzato gas cromatografo Agilent 7890A e uno spettrometro di massa Agilent 5975C (entrambi Agilent Technologies) dotato di una porta di iniezione split / splitless controllata elettronicamente e di un rivelatore selettivo di massa inerte 5975C con camera di ionizzazione a impatto elettronico (EI). La separazione gascromatografica è stata condotta con una colonna analitica DB-5 MS (film di spessore di 30 m - 0,25 mm - 0,25 mm; J&W Scientific, Folsom, CA, EUA). L'iniezione è stata effettuata in modalità splitless (60 s) a 280 °C. La temperatura del forno è stata settata secondo il seguente programma: 140 °C per 0,5 min, aumentato a 300 °C a 20 °C / min e mantenuto per 7,5 min. Il tempo di esecuzione totale è stato di 16 min. La temperatura della linea di trasferimento MS è stata mantenuta a 280 °C. I parametri dello spettrometro di massa sono stati impostati come segue: ionizzazione a impatto elettronico con energia di 70 eV; temperatura della sorgente ionica, 230 °C; temperatura del quadrupolo MS, 150 °C e termine del solvente 4,5 min. Il sistema MS è stato impostato in modalità di monitoraggio selettivo degli ioni (SIM) e la micotossina è stata quantificata in base all'area di picco utilizzando uno o

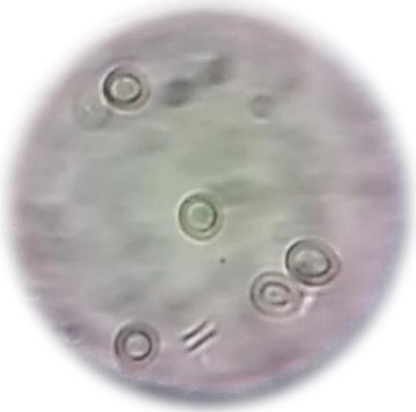
due ioni qualificatori. I parametri SIM (single ion monitoring) utilizzati sono stati: 235, 103, 295, 422, 512 *m/z*. Per la raccolta ed elaborazione dei dati e controllo del GC-MS è stata utilizzata la Chemstation Agilent.

3. RISULTATI

3.1 Ottenimento e fusione di protoplasti

Come dimostrato in un precedente lavoro (Manganiello, 2018), l'impiego dell'enzima fungino Novozyme su giovani propaguli ha consentito l'ottenimento di una completa digestione del micelio fungino dei ceppi di *Trichoderma* selezionati per la fusione. L'andamento delle reazioni enzimatiche è stato monitorato ogni 20 minuti al microscopio ottico. La digestione è stata considerata terminata quando circa il 95% delle cellule risultava priva di parete cellulare (Fig. 3.1). I tempi di completa digestione della parete cellulare fungina sono stati tuttavia molto variabili; infatti, i due ceppi T22 ed M10 di *T. harzianum* hanno impiegato circa 3,5 ore, mentre più lenta è stata la digestione delle pareti cellulari di *T. virens* ceppo GV41 e *T. asperellum* ceppo KV906 (5 e 4 ore, rispettivamente).

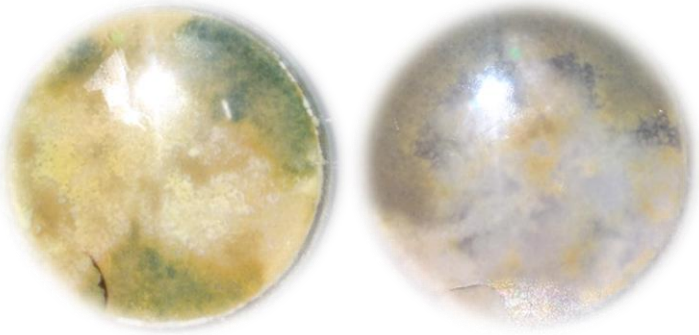
Figura 3.1. Immagine al microscopio ottico di cellule fungine durante la fase di digestione enzimatica della parete cellulare.



Una volta ottenuti i protoplasti, è stata effettuata la fusione tra i ceppi come indicato nel paragrafo 2.2. Le soluzioni stabilizzate risultanti dai processi di fusione (Tab. 2.1) sono state inoculate su piastre Petri contenenti un terreno nutritivo specifico per la rigenerazione della parete cellulare (PRM) e incubate a temperatura ambiente.

Dopo circa 3 giorni il micelio fungino cresciuto è apparso di colore giallo-verde chiaro per la fusione MG tra *T. harzianum* ceppo M10 e *T. virens* ceppo GV41, mentre di colore bianco-giallo e grigio per la fusione TK tra *T. harzianum* ceppo T22 per *T. asperellum* ceppo KV906 (Fig. 3.2). È interessante notare che queste colorazioni non sono state riscontrate nel micelio dei rispettivi ceppi parentali. A maturazione completa, le spore di ciascuna miscela di fusione sono state raccolte e sottoposte a diverse fasi di selezione guidate dal fenotipo, ovvero basate sull'effetto macroscopico che le cellule rigenerate hanno mostrato rispetto sia ai controlli non trattati, sia ai rispettivi parentali.

Figura 3.2. Piastre di Petri contenenti un terreno nutritivo specifico per la rigenerazione della parete cellulare (PRM) e inoculate con le miscele di fusione prodotte mediante fusione di protoplasti. (A) Fusione MG tra *T. harzianum* ceppo M10 e *T. virens* ceppo GV41; (B) Fusione TK tra *T. harzianum* ceppo T22 e *T. asperellum* ceppo KV906.



A **B**

3.2 Selezione e isolamento degli ibridi

La selezione degli ibridi presenti nelle miscele di fusione è stata realizzata mediante valutazione diretta del loro effetto su piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum* cv. San Marzano nano) in termini di attività di biocontrollo e promozione della crescita. Nello specifico le colonie potenzialmente ibride sono state selezionate dalla rizosfera delle piante trattate che hanno mostrato minore attacco da parte di un microrganismo patogeno o un maggiore sviluppo rispetto a quelle inoculate con i singoli parentali o al controllo (piante trattate con acqua).

3.2.1 Attività di biocontrollo delle miscele di fusione

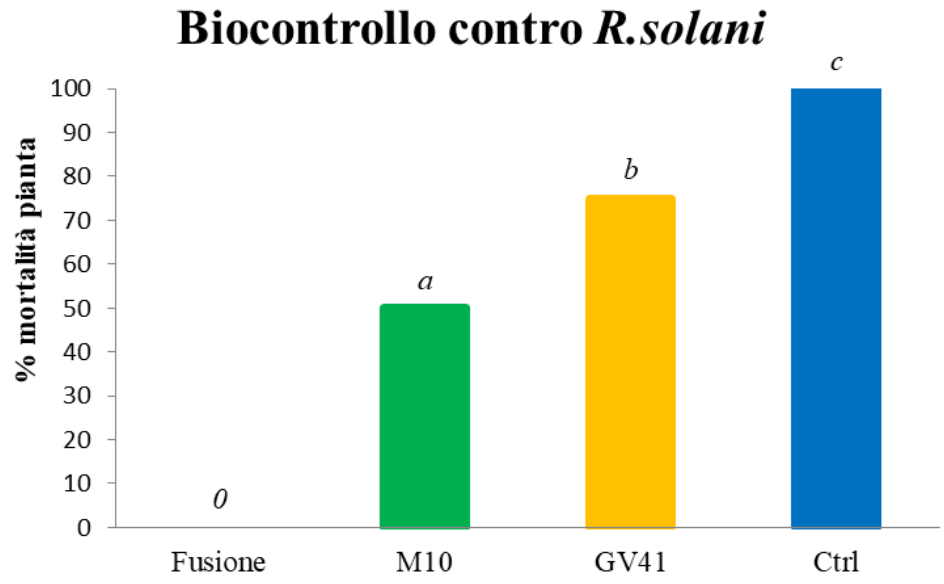
Le piante di pomodoro utilizzate per il saggio di biocontrollo sono state trapiantate su terreno infetto dal patogeno terricolo *R. solani* e quindi inoculate con la miscela di fusione ottenuta dalla fusione MG (Tab. 2.1). Dopo 5 giorni dall'inoculo delle spore derivanti dalla fusione di protoplasti, nelle piante trattate è stata valutata la comparsa dei sintomi della malattia, ovvero il marciume del colletto. I risultati ottenuti hanno mostrato che l'80% delle piante trattate con la fusione non ha mostrato sintomi di marciume del colletto, rispetto ai controlli trattati con sola acqua (Fig. 3.3).

Figura 3.3. Piante di pomodoro cv. S. Marzano nano trapiantate in terreno infetto dal patogeno terricolo *Rhizoctonia solani* e inoculate con acqua (A) o con la miscela di fusione MG (B). Nel riquadro in A) è evidenziato il tipico sintomo del marciume al colletto.

A **B**

Come mostrato nella Figura 3.4 solo la miscela di fusione MG e il parentale *T. harzianum* ceppo M10, hanno mostrato una significativa riduzione della mortalità delle piante infette dal patogeno *R. solani*. Infatti, la mortalità è risultata pari a zero nelle piante trattate con la miscela di fusione, mentre si è dimezzata a seguito del trattamento con il parentale M10 rispetto ai controlli, laddove con il parentale GV41 la mortalità raggiungeva il 75% (Fig. 3.4).

Figura 3.4. Percentuale di mortalità di piante di pomodoro cv. S. Marzano nano allevate in terreno infetto dal patogeno terricolo *Rhizoctonia solani* e inoculate con spore dei ceppi di *Trichoderma* ottenuti mediante fusione di protoplasti. Fusione: spore ottenute dalla miscela di fusione di protoplasti tra i ceppi parentali M10 di *T. harzianum* e GV41 di *T. virens*). M10, GV41: ceppi parentali. Ctrl: piante controllo trattate con sola acqua.



Dal suolo rizosferico delle piante inoculate con la miscela di fusione che non hanno mostrato sintomi della malattia si è proceduto con l'isolamento delle singole colonie ibride come descritto nel par. 2.3.3.

3.2.2 Attività di promozione della crescita delle miscele di fusione

Le miscele di fusione TK e MG sono state analizzate mediante saggi che miravano a valutarne l'attività di promozione della crescita in piante di pomodoro. I trattamenti sono stati eseguiti prima al seme e quindi ripetuti mediante irrigazione del suolo. Dopo un mese dall'inizio del saggio, sono state osservate evidenti differenze della lunghezza del fusto e delle radici delle piante trattate con le miscele di fusione, rispetto ai rispettivi parentali o al controllo (piante trattate con sola acqua).

I risultati ottenuti hanno mostrato come le piante trattate con la miscela di fusione TK avessero una fitness migliore in termini di lunghezza sia del fusto che delle radici rispetto a quelle trattate con i ceppi parentali e al controllo con acqua (Fig. 3.5). Infatti, le piantine di pomodoro inoculate con le spore ottenute dalla fusione TK hanno mostrato un incremento nella lunghezza del fusto di circa il 60% in più rispetto a quelle trattate con i ceppi parentali di *Trichoderma* o al controllo (Fig. 3.5A). Per quanto riguarda la lunghezza delle radici, si è osservato un aumento dell'80% della lunghezza delle radici rispetto al parentale T22 e di circa il 50% rispetto al parentale KV906 (Fig. 3.5B).

Nel caso della miscela di fusione MG è stato osservato un incremento significativo rispetto ai ceppi parentali o al controllo solo nel caso della lunghezza della radice (Fig. 3.5 D). Le piantine di pomodoro inoculate con la miscela di fusione MG risultano avere un incremento in percentuale di lunghezza delle radici compreso tra il 50 e il 61% rispetto a quelle trattate con i ceppi parentali e l'acqua. Per quanto riguarda la lunghezza del fusto, l'incremento nelle piante trattate con la miscela di

fusione MG è risultato significativo solo rispetto al controllo o al trattamento con il parentale M10 (Fig. 3.5 C).

Dal suolo rizosferico delle piante inoculate con la miscela di fusione e che hanno evidenziato un incremento della crescita delle piante rispetto ai parentali o ai controlli si è proceduto con l'isolamento delle singole colonie ibride come descritto nel par. 2.3.3.

Figura 3.5. Attività di promozione della crescita delle miscele di fusione dei protoplasti su piante di pomodoro. Lunghezza del fusto (A) e delle radici (B) di piante trattate con la miscela di fusione TK. Lunghezza del fusto (C) e delle radici (D) di piante trattate con la miscela di fusione MG. Per ciascun evento di fusione sono stati valutati anche gli effetti dei ceppi parentali (T22 e KV906 per la miscela TK, M10 e GV41 per la miscela MG) e dei controlli trattati con sola acqua (H_2O).

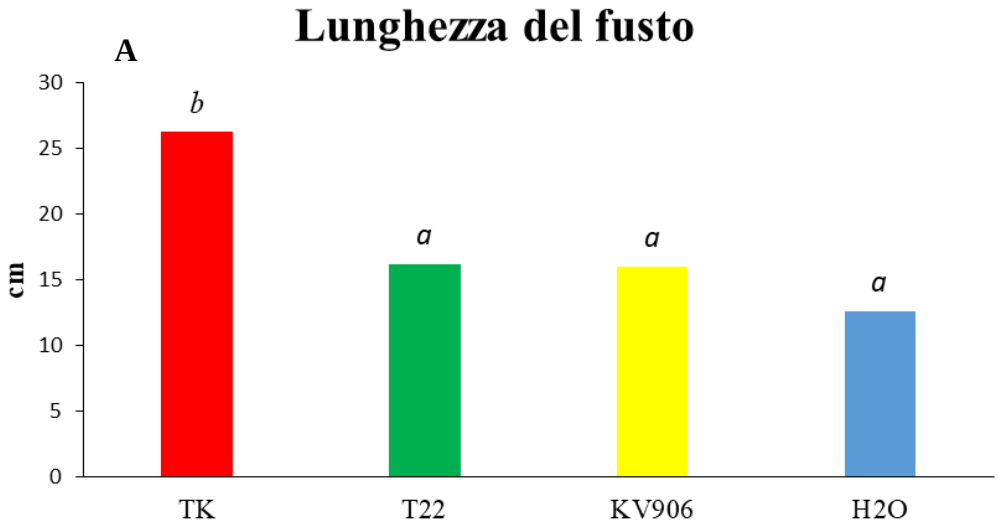
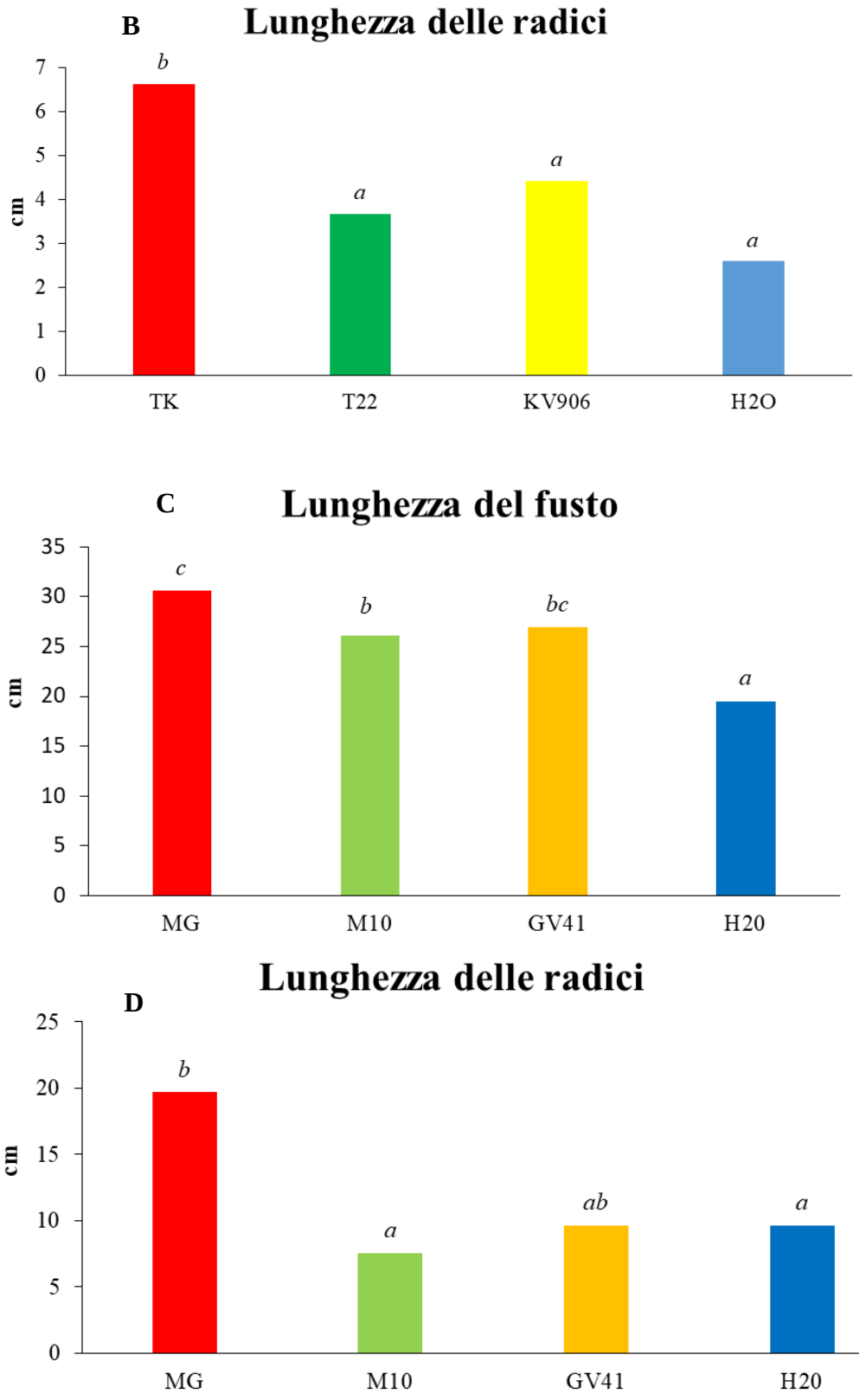


Figura 3.5. *Continuo*



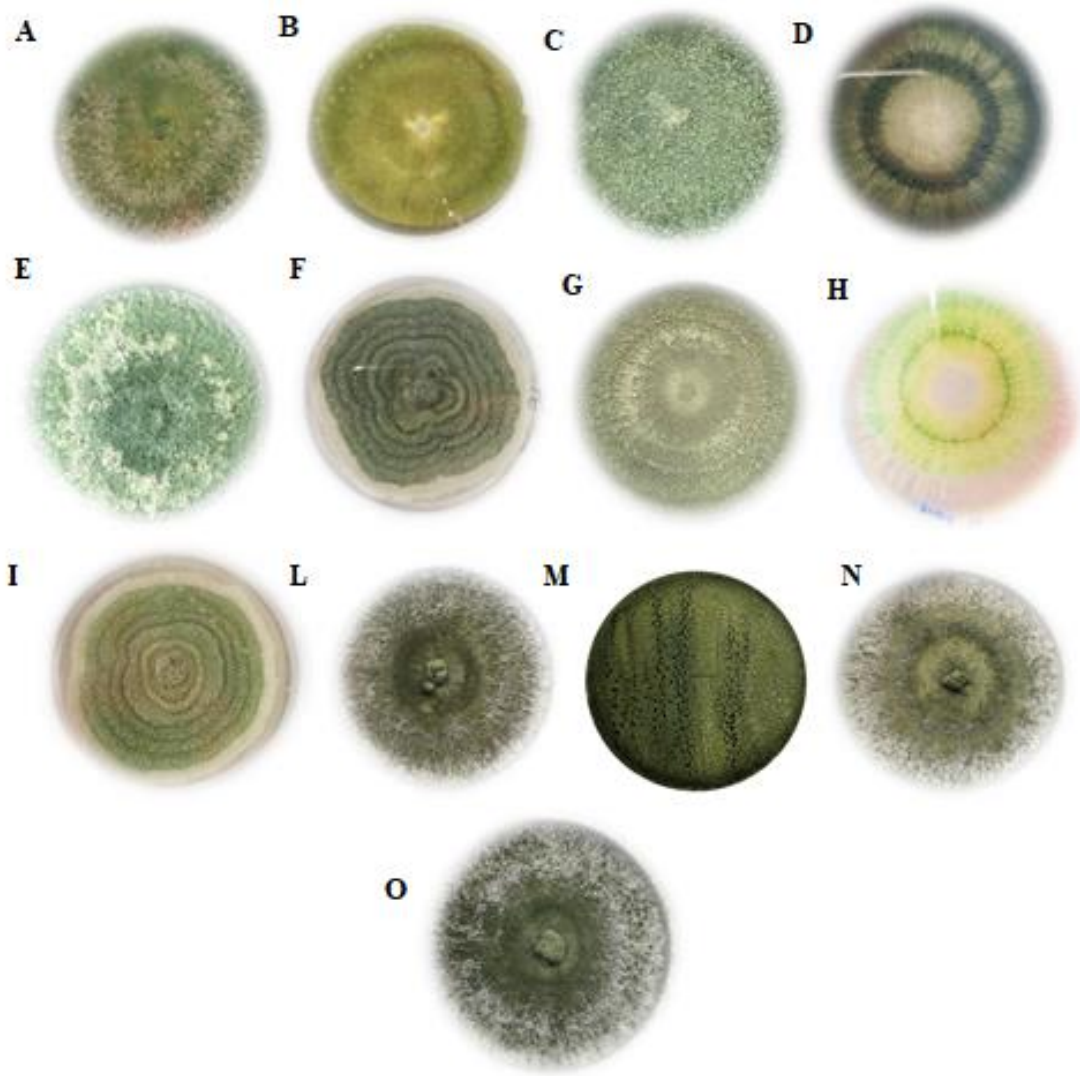
3.2.3 Isolamento degli ibridi

Dal suolo rizosferico delle piante di pomodoro trattate con le miscele di fusione (par 3.2.1 e 3.2.2) che hanno mostrato una fitness migliore rispetto ai parentali e al controllo sono state isolate 140 colture monosporiche, di cui 80 dalla miscela di fusione MG e 60 da TK. Di queste, 13 sono state selezionate quali potenziali nuovi ibridi, in quanto presentavano caratteristiche morfologiche nettamente distinte rispetto ai parentali (Fig. 3.6).

Nell'ambito delle colonie selezionate, 2 derivano dal suolo rizosferico delle piante inoculate con la miscela di fusione MG e che non hanno mostrato sintomi della malattia (denominate A3 e A5) e 11 derivano dal suolo rizosferico delle piante inoculate con le miscele di fusione MG e TK e che hanno evidenziato un incremento della crescita delle piante rispetto ai parentali o ai controlli (quelle derivate dalla fusione MG sono state denominate B1, B2, B3, B4, B5, B6; quelle derivate dalla fusione TK sono state denominate C1, C2, C3, C4, C5).

Questi individui sono stati quindi oggetto di ulteriori analisi volte alla loro caratterizzazione morfologica, biochimica e genetica.

Figura 3.6. Ibridi di *Trichoderma* selezionati da suolo rizosferico di piante di pomodoro inoculate con le miscele di fusione di protoplasti (A) B2, (B) B4, (C) B5, (D) C1, (E) C3, (F) B6, (G) B1, (H) B3, (I) A5, (L) C2, (M) A3, (N) C4, (O) C5. Colture inoculate su piastre contenenti PDA con aggiunta di acido lattico (0,1% v/v) e allevate a 25 °C.



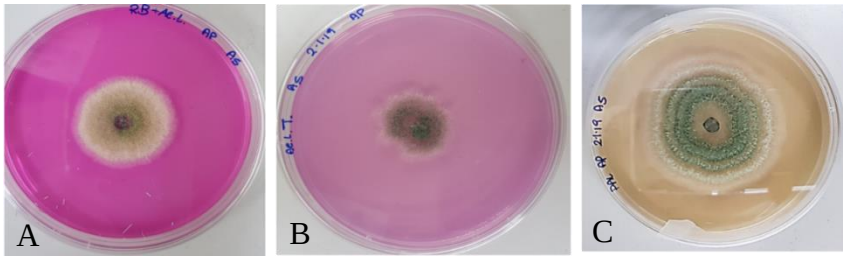
3.3 Caratterizzazione degli ibridi selezionati

3.3.1 Caratterizzazione morfologica

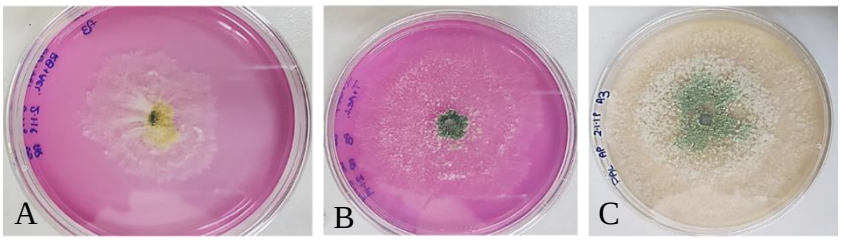
La morfologia delle colonie dei nuovi ibridi è stata messa a confronto con quella dei ceppi parentali, tenendo presente le caratteristiche (angolo delle ramificazioni ifali, distribuzione e forma dei fialidi e caratteri dei conidi) riportate in appropriate chiavi tassonomiche (Rifai, 1969; Samuels et al., 2002). Per ciascun ibrido sono state osservate le strutture caratteristiche del genere *Trichoderma*, come ad esempio rami conidiofori, clamidospore, conidi, ramificazioni ifali, etc... Non sono state osservate particolari differenze delle colture ibride rispetto ai parentali per quanto riguarda le strutture esaminate; ciononostante evidenti differenze sono emerse in termini di velocità di crescita su diversi substrati nutritivi e nell'aspetto macroscopico del micelio ivi allevato (Fig.3.7).

Figura 3.7. Ibridi di *Trichoderma* allevati su Rose Bengal + cloramfenicolo (A), TSAB (*Trichoderma harzianum* selective agar base; B) e PDA (C). In alto sono riportate le piastre inoculate con l'ibrido A5 ed in basso quelle inoculate con l'ibrido A3 (entrambi ottenuti dalla fusione di protoplasti MG).

Ibrido A5 (Fusione MG)



Ibrido A3 (Fusione MG)



Nel caso degli ibridi ottenuti dalla fusione TK, non sono state evidenziate delle grandi differenze morfologiche infatti gli ibridi risultano essere simili al parentale *T. asperellum* ceppo KV906. Per quanto riguarda invece i tempi di crescita su PDA e acido lattico (0,1% v/v) a 25° gradi, non sono emerse evidenti differenze rispetto ai parentali; questo probabilmente è dovuto al fatto che già la crescita del micelio dei parentali (ceppi T22 e KV906) risulta più lenta rispetto a quella di altri ceppi appartenenti al genere *Trichoderma*.

3.3.2 Caratterizzazione molecolare

Sulla base delle differenze morfologiche osservate sono state selezionate 13 colonie ibride che sono state utilizzate per le successive indagini. Di queste, 8 provenivano dalla fusione MG e 5 dalla fusione TK (Tab. 2.1). In Tabella 3.1 sono riportati i risultati ottenuti dalla caratterizzazione molecolare delle colonie selezionate, effettuata mediante il sequenziamento delle regioni ITS1 e 2. Dai sequenziamenti effettuati è emerso che per la fusione TK sono state individuate come potenzialmente differenziali alcune colonie che risultano filogeneticamente più affini al parentale *T. asperellum* KV906, mentre nel caso della fusione MG la maggior parte degli ibridi presentano maggiore omologia con la specie *harzianum* (Tab.3.1).

Tabella 3.1. Caratterizzazione molecolare delle colonie ibride selezionate, effettuata mediante il sequenziamento delle regioni ITS1 e ITS2. Per ciascun individuo sono riportati la specie individuata e i ceppi parentali utilizzati per la fusione di protoplasti.

Denominazione ibrido	Specie	Parentali
A5	*virens*	*T. harzianum M10 - T. virens GV41*
A3	*harzianum*	*T. harzianum M10 - T. virens GV41*
B1	*harzianum*	*T. harzianum M10 - T. virens GV41*
B2	*harzianum*	*T. harzianum M10 - T. virens GV41*
B3	*virens*	*T. harzianum M10 - T. virens GV41*
B4	*harzianum*	*T. harzianum M10 - T. virens GV41*
B5	*harzianum*	*T. harzianum M10 - T. virens GV41*
B6	*virens*	*T. harzianum M10 - T. virens GV41*
C1	*asperellum*	*T. harzianum T22 - T. asperellum KV906*
C2	*asperellum*	*T. harzianum T22 - T. asperellum KV906*
C3	*asperellum*	*T. harzianum T22 - T. asperellum KV906*
C4	*asperellum*	*T. harzianum T22 - T. asperellum KV906*
C5	*harzianum*	*T. harzianum T22 - T. asperellum KV906*

Il DNA estratto dagli ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalle due fusioni di protoplasti è stato utilizzato per eseguire delle analisi RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). In questo modo è stato possibile analizzare e confrontare il corredo genetico dei ceppi di *Trichoderma* parentali (*T. harzianum* ceppo M10 e *T. virens* ceppo GV41 per la fusione MG), con quello degli ibridi A3 e A5 (selezionati dai saggi di biocontrollo; par. 3.2.1) e B4, B5 (selezionati dai saggi di promozione della crescita in pianta; par. 3.2.2). Dei primers utilizzati (Tab. 2.2), solo 8 appartenenti alla serie OPA hanno amplificato regioni sul genoma dei funghi presi in esame (Tab 3.2).

Tabella 3.2. Elenco dei primers utilizzati nelle analisi RAPD che hanno amplificato regioni del genoma dei ceppi di *Trichoderma* utilizzati per l'analisi. M10, GV41: ceppi parentali. A3, A5, B4, B5: ibridi selezionati dalla fusione di protoplasti MG.

Primers	**Ceppo *Trichoderma***
OPA-7	A3
OPA-10	M10, B4, B5, A5
OPA-12	GV41, M10, B4, B5, A5
OPA-14	A3
OPA-15	A5
OPA-16	Tutti i ceppi
OPA-18	GV41, B4, B5, A5

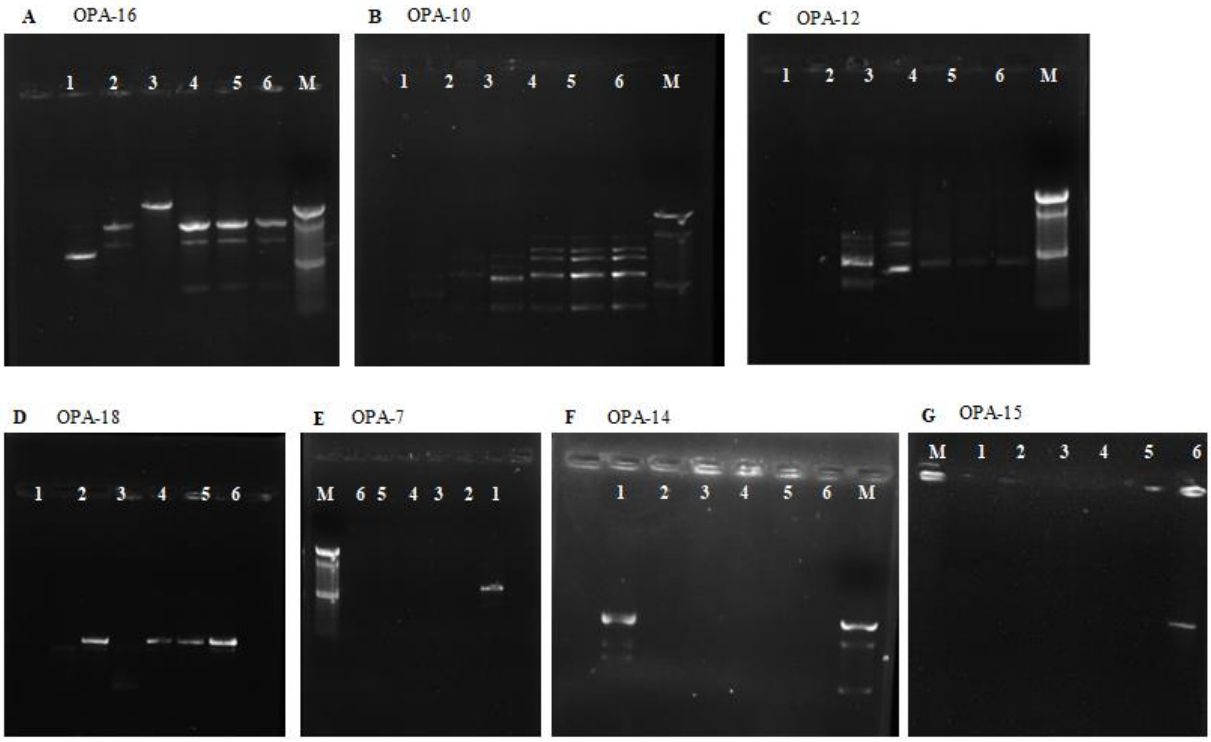
I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare delle differenze genetiche tra gli ibridi isolati nei vari saggi e i ceppi parentali utilizzati negli eventi di fusione protoplastica. Tutti questi primers hanno consentito sia di creare un profilo di bande polimorfiche per i diversi campioni analizzati, sia di riuscire a discriminare alcuni ibridi rispetto ad altri e rispetto ai parentali.

Un chiaro esempio è visibile nella Figura 3.8 in cui il gel elettoforetico A mostra come il primer OPA-16 abbia prodotto ampliconi di grandezze differenti in tutti i campioni. In particolare, è emerso che la PCR-RAPD degli ibridi B4, B5 e A5 (rispettivamente lane 4-5-6, Fig. 3.8 A) ha dato origine ad un profilo genetico molto simile, mentre per A3, GV41 e M10 (rispettivamente lane 1, 2, 3, Fig. 3.8 A) ha prodotto un profilo di bande che differiscono sia tra questi tre campioni che rispetto agli altri ibridi.

Questo risultato evidenzia una prima differenza genetica presente tra gli ibridi e i parentali da cui sono stati ottenuti. Analogamente, utilizzando i primer OPA-10 e OPA-12 (Fig. 3.8 B,C, rispettivamente) dall'analisi sono emersi profili genetici differenti tra i vari isolati. I campioni estratti dalle colonie di GV41, M10, B4, B5 e A5 (lane 2, 3, 4, 5, 6, Fig. 3.8 B, C) hanno mostrato un profilo di bande simile, mentre differente è il risultato dell'amplificazione ottenuta sul genoma dell'ibrido A3 (lane 1, Fig. 3.8 B, C). Il primer OPA-18 (Fig. 3.8D) ha permesso di discriminare l'ibrido A3 e il parentale *T. harzianum* M10 dagli altri ceppi di *Trichoderma* impiegati nell'analisi. Gli altri primers utilizzati, invece, sono stati discriminanti per i singoli ibridi, come nel caso dei primers OPA-7 (Fig. 3.8 E) e OPA-14 (Fig. 3.8 F) selettivi per A3 (lane 1), e OPA-15 (Fig. 3.8G) per A5 (lane 6).

La stessa tecnica è stata utilizzata anche per confrontare il corredo genetico degli ibridi ottenuti dalla fusione *T. harzianum* ceppo T22 e *T. asperellum* ceppo KV906 ma in questo caso, nessuno dei primers utilizzati ha amplificato sul genoma degli ibridi né su quello dei parentali.

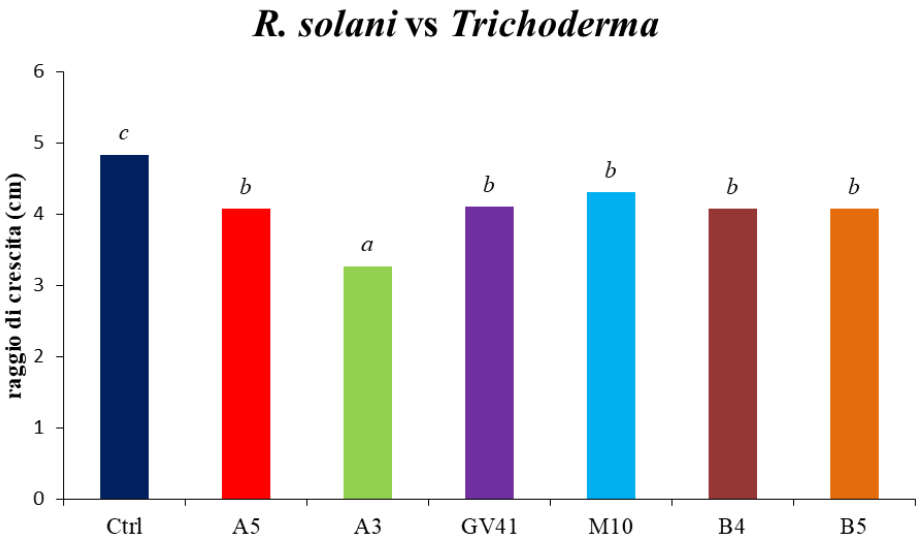
Figura 3.8. Visualizzazione su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti dall'analisi RAPD su DNA estratto dai ceppi di *Trichoderma* presi in esame. (M) marcatore di peso molecolare, (1) A3, (2) GV41, (3) M10, (4) B4, (5) B5, (6) A5.



3.4 Attività di antagonismo

La capacità antagonista degli ibridi di *Trichoderma* A3, A5, B4 e B5 ottenuti mediante fusione di protoplasti è stata valutata mediante saggi di competizione *in vitro* nei confronti dei patogeni *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* e *Botrytis cinerea*. Come mostra il grafico in Figura 3.9, dopo 3 giorni di incubazione la crescita del patogeno *R. solani* è risultata inibita dalla presenza dei vari ceppi di *Trichoderma* (ibridi e parentali) rispetto alla condizione di controllo (patogeno allevato da solo). Lo stesso andamento è stato riscontrato anche dopo 4 giorni di incubazione (Fig. 3.9). Successivamente si è osservato che nel caso delle piastre inoculate con gli ibridi A5, B4 e B5 era evidente un alone di inibizione formato dai miceli dei ceppi di *Trichoderma* nei confronti del patogeno. Nel caso dell'ibrido A3, invece, non si è formato un alone di inibizione, bensì l'antagonista è riuscito a parassitizzare il patogeno crescendo sopra di esso (dati non mostrati).

Figura 3.9. Saggio di antibiosi in piastra tra i ceppi di *Trichoderma* e il patogeno *R. solani*. I dati si riferiscono al raggio di crescita del patogeno (espresso in cm) misurato 4 giorni di incubazione in assenza (Ctrl, controllo negativo) o in presenza di *Trichoderma*. A3, A5, B4, B5: ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalla fusione di protoplasti MG. M10, GV41: ceppi di *Trichoderma* parentali utilizzati per la fusione di protoplasti MG. Lettere differenti per ciascun giorno di incubazione indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0,05$).



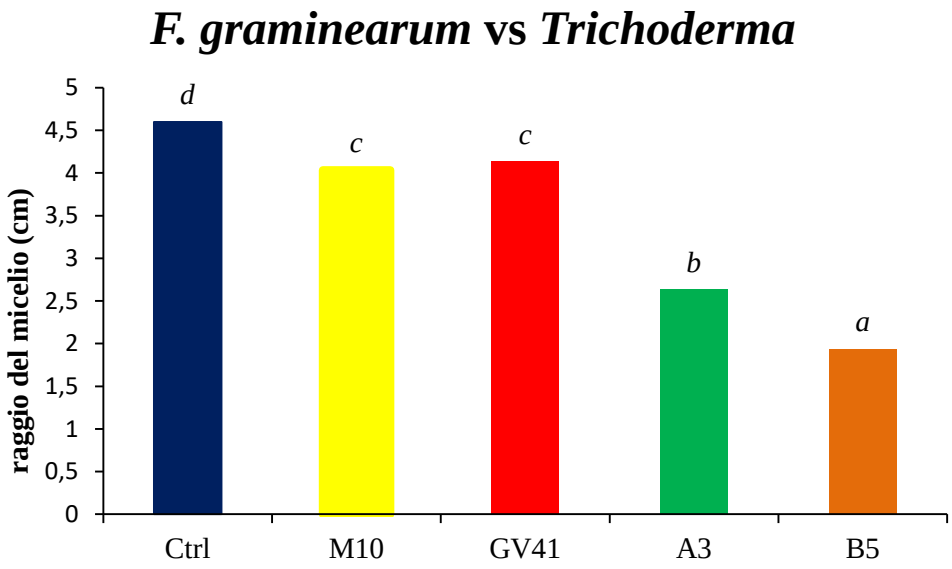
L’analisi statistica ha rivelato come l’attività antagonista dell’ibrido A3 nei confronti di *Rhizoctonia solani* sia molto più pronunciata rispetto sia ai parentali che agli altri ceppi, raggiungendo il 38% e 32% di inibizione dopo, rispettivamente 3 (dati non mostrati) e 4 giorni di incubazione (Fig. 3.9).

Al contrario, gli altri ibridi selezionati raggiungono appena il 16% di inibizione dopo 4 giorni di incubazione, mentre più basse, ma non significative, risultano le percentuali di inibizione ottenute con i ceppi parentali (Fig. 3.9).

Il saggio *in vitro* allestito per valutare l’attività di biocontrollo dei ceppi parentali M10 di *T. harzianum* e GV41 di *T. virens,* e dei due ibridi A3 e B5 (derivanti dalla fusione MG) nei confronti del patogeno *Fusarium graminearum* ha mostrato una significativa inibizione della crescita del patogeno rispetto al controllo (Fig. 3.10). Inoltre, è stata osservata un’attività antagonistica migliorata da parte dei due ibridi rispetto ai due parentali. Infatti, dopo 4 giorni dall’inoculo dell’antagonista gli ibridi A3 e B5 hanno inibito la crescita del patogeno rispettivamente del 43% e 58% rispetto al controllo (patogeno allevato da solo), mentre i ceppi parentali hanno raggiunto valori inferiori (10% per GV41 e 12% per M10, rispettivamente; Fig. 3.10).

E’ interessante notare che tra i due ibridi, quello denominato B5 ha mostrato un’attività di biocontrollo nei confronti del patogeno nettamente superiore, nonostante fosse stato precedentemente selezionato per le sue capacità di promozione della creescita in pianta (par. 3.2.3). Quest’attività risulta particolarmente evidente dopo 3 giorni dall’inoculo dell’antagonista.

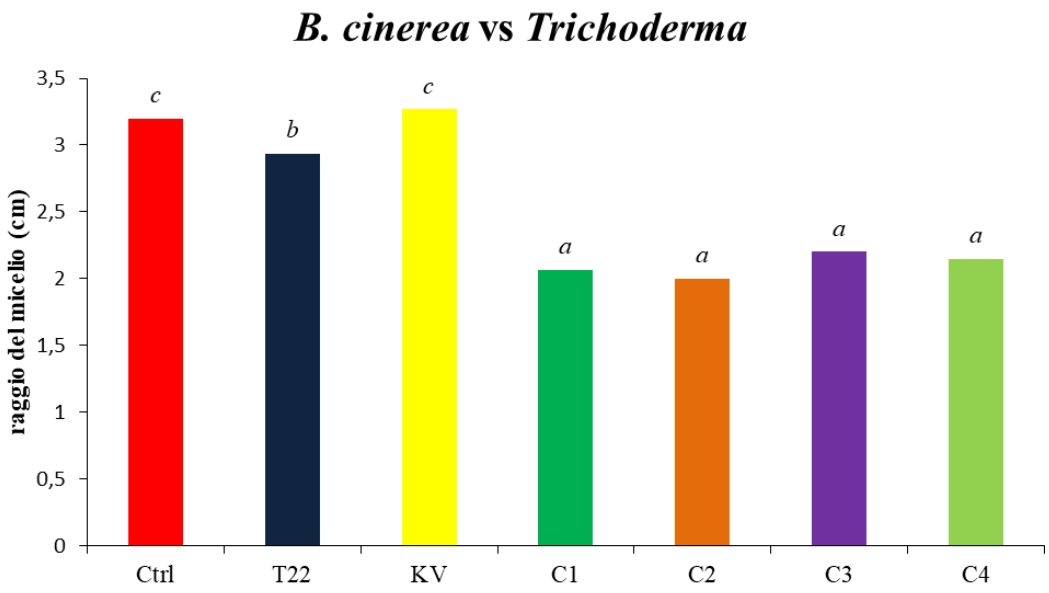
Figura 3.10. Saggio di antibiosi in piastra tra i ceppi di *Trichoderma* e il patogeno *F. graminearum*. I dati si riferiscono al raggio di crescita del patogeno (espresso in cm) misurato 4 giorni di incubazione in assenza (Ctrl, controllo negativo) o in presenza di *Trichoderma*. A3, B5: ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalla fusione di protoplasti MG. M10, GV41: ceppi di *Trichoderma* parentali utilizzati per la fusione di protoplasti MG. Lettere differenti per ciascun giorno di incubazione indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0,05$).



Gli ibridi C1, C2, C3 e C4 derivanti dal processo di fusione TK tra *T. harzianum* ceppo T22 e *T. asperellum* ceppo KV906 sono stati impiegati per un saggio di biocontrollo *in vitro* contro il patogeno fogliare *Botrytis cinerea*. Anche in questo saggio, i ceppi di *Trichoderma* si sono dimostrati in grado di inibire la crescita del patogeno rispetto al controllo (patogeno allevato da solo). Differenze significative tra i ceppi sono state osservate a partire dal 4° giorno di incubazione, quando gli ibridi hanno fatto registrare un'inibizione della crescita del patogeno > 30% rispetto al controllo, mentre l'attività antagonista dei ceppi parentali risultava inferiore o addirittura non significativa (Fig. 3.11). La maggiore attività di biocontrollo è stata

osservata negli ibridi C1 e C2 (43% e 37% di inibizione dopo, rispettivamente 3 e 4 giorni di incubazione).

Figura 3.11. Saggio di antibiosi in piastra tra i ceppi di *Trichoderma* e il patogeno *Botrytis cinerea*. I dati si riferiscono al raggio di crescita del patogeno (espresso in cm) misurato 4 giorni di incubazione in assenza (Ctrl, controllo negativo) o in presenza di *Trichoderma*. C1, C2, C3, C4: ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalla fusione di protoplasti TK. T22, KV906: ceppi di *Trichoderma* parentali utilizzati per la fusione di protoplasti TK. Lettere differenti per ciascun giorno di incubazione indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0,05$).



3.5 Attività di plant growth promotion

Gli ibridi isolati dalla rizosfera delle piante trattate con le miscele di fusione di protoplasti che hanno mostrato una fitness migliore rispetto a quelle trattate con i controlli sono stati confrontati con i rispettivi ceppi parentali per quanto riguarda la capacità di promuovere la crescita in piante di pomodoro. In un primo esperimento i trattamenti sono stati realizzati in camera di crescita mediante applicazione di sospensioni di spore al seme e successivamente al terreno in corrispondenza del colletto delle piante. Al termine dell'esperimento sono stati monitorati una serie di indici biometrici e biochimici. Tra questi lo SPAD, indicatore del contenuto di clorofilla delle foglie, ha evidenziato un aumento del contenuto di questo pigmento nelle piante inoculate con gli ibridi di *Trichoderma* rispetto alle piante trattate con parentali o con sola acqua.

Nel caso degli ibridi ottenuti dalla fusione MG (Tab. 2.1), tutti i ceppi saggiati hanno determinato un incremento del contenuto di clorofilla rispetto al controllo negativo (piante trattate con acqua) e ai ceppi parentali M10 e GV41, sia applicati singolarmente che in combinazione (Fig. 3.12 A). Gli incrementi maggiori sono stati osservati a seguito dell'applicazione degli ibridi B4, B5, B6 e B1.

L'applicazione dei ceppi ibridi ha anche fatto registrare un incremento del numero medio di foglie per pianta: l'ibrido B5 ha incrementato almeno del 50% il numero di foglie rispetto ai ceppi parentali, ma in generale tutte le colonie selezionate derivanti dalla fusione MG hanno determinato un aumento del numero di foglie rispetto ai controlli trattati con sola acqua (Fig. 3.12 B).

Per quanto riguarda la lunghezza del fusto e delle radici, le piante di pomodoro trattate con le spore dei ceppi derivanti da fusione hanno mostrato un allungamento sia della parte ipogea che epigea (Fig. 3.12 C, D). I risultati più incoraggianti per entrambi i parametri sono stati registrati con i ceppi B3, B4 e B5. Anche in questo caso l'ibrido B5 ha determinato un incremento significativo sia della lunghezza del fusto (+ 121%) sia quella delle radici (+ 126%) rispetto ai ceppi parentali. L'utilizzo dei ceppi parentali applicati singolarmente o in combinazione ha comunque apportato un discreto incremento della lunghezza di fusto e radici nelle piante trattate rispetto ai controlli.

In termini di peso fresco e secco, i risultati sono stati estremamente variabili a seconda del trattamento considerato. Solo le piante trattate con gli ibridi B4 e B5 hanno riportato incrementi significativi rispetto ai parentali e ai controlli (Fig. 3.12 E, F). Per quanto riguarda le altre colonie ibride selezionate, queste non hanno apportato miglioramenti significativi in termini di peso fresco o secco delle piante trattate rispetto ai parentali, anzi in taluni casi sono stati registrati valori inferiori.

Figura 3.12. Effetto dei trattamenti con i ceppi derivanti dalla fusione di protoplasti MG e i rispettivi parentali su piante di pomodoro allevate in camera di crescita. Parametri esaminati: contenuto di clorofilla determinato mediante misuratore SPAD (A), numero medio di foglie per pianta (B), lunghezza delle radici (cm/pianta) (C), lunghezza del fusto (cm/pianta) (D), peso fresco (g/pianta) (E) e peso secco (g/pianta) (F) delle piante trattate. B1-B6: ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalla fusione di protoplasti MG. M10, GV41: ceppi di *Trichoderma* parentali utilizzati per la fusione di protoplasti MG. M10+GV41: trattamento combinato dei ceppi parentali M10 e GV41. Lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0,05$)

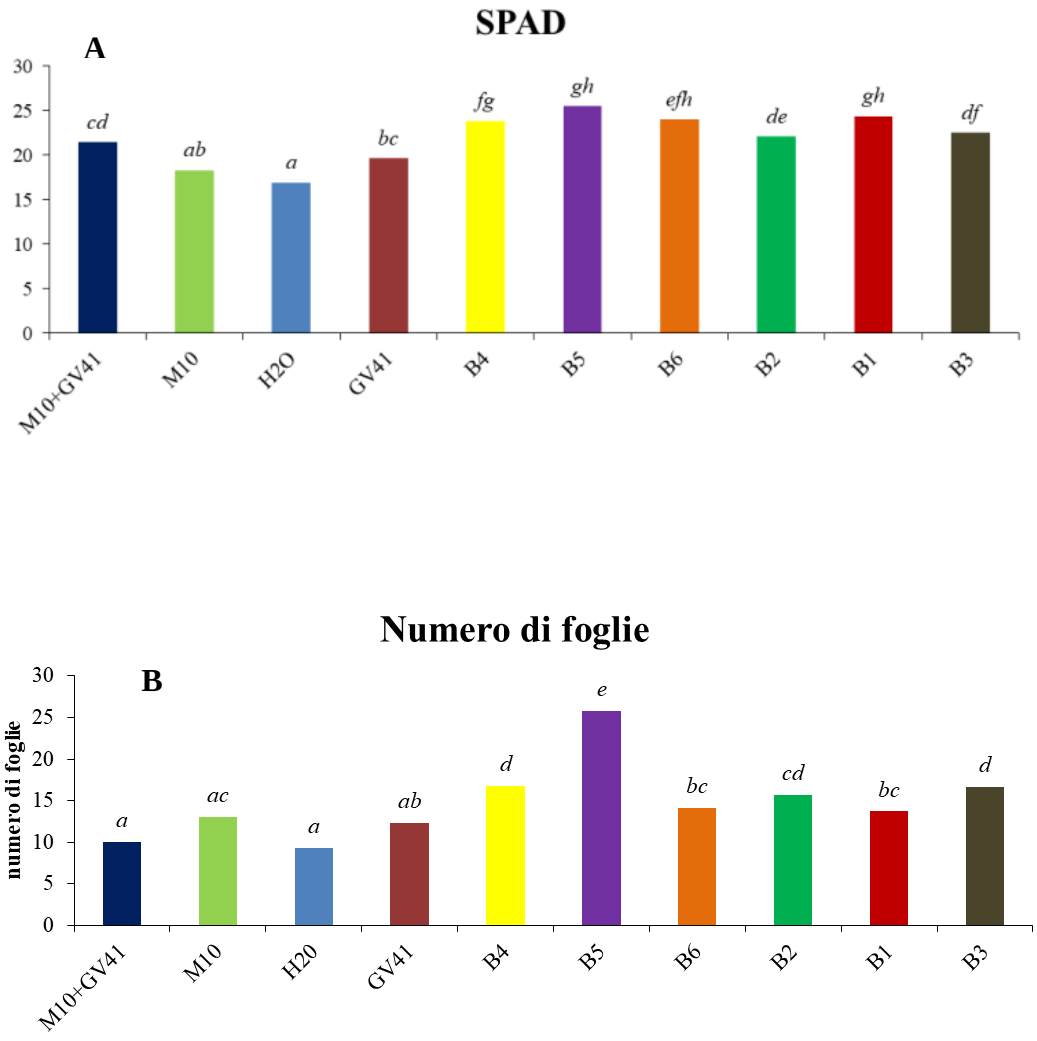
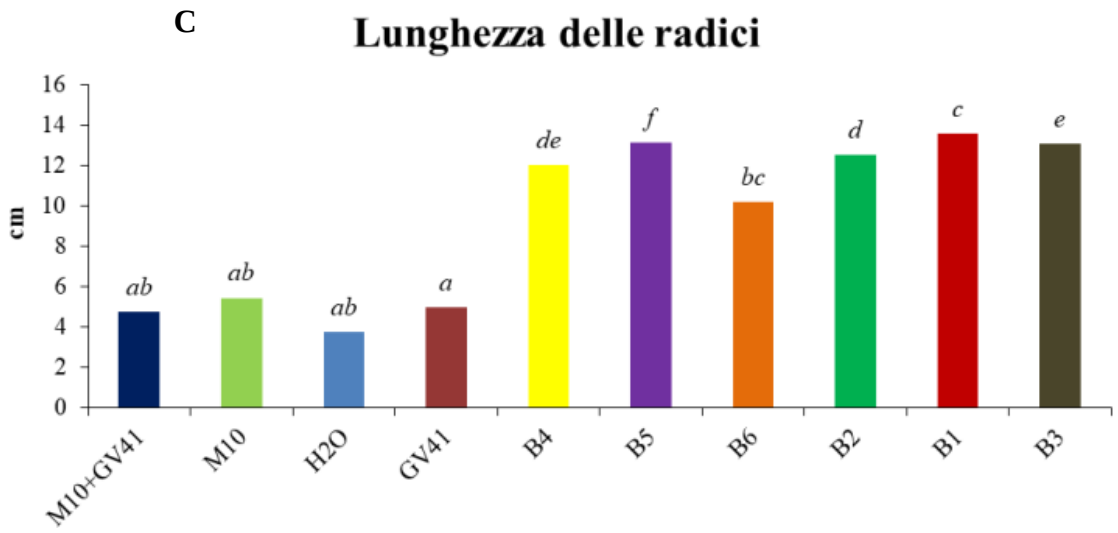


Figura 3.12. *Continuo*



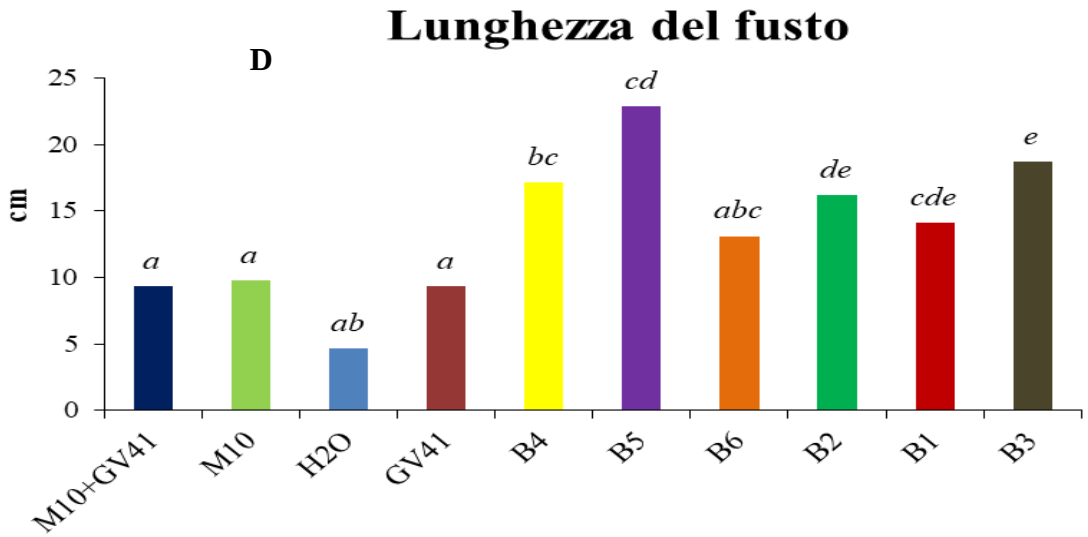
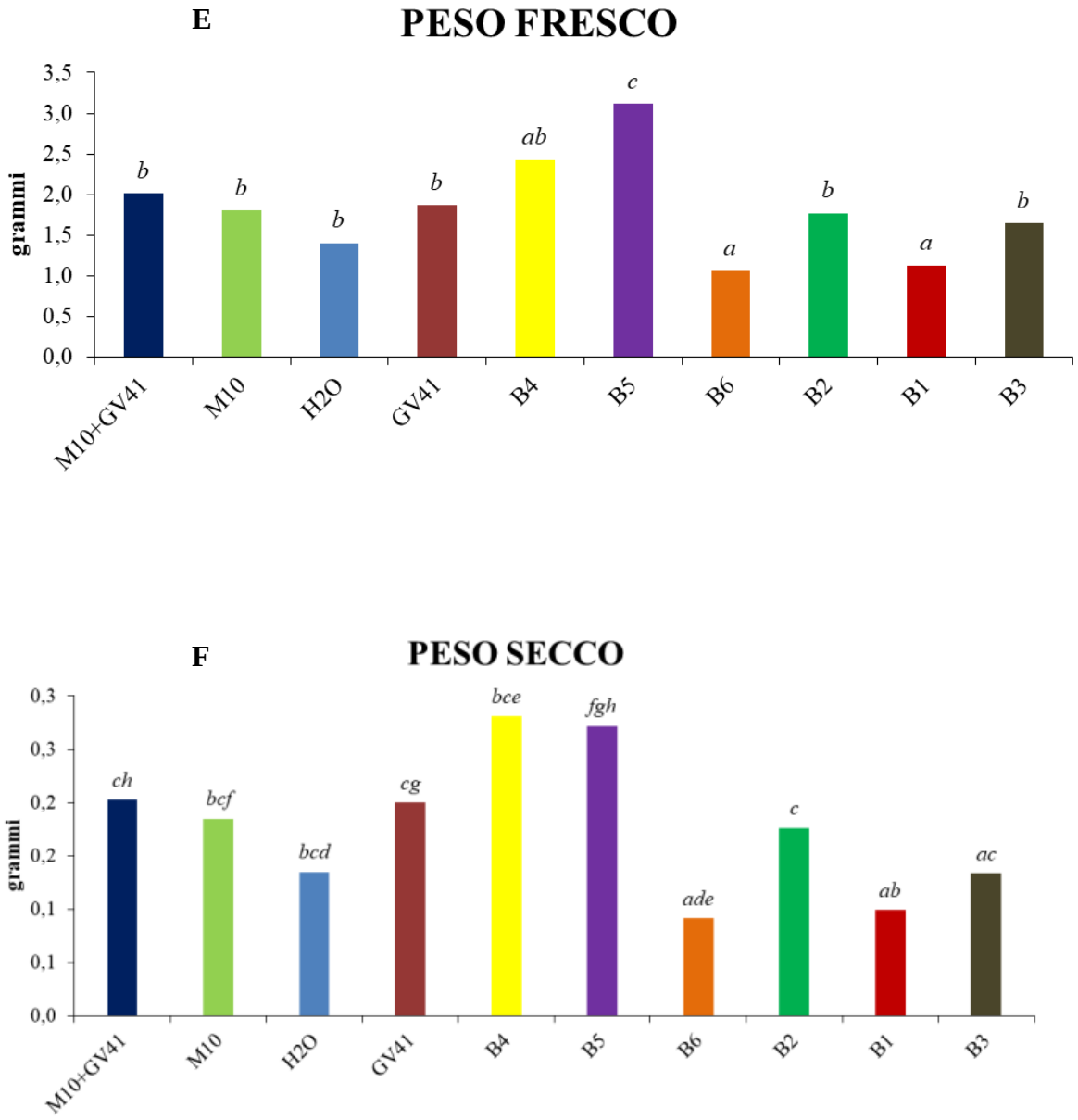


Figura 3.12. *Continuo*



Per quanto riguarda le colonie derivanti dalla fusione di protoplasti TK (Tab. 2.1), solo gli ibridi C1 e C4 hanno fatto riscontrare un incremento significativo del contenuto di clorofilla determinato mediante misuratore SPAD (Fig. 3.13 A). Nei restanti casi, l'aumento dello SPAD è stato paragonabile a quello ottenuto applicando i ceppi parentali singoli o in combinazione. In tutti i casi comunque, l'utilizzo dei ceppi di *Trichoderma* ha determinato un significativo incremento del contenuto fogliare di clorofilla rispetto alle piante trattate con sola acqua.

Per quanto riguarda la lunghezza delle radici e del fusto, invece, le piante di pomodoro San Marzano nano trattate con gli ibridi hanno mostrato una fitness migliore rispetto a quelle trattate con i parentali singoli e/o combinati e rispetto al controllo con acqua (Fig. 3.13 B,C). L'effetto registrato in termini di allungamento di fusto e radici ottenuto con l'applicazione degli ibridi risulta essere simile, anche se l'ibrido C4 ha determinato gli incrementi più consistenti. Infine, la valutazione del peso fresco e del peso secco delle piante trattate ha mostrato un incremento ponderale in tutte le piante trattate con gli ibridi rispetto a quelle trattate con i parentali singoli e/o combinati e con il controllo, in particolar modo nel caso dell'ibrido C4 (Fig. 3.13 D, E).

Figura 3.13. Effetto dei trattamenti con i ceppi derivanti dalla fusione di protoplasti TK e i rispettivi parentali su piante di pomodoro allevate in camera di crescita. Parametri esaminati: contenuto di clorofilla determinato mediante misuratore SPAD (A), lunghezza del fusto (cm/pianta) (B), lunghezza delle radici (cm/pianta) (C), peso fresco (g/pianta) (D) e peso secco (g/pianta) (E) delle piante trattate. C1-C4: ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalla fusione di protoplasti TK. T22, KV906: ceppi di *Trichoderma* parentali utilizzati per la fusione di protoplasti TK. T22+KV906: trattamento combinato dei ceppi parentali T22 e KV906. Lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti (p <0,05).

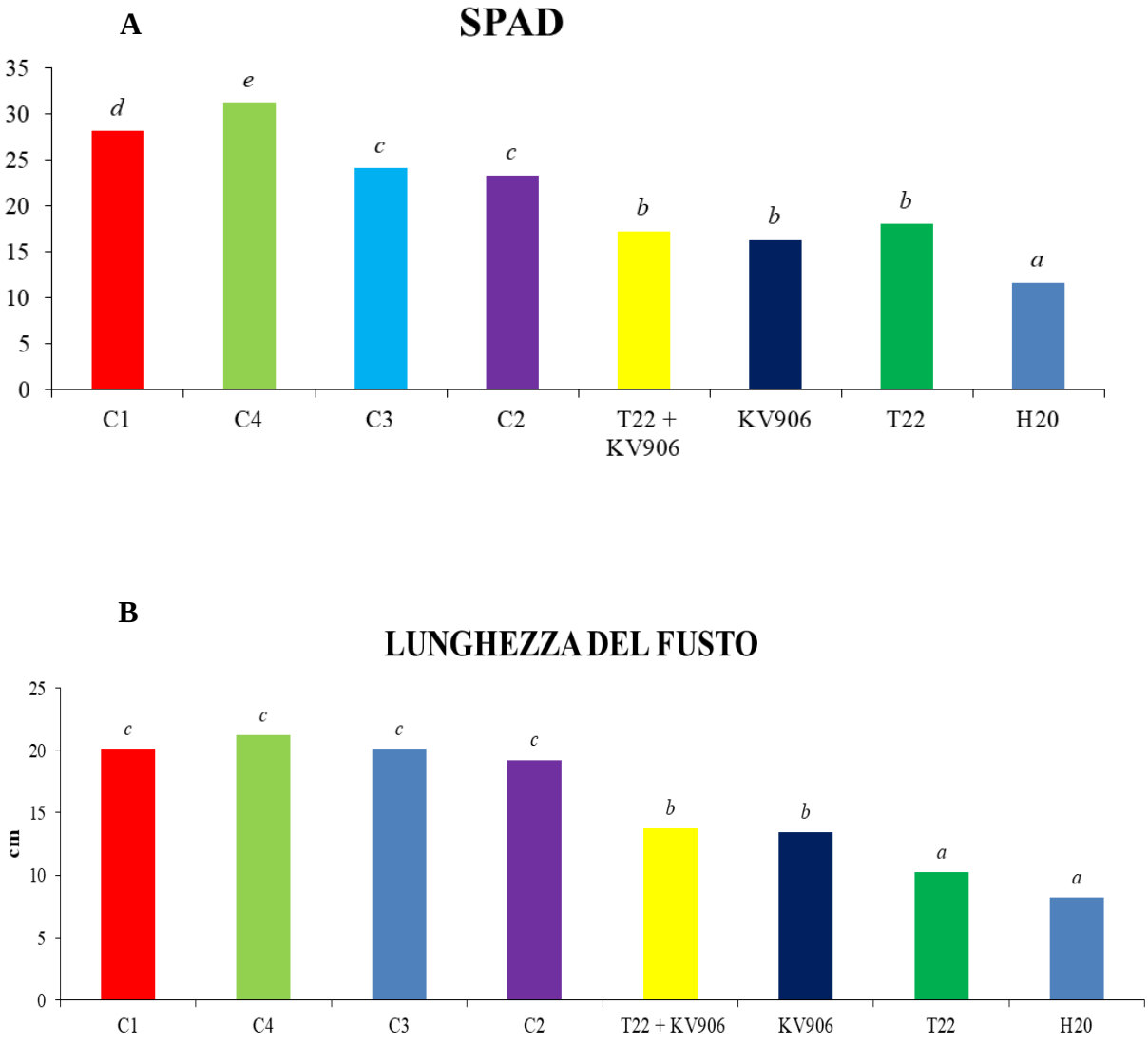
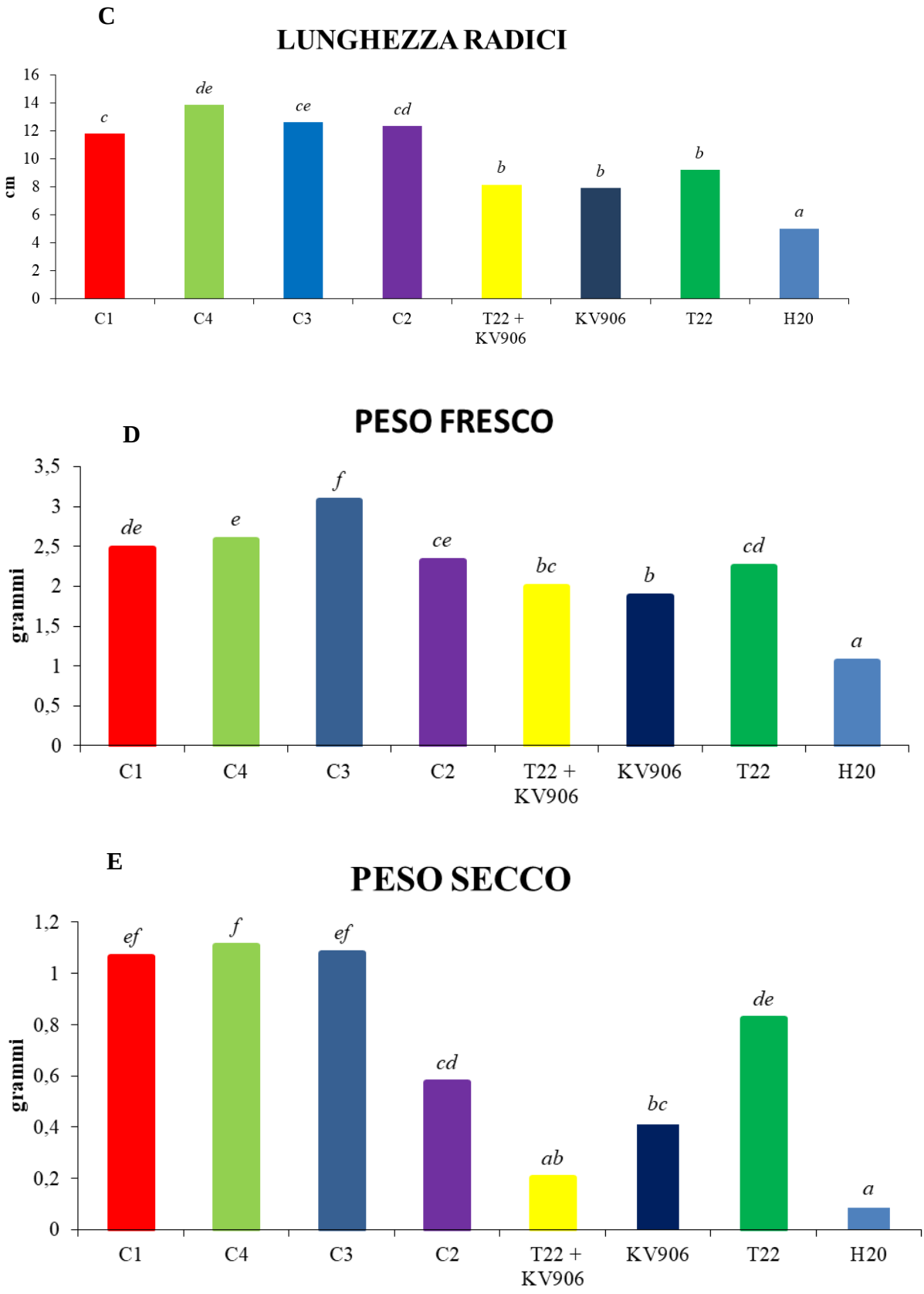


Figura 3.13. *Continuo*



Un’ulteriore valutazione dell’effetto biostimolante degli ibridi ottenuti è stata realizzata applicando gli isolati che avevano mostrato un’attività migliore rispetto ai parentali nei due saggi precedentemente descritti. I trattamenti in questo caso sono stati effettuati direttamente al colletto delle piante di pomodoro cv. San Marzano nano allevate in serra a tunnel e ripetuti ogni 15 giorni per complessivi 3 mesi. In questo saggio, oltre a valutare l’effetto dei singoli ceppi, è stato preso in considerazione anche un eventuale sinergismo tra essi, mediante l’applicazione di consorzi microbici costituiti da coppie di ibridi.

Per quanto riguarda la lunghezza delle radici, tutte le piante trattate con gli ibridi applicati singolarmente o in combinazione hanno mostrato una fitness migliore rispetto a quelle trattate con i parentali (singoli o combinati) e al controllo. In particolare, i due trattamenti realizzati con i consorzi microbici composti dagli ibridi A3+A5 e A3+B4 hanno determinato un maggiore aumento della lunghezza delle radici rispetto alle altre applicazioni (Figura 3.14A).

Nel caso della lunghezza del fusto, come per le radici, tutte le piante trattate con gli ibridi di *Trichoderma* risultano avere una maggiore lunghezza rispetto a quelle trattate con i ceppi parentali singoli o combinati e al controllo con acqua. I maggiori incrementi sono stati osservati con i ceppi ibridi A3, B4 e B5 (Figura 3.14B).

Gli ibridi A3, A5 e B4 hanno inoltre determinato anche un significativo incremento del peso fresco e secco delle piante trattate rispetto ai trattamenti con parentali singoli e combinati. In questo caso, le piante trattate con i consorzi microbici mostrano un peso fresco e secco comparabile o addirittura inferiore alle piante trattate con i parentali singoli e/o combinati.

Figura 3.14. Effetto dei trattamenti con i ceppi derivanti dalla fusione di protoplasti MG e i rispettivi parentali su piante di pomodoro allevate in serra. Parametri esaminati: lunghezza delle radici (cm/pianta) (A), lunghezza del fusto (cm/pianta) (B), peso fresco (g/pianta) (C) e peso secco (g/pianta) (D) delle piante trattate. A3, A5, B4, B5: ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalla fusione di protoplasti MG. M10, GV41: ceppi di *Trichoderma* parentali utilizzati per la fusione di protoplasti MG. A3+A5, A3+B4, A3+B5, M10+GV41: consorzi microbici ottenuti dalla combinazione dei rispettivi ceppi singoli. Lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0,05$).

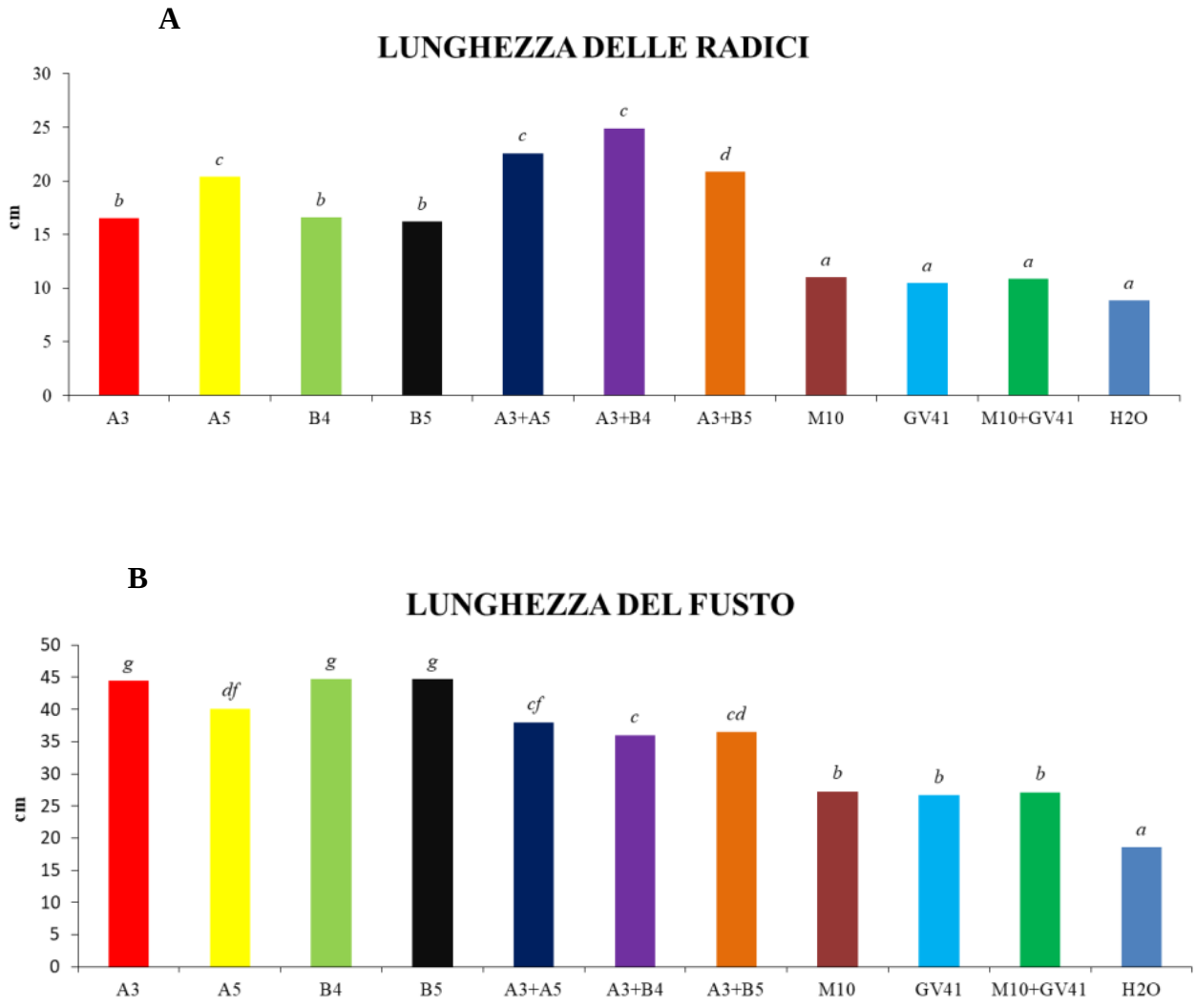
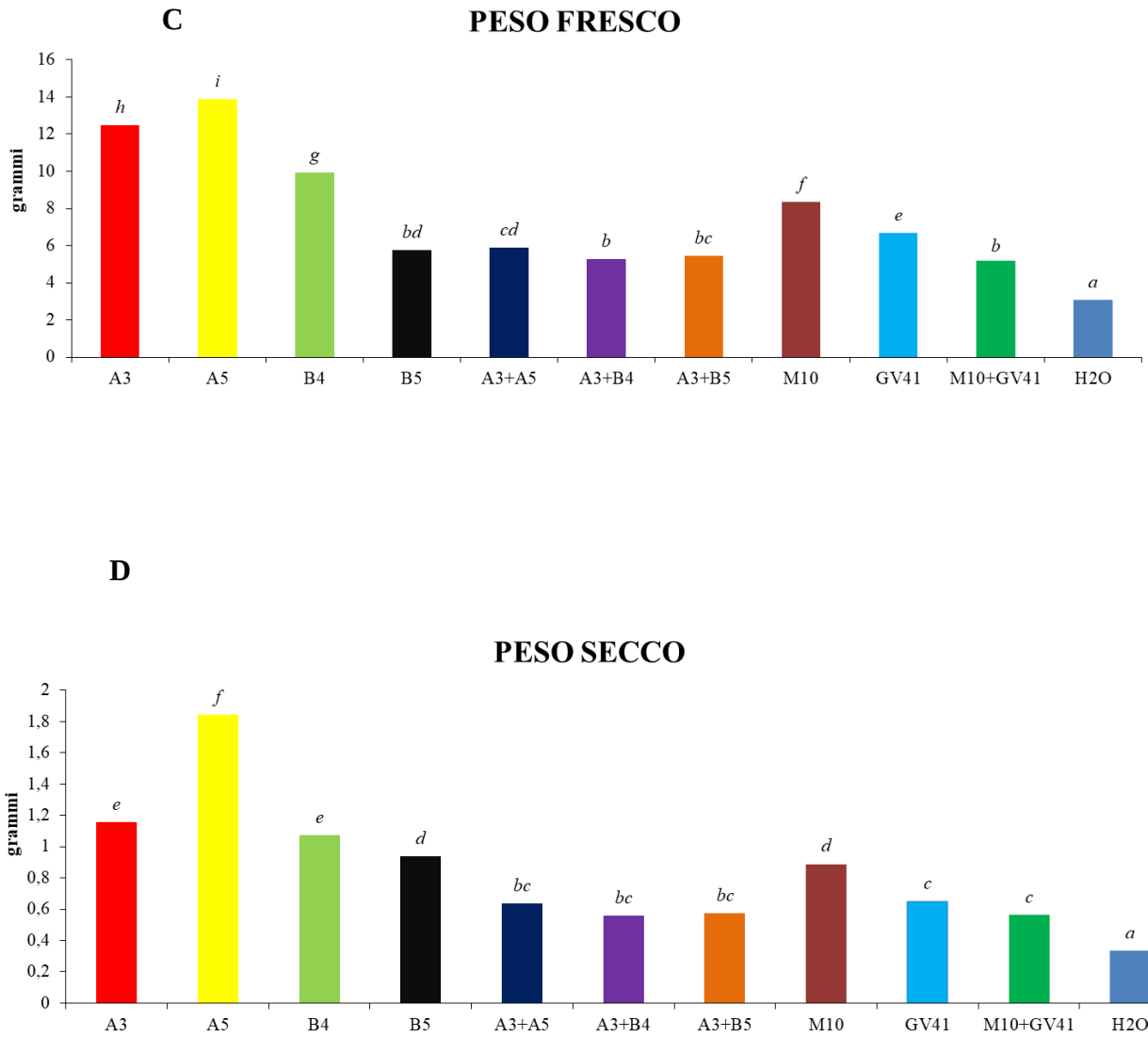


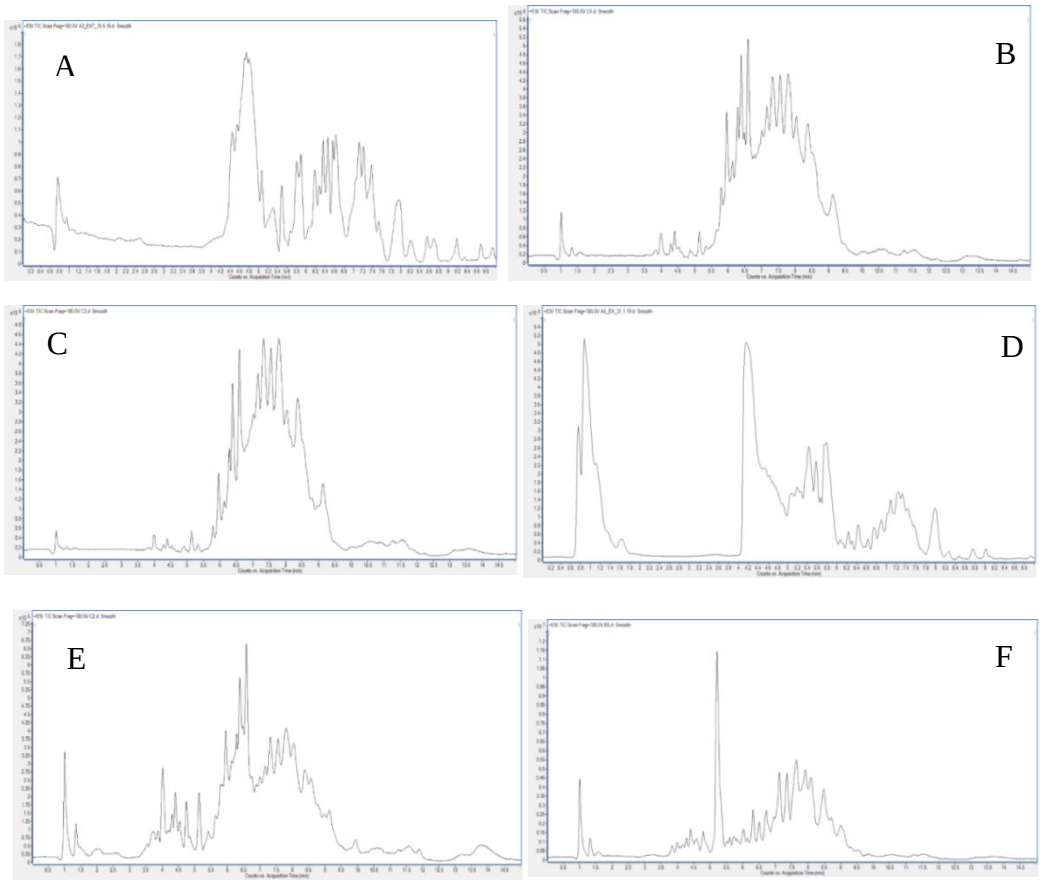
Figura 3.14. *Continuo*



3.6 Analisi metabolomica

La produzione di molecole bioattive da parte degli ibridi di *Trichoderma* ottenuti mediante fusione di protoplasti è stata valutata mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS). Dal confronto delle masse monoisotopiche sottese ad ogni picco cromatografico con quelle presenti in database ed in letteratura è stato possibile identificare i principali metaboliti prodotti in coltura liquida da ciascun ibrido. In Figura 3.15 sono riportati i cromatogrammi relativi ad ogni ceppo analizzato.

Figura. 3.15. Cromatogrammi risultanti dall'analisi mediante LC-MS qTOF degli estratti prodotti dagli ibridi di *Trichoderma* ottenuti mediante fusione di protoplasti. (A) A3; (B) C4; (C) C3; (D) A5; (E) C2; (F) B5. A3, A5, B5: ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalla fusione di protoplasti MG. C2, C3, C4: ibridi di *Trichoderma* ottenuti dalla fusione di protoplasti TK.



L’analisi metabolomica ha permesso di identificare sia molecole tipicamente prodotte dai ceppi parentali usati per la fusione, che molecole note per essere prodotte da *Trichoderma*, ma non dai ceppi utilizzati per gli esperimenti. Nella tabella seguente sono riportate le molecole identificate per ogni ibrido (Tabella 3.3).

Tabella 3.3. Elenco dei composti identificati mediante analisi LC-MS qTOF prodotti dalle colture degli ibridi selezionati. I dati presentati includono: tempo di ritenzione (RT, espresso in minuti), il nome, la formula chimica e la massa sperimentale di ciascun composto identificato.

N.	**RT (min)**	**Composto**	**Formula**	**Massa sperimentale**
1	6,357	6-n-Pentyl-alpha-pyrone	$C_{10}H_{14}O_2$	166,0997
2	5,158	Trichocarane B	$C_{15}H_{26}O_3$	254,18895
3	3,832	Maculosin	$C_{14}H_{16}N_2O_3$	260,1169
4		Harziphilone	$C_{15}H_{18}O_4$	262,1205
5		Heptelidic acid	$C_{15}H_{20}O_5$	280,1310
6		Hydroxyganoderic acid G	$C_{30}H_{44}O_9$	548,66

3.7 Effetti in co-coltura su mais

3.7.1 Attività di biocontrollo contro *Fusarium graminearum*

Un ulteriore test di competizione tra gli ibridi selezionati di *Trichoderma* ed il patogeno *Fusarium graminearum* è stato effettuato eseguendo delle co-colture utilizzando come substrato di crescita il mais (*Zea mays* L., 1753, ibrido commerciale PR33M15, classe FAO 600, linea biologica). Questo substrato risulta adatto sia alla coltivazione dell'antagonista, sia del patogeno che attacca principalmente le spighe e in particolare i chicchi di mais in fase di post raccolta e di stoccaggio. Dopo 30 giorni dall'inoculo su mais, è stata effettuata la conta delle spore per valutare la capacità di inibire la crescita del patogeno da parte dei ceppi benefici di *Trichoderma*. I risultati, con la rispettiva significatività statistica, sono riportati in Tabella 3.4.

Tabella 3.4. Concentrazione di spore di *F. graminearum* determinata nel saggio di co-coltura su mais. I dati si riferiscono alla media di 3 misurazioni (spore/mL) ± la deviazione standard. A3: ibrido di *Trichoderma* ottenuto dalla fusione di protoplasti MG; T22, M10: *T. harzianum* ceppo T22 e ceppo M10, rispettivamente; ctrl: controllo negativo (*F. graminearum* inoculato in assenza di *Trichoderma*). Lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0,05$).

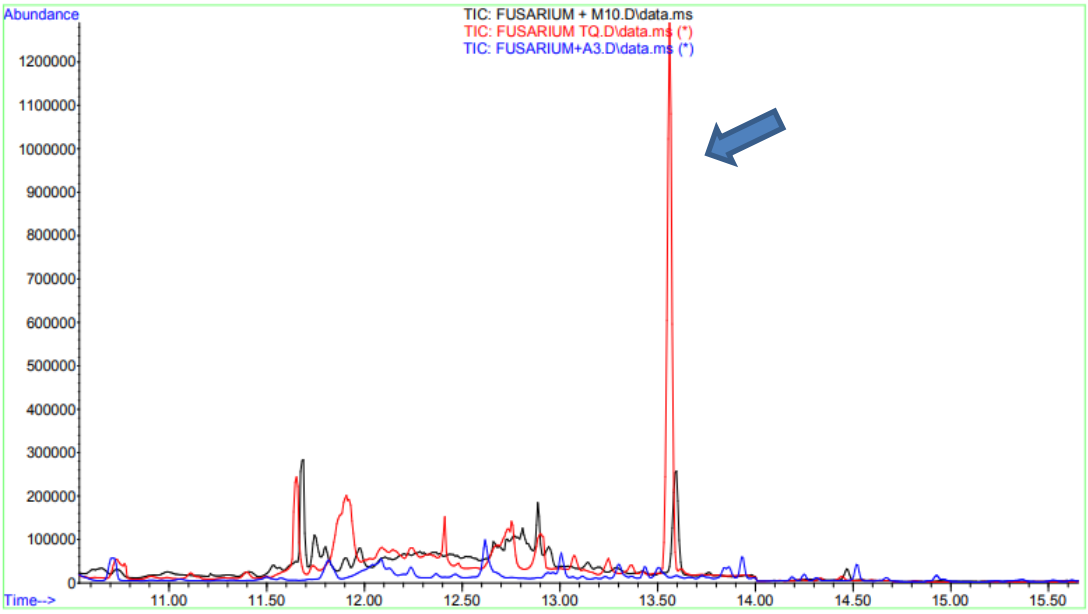
Co-coltura	$\bar{x}$ ***[sp/mL]***
Fusarium graminearum (ctrl)	$2,2 \times 10^{10} \pm 5,9 \times 10^{9}$ *a*
Fusarium graminearum + A3	$4,1 \times 10^{4} \pm 2,0 \times 10^{4}$ *b*
Fusarium graminearum + T22	$1,2 \times 10^{6} \pm 3,6 \times 10^{5}$ *b*
Fusarium graminearum + M10	$8,0 \times 10^{5} \pm 2,6 \times 10^{5}$ *b*

I risultati mostrano che nel controllo, dove è stato inoculato solo il patogeno, il numero di spore di *F. graminearum* è significativamente superiore rispetto alle co-colture in cui è presente anche il *Trichoderma*. Questo dato conferma che tutti i ceppi di *Trichoderma* impiegati per il saggio hanno avuto un effetto antagonista nei confronti del patogeno inibendone la crescita e la sporulazione quando co-coltivati su substrato naturale.

3.7.2 Effetti sulla produzione della micotossina deossinivalenolo (DON)

Per poter valutare l'effetto dei ceppi di *Trichoderma* allevati in co-coltura con *F. graminearum* sulla produzione della micotossina deossinivalenolo (DON) da parte di quest'ultimo, è stata effettuata un'estrazione del metabolita dai semi di mais, seguita da un'analisi GC-MS. Per ogni co-coltura (Tab. 3.4) è stata analizzata la presenza e la quantità di questo metabolita, confrontando i dati ottenuti con quelli del controllo (mais inoculato solo con il patogeno). In Figura 3.16, sono stati sovrapposti tre cromatrogrammi derivanti dall'analisi al GC-MS. Entrambi i ceppi di *Trichoderma* hanno svolto un'attività antagonista nei confronti di *F. graminearum*; infatti la quantità di micotossina si è ridotta nella co-coltura con il ceppo M10, mentre risulta addirittura assente in quella con l'ibrido A3.

Figura 3.16. Sovrapposizione di cromatogrammi ottenuti dall'analisi GC-MS di campioni di mais inoculati con sospensioni di spore di *Fusarium graminearum* e *Trichoderma*. Linea nera: co-coltura tra *F. graminearum* e *T. harzianum* ceppo M10. Linea rossa: *F. graminearum* (controllo). Linea blu: co-coltura tra *F. graminearum* e l'ibrido di *Trichoderma* A3. La freccia indica il picco corrispondente alla micotossina deossinivalenolo (DON).



La quantificazione della micotossina nei campioni esaminati ha di fatto confermato quanto osservato nei cromatogrammi: in tutte le co-colture in cui sono presenti i ceppi di *Trichoderma*, c'è una netta diminuzione della quantità di DON rispetto alla coltura controllo inoculata con il solo patogeno (Tab. 3.5). I ceppi parentali M10 e T22 hanno determinato una riduzione > 70% della produzione di micotossina.

Ad ogni modo, l'ibrido di *Trichoderma* A3 ha avuto la miglior performance sia in termini di attività di biocontrollo del patogeno, sia per la produzione di DON; infatti

la concentrazione di questo metabolita secondario risulta essere circa 13 volte inferiore in presenza di A3 rispetto alla singola coltura con il solo *Fusarium. graminearum*.

Tabella 3.5. Quantità media di deossinivalenolo (DON) riscontrata in ciascun campione di mais inoculato con sospensioni di spore di *Fusarium graminearum* e *Trichoderma*. I dati si riferiscono alla media (ng DON/g mais) ± la deviazione standard. A3: ibrido di *Trichoderma* ottenuto dalla fusione di protoplasti MG; T22, M10: *T. harzianum* ceppo T22 e ceppo M10, rispettivamente; ctrl: controllo negativo (*F. graminearum* inoculato in assenza di *Trichoderma*). Lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0,05$).

Condizione	$\bar{x}$ **(ng/g)**
***Fusarium graminearum* (ctrl)**	1256 ± 23 [a]
***Fusarium graminearum* + A3**	95 ± 5 [b]
***Fusarium graminearum* + M10**	340 ± 56 [c]
***Fusarium graminearum* + T22**	300 ± 35 [c]

4. DISCUSSIONE

I funghi del genere *Trichoderma* sono stati ampiamente utilizzati in agricoltura come agenti di biocontrollo in virtù delle loro attività micoparassitarie e della capacità di promuovere la fitness delle piante e la protezione nei confronti degli agenti fitopatogeni, il che li rende degli eccellenti simbionti delle piante (Guzmán- Guzmán et al., 2019; Hermosa et al., 2012; Vinale et al., 2008). L'efficacia di numerosi isolati di *Trichoderma* appartenenti soprattutto alle specie *harzianum*, *asperellum*, *viride*, *gamsii* e *atroviride* dimostrata sia in laboratorio sia in condizioni di campo, ne ha supportato l'inserimento in appositi bioformulati diffusi in oltre 60 paesi nel mondo (Lorito et al., 2010; Woo et al., 2014). I funghi filamentosi, ivi comprese diverse specie di *Trichoderma*, sono altresì considerati una fonte importante di metaboliti primari e secondari di interesse industriale (Rokem 2010). Su di essi sono stati condotti svariati programmi di miglioramento poiché i ceppi originariamente isolati solitamente producevano quantità minime dei composti di interesse o presentavano limitazioni nell'applicazione in campo (Aghcheh e Kubicek, 2015). La maggior parte di questi programmi si sono basati su tecniche di mutagenesi classica o di manipolazione genetica. La mutagenesi, ovvero l'alterazione permanente di uno o più nucleotidi presenti in un filamento di DNA, viene realizzata trattando il ceppo microbico con agenti mutageni fisici (radiazioni ionizzanti, raggi ultravioletti) o chimici (agenti alchilanti o intercalanti, analoghi delle basi azotate, etc.).

L'obiettivo della mutagenesi per l'ottenimento di ceppi migliorati è quello di massimizzare la frequenza delle mutazioni desiderate in una popolazione, riducendo

al minimo la frequenza delle mutazioni secondarie non letali che potrebbero inficiare gli effetti positivi ottenuti con la mutazione voluta (Parekh et al., 2000).

Per ovviare alla comparsa di mutazioni indesiderate è possibile ricorrere alla ricombinazione genetica che crea mutazioni target nei geni di interesse (Ward et al., 1990; Hodges et al., 1994), ma incontra l'ostacolo dei paesi che vietano l'utilizzo di organismi geneticamente modificati. Al contrario, la fusione di protoplasti rappresenta un metodo rapido e semplice di ottenimento di specie dalle caratteristiche migliorate ma consente di ottenere organismi assimilabili a dei mutanti naturali.

Questa tecnica è stata utilizzata con successo per l'ottenimento di ceppi di *Trichoderma* che in molti casi hanno mostrato capacità di biocontrollo maggiori rispetto ai relativi parentali (Mohamed e Haggag, 2010; Migheli et al., 1995; Sivan e Harman, 1991; Pe'er e Chet, 1990; Harman et al., 1989; Stasz et al., 1988). Un esempio concreto dell'applicazione di ceppi migliorati ottenuti mediante fusione di protoplasti è il ceppo T22 di *T. harzianum* (ATCC 20847), prodotto dall'incrocio tra i mutanti T-12 e T-95 e riconosciuto dalla Commissione come un organismo non geneticamente modificato ai sensi della Direttiva 2001/18/EC10.

Le sue formidabili capacità antagoniste, nonché la sua grade adattabilità a diversi habitat e agroecosistemi lo ha reso tutt'oggi l'agente di biocontrollo fungino più utilizzato in agricoltura, come dimostra il fatto che è presente quale ingrediente attivo di bioformulati registrati in tutto il mondo (Woo et al., 2014).

In questo progetto di dottorato sono stati prodotti e caratterizzati diversi ibridi di *Trichoderma* ottenuti mediante la fusione di protoplasti di ceppi dalle comprovate

capacità antagoniste o biostimolanti: T22 ed M10 per *T. harzianum*, GV41 per *T. virens*, KV906 per *T. asperellum* (Marra et al., 2019, Vinale et al., 2009, 2012; Lombardi et al., 2020; Fiorentino et al., 2018; Hermosa et al., 2012; Bononi et al., 2020; López-Bucio et al., 2015; Martínez-Medina et al., 2014). I protoplasti sono stati ottenuti secondo le condizioni di reazione riportate da Stasz et al., 1988, migliorando i tempi di reazione ed utilizzando l'enzima *Novozyme* in una soluzione 0,7 M di NaCl, che ha permesso un rilascio completo dei protoplasti. I protoplasti, così ottenuti, sono stati utilizzati per effettuare i due eventi di fusione utilizzando come fusogeno una soluzione di PEG al 60% (p/v). La percentuale di PEG ricopre un ruolo fondamentale per l'ottenimento dei protoplasti perché una quantità eccessiva potrebbe portare alla rottura o alla lisi cellulare dei protoplasti. Pe'er e Chet (1990) hanno dimostrato che per una fusione ottimale intra-specifica tra ceppi di *T. harzianum* è sufficiente utilizzare solo 33% di PEG, mentre EL-Bondkly (2006) asserisce che in caso di fusioni interspecifiche è necessario utilizzare il 60% di fusogeno.

Le miscele di fusione, piastrate sul substrato nutritivo per favorire la rigenerazione della parete (PRM), hanno mostrato una inusuale colorazione del micelio bianco-giallognola (Fig. 3.2), lontana dalla tipica pigmentazione verde osservata nei due parentali. Ad ogni modo, la presenza della pigmentazione gialla è stata già riscontrata in altri studi di letteratura su fusione protoplastica di ceppi di *Trichoderma* (Priyasundari, 2002; Hassan, 2014).

L'approccio innovativo utilizzato in questo progetto di dottorato ha riguardato anche la fase di selezione degli ibridi, poiché in luogo della valutazione del tipo di aminoacidi non prodotti dal mutante auxotrofico normalmente ottenuto mediante

mutagenesi (Statsz et al., 1989), si è scelto di utilizzare un metodo high throughput basato sull'osservazione *in situ* di aspetti fenotipici di interesse, come il contenimento dei patogeni, l'incremento della crescita o della produttività o l'induzione della resistenza in pianta contro i patogeni. Dal confronto tra le piante inoculate con le miscele di fusione e quelle inoculate con i ceppi parentali è stato possibile escludere che l'attività di biocontrollo riscontrata nei confronti del patogeno terricolo *R. solani* fosse dovuta ad un effetto additivo o sinergico dei parentali. Difatti per questi ultimi la mortalità è stata osservata nel 50-75% delle piante trattate, mentre nelle piante inoculate con la miscela di fusione MG (Tab. 2.1; Fig. 3.4) la mortalità era nulla e solo il 20% delle piante trattate ha mostrato sintomi di marciume al colletto. Analogamente, entrambe le miscele di fusione prodotte (MG e TK, Tab. 2.1) sono state selezionate per l'attività biostimolante su piante di pomodoro cv. S. Marzano nano, mostrando rispetto ai parentali un incremento significativo compreso tra il 50 e il 60% delle lunghezza delle radici (fusione MG) e 50-80% per la lunghezza del fusto (fusione TK). Questi risultati hanno lasciato ipotizzare la presenza, all'interno delle miscele di fusione ottenute, di ceppi con attività potenziata.

Dal suolo rizosferisco delle piante trattate con le miscele di fusione e che non hanno mostrato i sintomi della malattia o che hanno presentato una fitness migliorata sono state selezionate 13 colonie, successivamente isolate in purezza mediante tre passaggi in coltura monosporica. La caratterizzazione delle colonie ibride ottenute è stata realizzata mediante analisi di caratteri morfologici, genetici e biochimici. Dal punto di vista morfologico, i ceppi ottenuti mediante fusione hanno presentato una sporulazione differente in termini di quantità e pigmentazione dei conidi, così come

differente è stata rispetto ai parentali la velocità di crescita su differenti substrati nutritivi (PDA + acido lattico, Rose bengal + cloramfenicolo, TSB). In particolare, gli ibridi A3 e A5 (ottenuti dalla miscela di fusione MG) crescevano molto più lentamente rispetto ai ceppi parentali mentre quelli ottenuti dalla fusione TK avevano una crescita miceliare similare a quella dei rispettivi parentali. Per quanto riguarda altri caratteri morfologici distintivi del genere *Trichoderma,* come rami conidiofori, clamidospore, conidi e ramificazioni ifali, non sono emerse grandi differenze rispetto ai parentali.

L'analisi filogenetica condotta mediante analisi delle sequenze ITS1-4 (Kullnig et al., 2002) ha rivelato come gli ibridi selezionati dalla fusione TK siano geneticamente più affini alla specie *asperellum,* mentre per la fusione MG 5 ibridi hanno mostrato maggiore omologia con la specie *harzianum* e 3 con la specie *virens*. Questi risultati trovano giustificazione negli studi sulle progenie di incroci intra- ed inter-specie di *Trichoderma* realizzati da Stasz e Harman (1990). Gli autori hanno concluso che la progenie ottenuta mediante fusione di protoplasti non ha avuto origine da meccanismi di ricombinazione parasessuale, bensì dalla degradazione nucleare di uno dei due parentali (considerato il genitore non prevalente) nell'*eterocarion* formatosi, con la possibilità che piccoli frammenti del genoma di quest'ultimo si siano incorporati nel nucleo dell'altro parentale (il genitore prevalente). Questa "prevalenza" fa dunque ipotizzare che anche gli ibridi prodotti in questo progetto di dottorato abbiano ereditato buona parte delle caratteristiche del parentale risultato filogeneticamente più simile. Ciononostante, sono attese differenze rispetto ai ceppi di origine, dal momento che dall'analisi metabolomica delle colture ibride sono state identificate sia molecole tipicamente prodotte dai

parentali usati per la fusione, che molecole note per essere prodotte da *Trichoderma*, ma non dai ceppi utilizzati per gli esperimenti. Ad esempio, il 6-n-Pentyl-alpha-pyrone (6PP) non viene prodotto da nessuno dei parentali, ma è stato identificato negli estratti prodotti dagli ibridi ottenuti da entrambe le fusioni. Questo aspetto richiederà ulteriori approfondimenti per chiarire quali modificazioni si siano verificate nel genoma di questi isolati che giustifichi la produzione di nuovi metaboliti.

La caratterizzazione genetica delle colonie ibride ottenute mediante fusione di protoplasti è stata realizzata anche mediante analisi RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), considerata una tecnica semplice e rapida per determinare la presenza di polimorfismi tra specie simili e analizzare le differenze tra ceppi mutanti della stessa specie (Jones e Kortenkamp, 2000; El Komy et al., 2015; William et al., 1990). Dei circa 60 primer usati, 8 appartenenti alla seria OPA hanno consentito di discriminare i ceppi ibridi ottenuti dalla fusione MG, mentre non sono emerse differenze nel caso delle colonie ibride ottenute dalla fusione TK. Il primer OPA-16 ha prodotto ampliconi in tutti i funghi presi in esame e ha permesso di evidenziare dei profili genetici differenti tra gli ibridi e i parentali. I profili di amplificazione ottenuti per gli ibridi A5, B4 e B5 hanno mostrato maggiori similitudini tra loro rispetto al fusante A5. Il maggior numero di polimorfismi è stato ottenuto utilizzando il primer OPA-10, analogamente a quanto riportato nello studio di Skoneczny et al. (2015), dove l'analisi RAPD ha consentito di determinare la diversità genetica di ceppi di *T. atroviride* isolati in Polonia. I risultati ottenuti avvalorano pertanto l'ipotesi che la fusione di protoplasti abbia portato ad un effettivo rimescolamento del genoma nelle colonie ibride rispetto ai ceppi parentali.

L’attività di biocontrollo delle singole colonie ibride isolate è stata saggiata *in vitro* nei confronti di diversi funghi fitopatogeni (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum* e *Botrytis cinerea*). Tutti gli ibridi saggiati (sia quelli selezionati per l’attività di biocontrollo che quelli per l’effetto biostimolante), hanno mostrato di possedere una forte attività di biocontrollo nei confronti dei patogeni utilizzati. Questo evento potrebbe essere dovuto alla produzione di metaboliti secondari dotati di attività antibiotica in grado di inibire la crescita miceliare del patogeno prima del contatto.

Dai saggi effettuati è emerso che alcuni ibridi selezionati hanno mostrato un’attività di biocontrollo paragonabile a quella dei parentali. Gli ibridi selezionati dalla fusione TK (denominati C1, C2, C3 e C4) hanno mostrato *in vitro* un’attività antagonista potenziata rispetto ai ceppi parentali di *T. asperellum* ceppo KV906 e *T. harzianum* ceppo T22 nei confronti del patogeno fogliare *Botrytis cinerea*. Nel caso di *Rhizoctonia solani* solo l’ibrido A3 ha dimostrato una maggiore capacità di inibire il patogeno rispetto ai parentali e, dopo 3 giorni dal co-inoculo, di parassitizzarlo. Questo stesso ibrido ha mostrato anche una spiccata attività antagonista nei confronti di *Fusarium graminearum.* Ad ogni modo, nei confronti di quest’ultimo patogeno, la maggiore inibizione della crescita (73%) è stata osservata con l’ibrido B5, nonostante questa colonia fosse stata selezionata per l’attività di promozione della crescita. Questi risultati sono in accordo con quelli riportati in altri studi dove, a seguito di fusione di protoplasti, la progenie ricombinante di *Trichoderma* ha mostrato un’elevata attività di biocontrollo (Mohamed e Haggag, 2010; EL-Bondkly e Talkhan, 2007; Hanson e Howell, 2002; Migheli et al., 1995; Sivan e Harman, 1991; Pe'er e Chet, 1990).

L’attività antagonista dei ceppi di *Trichoderma* nei confronti di *F. graminearum* è stata confermata anche in co-coltura su mais, laddove il patogeno ha significativamente ridotto sia la sua crescita, sia la produzione della micotossina DON. I risultati ottenuti hanno evidenziato un netto miglioramento dell’attività di biocontrollo dell’ibrido A3 rispetto ai ceppi parentali M10 e T22 sia in termini di riduzione della sporulazione del patogeno, sia della produzione della micotossina su granella. L’utilizzo di *Trichoderma* spp. per il controllo di funghi micotossigeni come *Fusarium graminearum* può rappresentare una valida strategia eco-sostenibile. Tian e collaboratori (2020) hanno dimostrato che *Trichoderma* spp. sono in grado di trasformare diverse micotossine (tossina T-2, tossina HT-2, diacetossiscirpenolo, neosolaniolo) nelle rispettive forme glicosilato o in forme meno tossiche (come nel caso dell’acido fusarico convertito in fusarinolo). Gli autori suggeriscono che gli isolati di *Trichoderma* saggiati (appartenenti alle specie *harzianum*, *koningii*, *atroviride*, *asperellum* e *virens*) utilizzavano meccanismi di competizione diretta e antibiosi per inibire i ceppi di *Fusarium*, nonché sistemi di auto-detossificazione per limitare gli effetti tossici causati dai funghi tossigenici. Analogamente, Matarese et al. (2012) hanno esaminato la capacità di tre isolati di *Trichoderma*, precedentemente selezionati per le capacità micoparassitarie e antibiotiche, di inibire la produzione di DON da parte di *Fusarium graminearum* e *F. culmorum* su riso e frumento. La riduzione nei quantitative di DON è stata collegata ad una minore produzione, dal momento che in precedenti studi gli stessi isolati di *Trichoderma* non erano stati in grado di degradare la micotossina (Matarese, 2010). Il coinvolgimento di enzimi chitinolitici durante il micoparassitismo di *Trichoderma* spp. vs. *Fusarium* spp. è stato inoltre dimostrato (Matarese et al., 2012).

La caratterizzazione dell'attività biologica delle colonie ibride selezionate ha previsto infine la valutazione degli effetti di promozione della crescita su piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum* cv San Marzano nano) allevato in camera di crescita e serra tunnel. Nell'ambito della fusione MG (Tab. 2.1), gli ibridi B4 e B5 hanno mostrato una performance migliore in tutti gli indici presi in esame (contenuto di clorofilla, numero di foglie, lunghezza del fusto e delle radici, peso fresco e secco). Inoltre, per alcuni ibridi si ottengono performance migliore sia rispetto alle attività dei parentali applicati singolarmente sia in miscela. Nel complesso gli ibridi di *Trichoderma* prodotti e selezionati in questo progetto di dottorato hanno incrementato il numero di foglie nelle piante trattate rispetto al controllo. Per quanto riguarda la lunghezza del fusto e delle radici, peso fresco e secco i risultati variano in base all'ibrido considerato. Il ceppo ibrido che ha mostrato l'attività biostimolante più pronunciata è risultato essere B5, con incrementi talvolta superiori al 120% rispetto ai ceppi parentali. Infine, quando applicati in miscela, gli ibridi ottenuti da fusione MG hanno incrementato la lunghezza delle radici delle piante trattate, mentre per gli altri indici biometrici sono risultati più efficaci quando applicati singolarmente.

Per quanto riguarda i ceppi ibridi ottenuti dalla fusione TK (Tab. 2.1), in tutti i test condotti gli ibridi ottenuti mostrano capacità migliori ai ceppi parentali applicati singolarmente o in combinazione. In particolare, gli ibridi C1 e C4 hanno fatto riscontrare un incremento significativo del contenuto di clorofilla e della lunghezza di fusto e radici rispetto alle piante trattate con sola acqua o inoculate con i ceppi parentali.

5. CONCLUSIONI

L'approccio utilizzato in questo lavoro ha consentito d produrre ed isolare ceppi di *Trichoderma* derivanti da fusione di protoplasti che hanno dimostrato caratteristiche migliorate rispetto ai relativi parentali. Questa può rappresentare una valida strategia per l'ottenimento di nuovi microrganismi benefici da utilizzare in bioformulati utili per l'agricoltura. L'utilizzo della fusione di protoplasti può ovviare al problema della creazione di OGM, rendendo più facile e snello il processo di registrazione di un nuovo ceppo, anche tenendo conto della recente normativa riguardante la registrazione e l'immissione in commercio dei biostimolanti di origine microbica (Reg. CE n. 1009/2019).

Inoltre, la selezione delle colonie ottenute sulla base dei caratteri fenotipici desiderati consente inoltre di velocizzare l'individuazione degli ibridi più performanti e di avere già a disposizione individui selezionati sulla base dell'attività desiderata (biocontrollo, promozione della crescita, etc..). Questa metodica potrebbe essere estesa anche allo screening di altre caratteristiche di interesse, con l'obiettivo di produrre individui dalle caratteristiche migliorate e adattati alle piante dalle quali sono stati selezionati.

Ad ogni modo, in prospettiva si prevede di effettuare, almeno per gli ibridi di maggiore interesse, il sequenziamento del loro intero genoma, oltre che di quello dei rispettivi parentali. Ciò consentirebbe di comprendere meglio in che modo il logo genoma si sia riassortito rispetto ai parentali e come questo abbai influito sulle rispettive capacità. Allo stato attuale, sono già disponibili i genomi sequenziati dei

parentali M10 e T22 di *T. harzianum* (http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi), oltre a quelli di numerosi altri isolati appartenenti alle specie *asperellum*, *virens*, *atroviride*, etc.

L'utilizzo di microbi benefici in grado di promuovere la fitness delle piante di aiutarle a contrastare gli stress a cui sono sottoposte potrebbe contribuire all'attuazione di sistemi di produzione più ecosotenibili, in grado di promuovere un incremento delle rese ed un miglioramento dei parametri nutrizionali, riducendo allo stesso tempo l'impatto negativo degli agrofarmaci di sintesi sull'ambiente.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbasi, P.A., Miller, S.A., Meulia, T., Hoitink, J.A., Kim, J-M. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. Applied and Environmental Microbiology, 65 (1999), 5421–5426.

Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., Machida, M. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. Mycopathologia,, 162 (2006), 143-153.

Aghcheh, R.K., Kubicek, C.P. Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. Applied Microbiology Biotechnology, 99 (2015), 6167–81.

Bazghaleh, N., Prashar, P., Woo, S., Vandenberg, A. Effects of Lentil Genotype on the Colonization of Beneficial *Trichoderma* Species and Biocontrol of Aphanomyces Root Rot. Microorganisms, 8 (2020), 1290.

Benhamou, N., Chet, I. Parasitism of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. Phytopathology, 86 (1996), 405- 416.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Journal of Microbiology, 7 (2004), 249-260.

Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., and Smalla, K. . Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. FEMS Microbiology Ecology, 93 (2017).

Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., Bianciotto, V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. Frontiers in Microbiology., 6 (2016), 1559.

Bertin, C., Yang, X.H., Weston, L .A . The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant Soil, 256 (2003), 67-83.

Bonfante, P., Genre, A. Interactions in Mycorrhizal Symbiosis. Nature Communication, 1 (2010), 1–11.

Bononi, L., Chiaramonte, J.B., Pansa, C.C. Phosphorus_ solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. Scientific Report, 10 (2020)**,** 2858.

Brown, D.W., Dyer, R.B., McCormick, S.P., Kendra, D.F., Plattner R.D. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. Fungal Genetics and Biology, 41(4) (2004),454-462.

Brunner, K., Peterbauer, C.K., Mach, R.L., Lorito, M., Zeilinger, S., Kubicek, C.P. The nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. Current Genetics, 43 (2003a), 289–295C.

Carillo, P., Woo, S.L., Comite, E., El-nakhel, C., Rouphael, Y., Fusco, G.M., Borzacchiello, A., Lanzuise, S., Vinale, F. Application of *Trichoderma harzianum*, 6-Pentyl-α-Pyrone and Plant Biopolymer Formulations Modulate Plant Metabolism and Fruit Quality of Plum Tomatoes. Plants, 9 (2020), 771.

Chet, I., Benhamou, N., Haran, S. in *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 2 (eds Kubicek, C. P. & Harman, G. E.) 153–172 (Taylor and Francis, London, 1998).

Chet, I., Inbar, J. Biological control of fungal pathogens. Apply Biochemical Biotechnology, 48(1994), 37-43.

Coyne, J.A. Genetics and speciation. Nature, 355(1992), 511-515.

Cutler, H.G., Cox, R.H., Crumley, F.G., Cole, P.D. 6-Pentyl-a-pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. Agricultural and Biological Chemistry,50 (1986), 2943-5.

Dakora, F.D., Matiru, V.N., Kanu, A.S. Rhizosphere ecology of lumichrome and riboflavin, two bacterial signal molecules eliciting developmental changes in plants. Frontiers in Plant Science, 6 (2015), 700.

De la Cruz-Pérez, D., Ortiz-García, C.F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J.A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S.. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad, 86 (4) (2015), 947-961.

Demain, A.L., Fang, A. The natural functions of secondary metabolites. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 69 (2000), pp. 1-39.

Domínguez-Núñez, J. A., Albanesi, A.S. Ectomycorrhizal fungi as biofertilizers in forestry. Biostimulants in Plant Science, (2019) 10.5772.

Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P., Haas, H. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacCmediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. Eukaryotic Cell, 3 (2004), 561-563.

El Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A., Molan, Y.Y. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato Fusarium Wilt. Plant Pathology Journal, 31(1) (2015), 50-60.

EL-Bondkly, A.M. Gene transfer between different *Trichoderma* species and *Aspergillus niger* through intergeneric protoplast fusion to convert ground rice straw to citric acid and cellulases. Applied Biochemistry and Biotechnology, 135 (2006), 117- 132.

EL-Bondkly, A.M., Aboshosha, A.M.,. Radwan, N.H, Dora, S.A. Successive construction of β-glucosidase hyperproducers of *Trichoderma harzianum* using microbial biotechnology techniques. Journal of Microbial & Biochemical Technology, 2 (2010), 70- 73.

El-Bondkly, A.M., Talkhan, F.N. Intra-strain crossing in *Trichoderma harzianum* via protoplast fusion to enhance chitinase productivity and biocontrol activity. Arab journal of biotechnology, 10 (2007), 233–40

El-Komy, M.H., Saleh, A.A., El-Ranthodi, A., Molan, Y.Y. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato Fusarium wilt. Plant Pathology Journal, 31(2015), 50-60.

Etalo, D.W., Jeon, J. S., Raaijmakers, J. M. Modulation of plant chemistry by beneficial root microbiota. Natural Product Reports, 35 (2018), 398-409.

Fiorentino, N., Ventorino, V., Woo, S.L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., et al.. *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield and nutritional quality of leafy vegetables. Front. Plant Science, 9 (2018), 74.

Fiorentino, N., Ventorino, V., Woo, S.L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G., et al. *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. Frontiers in Plant. Science, 9 (2018), 743.

Fricker, M.D., Boddy, L, Bebber, D. Network organisation of filamentous fungi R.J. Howard, N.A.R. Gow (Eds.), Biology of the Fungal Cell, (2007), 309-330.

Garnica-vergara, A., Barrera-ortiz, S., Mu, E., Raya-gonz, J. The Volatile 6-Pentyl-2 H -Pyran-2-One from *Trichoderma atroviride* Regulates *Arabidopsis thaliana* Root Morphogenesis via Auxin Signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 Functioning. New Phytologist., 209 (2015), 1496–1512.

Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., Barker, D.G. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. Plant Cell, 17 (2005), 3489-3499.

Genre, A., Russo, G. Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant−microbe interactions? Frontiers in Plant. Science, 7 (2016), 96.

Ghisalberti, E.L., Rowland, C.Y. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. Journal of Natural Products, 56 (1993), 1799-804.

Glass, N.L., Jacobson, D.J., Shiu, P.K.T. The Genetics of Hyphal Fusion and Vegetative Incompatibility in Filamentous Ascomycete Fungi. Annual Review of Genetics, 34 (2000), 165-186.

Gracheck, S.J., Emert, G.H. Protoplast formation and fusion using *Trichoderma reesei* mutants. Developments in industrial microbiology, 25 (1984), 581-587.

Gurumurthy, S., Senjam Jinus Singh, P., Karthik, R., Anjan Kumar, S. Rapd analysis of *Trichoderma spp.* isolated from chickpea fields of uttar Pradesh. International Journal of Advanced Research, 1 (2013), 335-340.

Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M. I., Delaye, L., Herrera-Estrella, A., Olmedo-Monfil, V. Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. Medical Genetics**,** 18 (2017), 16.

Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M.D., Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A. *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. Phytopathology, 109 (2019), 6–16.

Hammer, J.E., Holden, D.W. Linking approaches in the study of fungal pathogenesis: a commentary. Fungal Genetics and Biology, 21 (1997), 11-16.

Hanson, L.E., Howell, C.R. Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. Mycological Research, 106 (2002), 321-328.

Harman, G.E. Changes in perception derived from research on *Trichoderma harzianum* T–22 (Myths and dogmas of biocontrol). The Plant Disease, 84 (2000), 377-393.

Harman, G.E. The development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. Journal of Plant Nutrition, 15 (1992), 835–843.

Harman, G.E., Doni, F., Khadka, R.B., Uphoff, N. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. Journal of Applied Microbiology, (2019), 130, 529-546.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2 (2004),43–56.

Harman, G.E., Taylor, A.G., Stasz, T.E. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. Plant Disease, 73(8) (1989), 631-637.

Hassan, M.M. Influence of protoplast fusion between two *Trichoderma spp.* on extracellular enzymes production and antagonistic activity. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 28(6) (2014), 1014–23.

Hassani, M.A., Durán, P., Hacquard, S. Microbial interactions within the plant holobiont. Microbiome, 6 (2018), 58.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158 (2012), 17-25.

Hohn, T.M., Desjardins, A.E., McCormick, S.P. The Tri4 gene of *Fusarium sporotrichiodes* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. Molecular Genetics and Genomics, 248(1995), 95-102.

Inbar, J., Menendez, A., Chet, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. Soil Biology & Biochemistry, 28 (1996), 757–763.

Jacobson, D.J., Beurkens, K., Klomparens, K.L.. Microscopic and ultrastructural examination of vegetative incompatibility in partial diploids heterozygous at het loci in *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology, 23 (1998), 45-56.

Jin, F., Hara, S., Sato, A., Koyama, Y. Discovery and analysis of an active long terminal repeat-retrotransposable element in *Aspergillus oryzae*. The Journal of General and Applied Microbiology. (2014).

Jones, C., Kortenkamp, A. RAPD library fingerprinting of bacterial and human DNA: applications in mutation detection. Teratogenic Carcinogenic Mutagenic, 20 (2000), 49-63.

Jones, J., Dangl, J. The plant immune system. Nature, 444 (2006),323–29.

Kogan, M. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. Annual Review of Entomology, 43 (1998), 243–70.

Kouadio, J.H., Dano, S.D., Moukha, S., Mobio, T.A., Creppy, E.E. Effects of combinations of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. Toxicon 49 (2007), 306–317.

Kullnig, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. Mycological Research, 106 (2002), 757–767.

Kumar, V., Shahid, M., Singh, A., Srivastava, M., Biswas, S.K. RAPD analysis of *Trichoderma longibrachiatum* isolated from pigeon pea fields of Uttar Pradesh. Indian Journal of Agricultural Biochemistry, 24(1) (2011), 80-82.

Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R. Probiotics and Plant Health. Springer, Singapore (2017), 497-506,

La Spada, F., Stracquadanio, C., Riolo, M., Pane, A., Cacciola, S. O. *Trichoderma* counteracts the challenge of *Phytophthora nicotianae* infections on tomato by modulating plant defense mechanisms and the expression of crinkler, necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1, and cellulose-binding elicitor lectin pathogenic effectors. Frontiers in plant science, 11 (2020), 583539.

Latorre, B.A., Lillo, C., Rioja, M.E. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. Ciencia e Investigación Agraria, 28 (2001), 61-66.

Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., Bennett, J.W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma species* mediate plant growth. Fungal Biology and Biotechnology, (2016), 1–14.

Leslie, J.F., Zeller, K.A. Heterokaryon incompatibility in fungi: more than just another way to die. Frontiers in Genetics, 75 (1996), 415-424.

Lind, H., Jonsson, H., Schnürer, J. Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. International Journal of Food Microbiology, 98(2) (2005), 157-165.

Lombardi, N., Salzano, A.M., Troise, A.D., Scaloni, A., Vitaglione, P., Vinale, F., Lanzuise, S. Effect of *Trichoderma* bioactive metabolite treatments on the production, quality and protein profile of strawberry fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68 (2020), 7246–7258.

López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., Herrera-Estrella, A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. Scientia Horticulturae, 196 (2015), 109-123.

Lorito, M., Cervone, F. Lotta Biologica. Enciclopedia del Novecento, Treccani (2004).

Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., Kubicek, C.P. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. Journal of Bacteriology, 178 (1996), 6382-6385.

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

Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A., Woo, S.L., Harman, G.E. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-beta-glucosidase and an N-acetyl-beta-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 84 (1994), 398–405.

Lorito, M., Woo, S.L., D'Ambrosio, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Kubicek, C.P., Scala, F. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. Molecular Plant–Microbe Interaction, 9 (1996), 206-213.

Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E., Monte, E. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. Annual Review of Phytopathology, 48 (2010), 395–417.

Lu, Z.X., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., Jansson, J.K. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen–plant interactions using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. Applied and Environmental Microbiology, 70 (2004), 3073–3081.

Marra, R., Lombardi, N., D'Errico, G., Troisi, J., Scala, G., Vinale, F., Woo, S.L., Bonanomi, G., Lorito, M. Application of *Trichoderma* strains and metabolites enhances soybean productivity and nutrient content agricultural and environmental chemistry application of *Trichoderma* strains and metabolites enhances soybean productivity and nutrient content. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67 (2019), 1814–1822.

Marro, N., Caccia, M., Doucet, M.E., Cabello, M., Becerra, A., Lax P. Mycorrhizas reduce tomato root penetration by false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Applied Soil Ecology, 124 (2018), 262–265.

Martínez-Medina, A., Del Mar Alguacil, M., Pascual, J. A., Van Wees, S.C.M. . Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. Journal of Chemical Ecology, 40 (2014), 804-815.

Martinez-Medina, A., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J. Airborne signals by *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. Plant, Cell and Environment, 2017.

Matarese, F. 2010: Biocontrol of *Fusarium* head blight: molecular interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. PhD Thesis in Science of Crop Production, Faculty of Agriculture, University of Pisa, Italy.

Matarese, F., Sarrocco, S., Gruber, S., Seidl-Seiboth, V., Vannacci, G. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. Microbiology, 158 (2012), 98-106.

Meding, S.M., Zasoski, R.J. Hyphal-mediated transfer of nitrate, arsenic, cesium, rubidium, and strontium between arbuscular mycorrhizal forbs and grasses from a California oak woodland. Soil Biology & Biochemistry, 40 (2008), 126–134.

Migheli, Q., Whipps, J.M., Budge, S.P., Lynch, J.M., Production of inter and intra strain hybrids of *Trichoderma spp*. by protoplast fusion and evaluation of their biocontrol activity against soil-borne and foliar pathogens. Journal of Phytopathology, 143 (1995), 91-97.

Mikkelsen, B.L., Rosendahl, S., Jakobsen, I. Underground resource allocation between individual networks of mycorrhizal fungi. New Phytologist, 180 (2008), 890–898.

Mohamed, H.A.A., Haggag, W.M. Mutagenesis and inter-specific protoplast fusion between *Trichoderma koningii* and *Trichoderma reesei* for biocontrol improvement. American Journal of Scientific and Industrial Research, 1(3) (2010), 504-515.

Mukherjee, M., Sengupta, S. Mutagenesis of protoplasts and regeneration of mycelium in the mushroom *Volvariella volvacea*. Applied Microbiology and Biotechnology, 52 (1986), 1412–1414.

Munimbazi, C., Bullerman, L.B. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. Journal of Applied Microbiology, 84(6) (1998), 959-968.

Muralidhar, R., Panda, T. Fungal protoplast fusion - a revisit. Bioprocess Engineering, 22 (2000), 429–431.

Narayanasamy, P., Dhanya, N., Saravanakumar, M. RAPD analysis of *Trichoderma viride* and its antagonistic effect with. Journal of Herbal Science and Technology, (2009).

Naseby, D.C., Pascual, J.A., Lync, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Phytium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. Journal of Applied Microbiology, 88 (2000), 161-169.

Nerìn, C., Aznar, M., Carrizo, D. Food contamination during food process. Trends in Food Science & Technology, 48 (2016), 63-68.

Neumann, N.K., Stoppacher, N., Zeilinger, S., Degenkolb, T., Bruckner, H., Schuhmacher, R. The peptaibiotics database–a comprehensive online resource. Chemistry & Biodiversity, 12 (2015), 743-751.

Niu, X.G., Song, L.C., Xiao, Y.N., Ge, W.D. Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress. Frontiers in Microbiology, 8 (2017), 2580.

Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., Iwashita, K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. Applied and Environmental Microbiology, 72 (2006), 3448-3457.

Parekh, S., Vinci, V.A., Strobel, R.J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. Applied Microbiology and Biotechnology, 54 (2000), 287-301.

Pe'er, S., Chet, I. *Trichoderma* protoplast fusion: a tool for improving biocontrol agents. Canadian Journal of Microbiology, 36 (1990), 6-9.

Pocurull, M., Fullana, A.M., Ferro, M., Valero, P., Escudero, N., Saus, E., Gabaldón, T., Sorribas, F.J. Commercial Formulates of *Trichoderma* induce systemic plant resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato and the effect is additive to that of the mi-1.2 resistance gene. Frontiers in Microbiology, 10 (2020), 1–10.

Prabavathy, V.R., Mathivanan, N., Lalithakumari, D.. Strain improvement in *Trichoderma* by protoplast fusion for multienzyme production and enhanced biocontrol potential. Abstract of the nsrtbbbfc for advanced studies in botany, University of Madras, Chennai, India. (2004), 45–46.

Priyasundari, S.A. Novel technique for strain improvement of *Trichoderma reesei*. M.Sc. dissertation. Chennai, India: University of Madras, (2002).

Read, N.D., Fleißner, A., Roca, M.G., Glass, N.L. Hyphal fusion. K.A. Borkovich, D. Ebolle (Eds.), Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi, American Society of Microbiology, (2010), 260-273.

Reymond, P., Fevne, M. Researches on penicillin productivity of *Penicillium chrysogenum*, protoplast fusion of their hybrids and unforced selection. Enzyme and Microbial Technology, 8 (1986), 41-44.

Rifai, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Progress, 116 (1969), 1-56.

Rokem, J.S. Industrial mycology. In Biotechnology, ed. HW Doelle, EJ DaSilva, 5.10, (2010). Oxford, UK: Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).

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

Saxena, A., Mishra, S., Ray, S., Raghuwanshi, R., Singh, H.B. Differential reprogramming of defense network in *Capsicum annum L.* plants against *Colletotrichum truncatum* infection by phyllospheric and rhizospheric *Trichoderma* strains. Journal of Plant Growth Regulation, 39 (2020), 751–763.

Shafique, S., Bajwa, R., Shafique, S. Strain improvement in *Trichoderma viride* through mutation for overexpression of cellulase and characterization of mutants using random amplified polymorphic DNA (RAPD). African Journal of Biotechnology, 10 (2011), 19590-19597.

Shanmugam, V., Sharma, V.. Genetic relatedness of *Trichoderma* isolates antagonistic against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* inflicting carnation wilt. Folia microbiologica, 53(2) (2008), 130-138.

Sharma, K., Mishira, A.K., Misra, R.S. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents. Journal of Phytopathology, 157 (2009), 51–56.

Shinmyo, A., Okada, H. Protoplast formation from conidia of *T. reesei* by cell wall lytic enzymes of a strain of *T. viride*. Journal of Fermentation Technology, 61 (1983), 409-411.

Shoresh, M., Harman, G. E. The Molecular Basis of Shoot Responses of Maize Seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 Inoculation of the Root: A Proteomic Approach. Plant Physiology, 147 (2008), 2147–2163.

Shoresh, M., Harman, G.E., Mastouri, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual Review of Phytopathology, 48 (2010), 21–43.

Singh, U.B., Malviya, D., Wasiullah, Singh, S., Pradhan, J.K., Singh, B.P., Roy, M., Imram, M., Pathak, N., Baisyal, B.M., et al. Bio-protective microbial agents from rhizosphere eco-systems trigger plant defense responses provide protection against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa L.*). Microbiological Research, 192 (2016), 300–312.

Sivan, A., Chet, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. Phytopathology, 79(1989), 198–203.

Sivan, A., Harman, G.E. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. Journal of General Microbiology, 137 (1991), 23–29.

Skoneczny, D., Oskiera, M., Szczech, M., Bartoszewski, G. Genetic diversity of *Trichoderma atroviride* strains collected in Poland and identification of loci useful in detection of within-species diversity. Folia Microbiologica, 60 (2015), 297-307.

Smith, S.E., D.J. Read Mycorrhizal Symbiosis (3rd ed.), Academic Press, London (2008).

Spence, C., Bais, H. Role of plant growth regulators as chemical signals in plant-microbe interactions: A double edged sword. Current Opinion in Plant Biology, 27 (2015), 52-58.

St-Arnaud, M., Vujanovic, V., Hamel, C., Plenchette, C. Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. Mycorrhizae in Crop Production: Applying Knowledge Binghampton, New York: Haworth Press, (2007), 67–122.

Stasz, T.E., Harman, G.E., Weeden, N.F. Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. Mycologia, 80 (1988), 141–150.

Toyama, H., Shinmyo, A., Okada, H. Protoplast formation from conidia of *T. reesei* by cell wall lytic enzymes of a strain of *T. viride*. Journal of Fermentation Technology, 61 (1983), 409-411.

Trinci, A.P.J., Wiebe, M.J., Robson, G.D. The Mycelium as an Integrated Entity. In: Wessels JGH and Meinhardt F (eds) The Mycota, Springer-Verlag, Ber, Vol. I. (1994), 175-194.

Vinale, F., Flematti, G., Sivasithamparam, K., et al. Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. Journal of Natural Products, 72 (2009), 2032-5.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry, 40 (2008), 1-10.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, EL., Ruocco, M., Woo, S., Lorito, M., *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. Natural Product Communications, 7 (2012), 1545–1550.

Vitale, A., Cirvilleri, G., Castello, I., Aiello, D., Polizzi, G. Evaluation of *Trichoderma harzianum* strain T22 as biological control agent of *Calonectria pauciramosa*. BioControl 57 (2012), 687–696.

Vyas, S.C., Vyas, S. Integrated control of dry root of soybean. Modern fungicides and antifungal compounds. Lyr, Russell and Sisler (eds). Intercept, Andover, (1995) 565-572.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18 (1990), 6531-6535.

Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale A., Lanzuise, S., Manganiello, G., Lorito, M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. The Open Mycology Journal, 8 (2014), 71–126.

Yamada, R., Yoshie, T., Wakai, S. et al. *Aspergillus oryzae*-based cell factory for direct kojic acid production from cellulose. Microbial Cell Factories, 13 (2014), 71.

Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, 65 (1999), 1061–70.

Yoon, J., Maruyama, Ji. & Kitamoto, K. Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. Applied Microbiology and Biotechnology, 89(2011), 747–759.

Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S.L., Mach, R.L., Fekete, C., Lorito, M., Kubicek, C.P. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genetics and Biology, 26 (1999), 131–140.

Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P.K. Secondary metabolism in *Trichoderma*-chemistry meets genomics. Fungal Biology Reviews, 30 (2016), 74–90.

Zhang, K., and Guo, L.-Q. Breeding cold tolerance strain by chemical mutagenesis in *Volvariella volvacea*. Scientia Horticulturae, 130 (2011), 18-24.

Zhu, Z., Wu, X., Lv, B., Wu, G., Wang, J., Jiang, W., Li, P., He, J., Chen, J., Chen, M., Bao, D., Zhang, J., Tan, Q., & Tang, X.. A new approach for breeding low-temperature-resistant *Volvariella volvacea* strains: genome shuffling in edible fungi. Biotechnology and Applied Biochemistry, 63(2016), 605–615.