

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
NAPOLI
“ FEDERICO II ”**

Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale

Sezione Patologia Vegetale

**Corso di Dottorato di Ricerca
XV ciclo**

**Attività antimicrobica di *Sepedonium
chrysospermum*: un nuovo agente di lotta
biologica in patologia vegetale**

**Tutore
Prof. Matteo Lorito**

**Dottorando
Dott. Francesco Vinale**

**Co-tutore
Prof. Giovanni Del Sorbo**

2. MATERIALI E METODI	49
2.1 Ceppi utilizzati e condizioni di crescita	49
2.2 Saggi di biocontrollo <i>in vitro</i>	50
2.3 Saggi di biocontrollo <i>in vivo</i>	52
2.3.1 Saggio <i>in vivo</i> nei confronti di <i>R. solani</i> (patogeno terricolo)	52
2.3.2 Saggio <i>in vivo</i> nei confronti di <i>B. cinerea</i> (patogeno fogliare)	54
2.4 Produzione di filtrati culturali attivi di <i>S. chrysospermum</i> (ceppo 704)	56
2.5 Isolamento e caratterizzazione di metaboliti bioattivi	58
2.5.1 Isolamento e caratterizzazione della 2,4 diidrossi – 3,6-dimetilbenzaldeide	58
2.5.2 Isolamento e caratterizzazione della anidrosepedonina	61
2.5.3 Isolamento di peptaiboli	62
2.5.4 Isolamento di enzimi coinvolti nei meccanismi di biocontrollo	64
2.5.4.1 Purificazione di enzimi secreti da <i>S. chrysospermum</i>	64

2.5.4.2 Saggi di attività enzimatica di chitinasi e glucanasi secrete da <i>S. chrysospermum</i>	64
2.6 Saggi di attività biologica dei singoli composti e dei filtrati colturali	68
2.6.1 Saggi di antibiosi	68
2.6.2 Saggi di fitotossicità	70
2.7 Sintesi chimica della 2,4-diidrossi-3,6- dimetilbenzaldeide	71
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	73
3.1 Saggi di attività <i>in vitro</i>	73
3.2 Saggi di attività <i>in vivo</i>	76
3.2.1 Saggio <i>in vivo</i> nei confronti di <i>R. solani</i> (patogeno terricolo)	76
3.2.2 Saggio <i>in vivo</i> nei confronti di <i>B. cinerea</i> (patogeno fogliare)	85
3.3 Studio dei meccanismi di biocontrollo di <i>Sepedonium chrysospermum</i>	89
3.3.1 Isolamento, purificazione e caratterizzazione chimica della 2,4 diidrossi – 3,6 dimetilbenzaldeide	89

3.3.2 Caratterizzazione biologica della	
2,4 diidrossi – 3,6 dimetilbenzaldeide	103
3.3.3 Isolamento e caratterizzazione chimica e biologica	
della anidrosepedonina	113
3.3.4 Isolamento e caratterizzazione chimica e	
biologica di peptaiboli	117
3.3.5 Isolamento di enzimi coinvolti nei meccanismi di	
biocontrollo	122
3.4 Sintesi chimica della 2,4-diidrossi-3,6-	
dimetilbenzaldeide	132
4. CONCLUSIONI	135
5. BIBLIOGRAFIA	138

1. INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio l'attività agricola nei paesi industrializzati ha subito rilevanti mutamenti. Il sistema produttivo impiegato, fortemente "intensivo", ha di fatto comportato uno spreco di risorse ambientali ed energetiche, del tutto in contrasto ad esempio con le necessità dei Paesi in via di sviluppo.

L'insostenibilità dell'utilizzo di prodotti chimici in agricoltura è dimostrato dall'impressionante consumo di concimi sintetici che, nell'arco di un quarantennio, è aumentato nel mondo di circa otto volte, passando da 10 a 84 milioni di tonnellate annue (Brown, 1980).

Anche l'impiego agricolo di antiparassitari è cresciuto vertiginosamente negli ultimi cinquanta anni, con la comparsa sul mercato di una ampia gamma di prodotti organici di sintesi estremamente attivi e pericolosi per la salute umana e per l'ambiente.

Tutto ciò ha contribuito alla diffusione nell'opinione pubblica di una crescente coscienza "ambientalista" rivolta ad una progressiva "sostenibilità" del processo produttivo agricolo, basato su una riduzione sostanziale dell'impatto sull'agroecosistema dei metodi di produzione.

Una spinta significativa in questa direzione è venuta in primo luogo dai consumatori e dai movimenti d'opinione, ma anche da quella parte dell'imprenditoria agricola più sensibile alle problematiche ambientali.

Di fatto, nel mondo occidentale l'andamento dei consumi di generi

alimentari, strettamente correlato al livello di sviluppo socio-economico di una popolazione, ha subito negli ultimi anni una inversione di tendenza. Se fino a poco tempo fa il consumatore si preoccupava esclusivamente all'acquisizione di beni alimentari, curando al limite l'aspetto edonistico del prodotto, ora rivolge una certa attenzione anche alle caratteristiche nutrizionali ed igienico-sanitarie dei cibi.

L'interesse verso prodotti alimentari "sani" si scontra però con il massiccio utilizzo di composti chimici di sintesi tipico di un'agricoltura moderna, e si riflette in definitiva nella realizzazione di un'agricoltura più sostenibile. A questo proposito anche la ricerca nel settore agroalimentare si sta indirizzando verso studi che hanno per obiettivo un più razionale uso dei composti chimici e delle risorse produttive.

La tendenza verso un approccio "ecompatibile" in agricoltura sembra essere sempre più sentita, anche perché le finalità e gli obiettivi tipici dell'agricoltura nei Paesi sviluppati non rispecchiano più le esigenze della collettività. Ciò interessa in particolar modo la produzione agricola, il più delle volte eccedente rispetto alle reali esigenze della popolazione, il forte calo degli occupati nel settore, con fenomeni di esodo rurale, la diffusione di una politica di salvaguardia ambientale, nonché il rinnovato interesse dei consumatori per gli aspetti qualitativi, ed in particolare salutistici, dei cibi.

Sulla scala dei processi ecologici non è riportabile una logica economica particolaristica che vede nella chimica il miglior metodo di risoluzione tecnica dei problemi (Sacchetti, 1997).

1.1 Lotta chimica in agricoltura

La difesa delle colture da agenti dannosi ha assunto una crescente importanza sin dal dopoguerra, dal momento che tali avversità, rappresentate fundamentalmente dagli attacchi parassitari, sono causa di forti perdite alimentari. A tale scopo l'impiego di prodotti chimici di sintesi, i fitofarmaci, ha garantito una sostanziale riduzione del decadimento quantitativo e qualitativo dei prodotti agricoli.

Nella pratica fitosanitaria si sono perciò affermati i criteri della cosiddetta *lotta chimica "a calendario"*, che consiste nell'intervenire a date prefissate durante tutto il ciclo produttivo con interventi chimici volti ad impedire il potenziale sviluppo di un qualsiasi agente ritenuto dannoso. Tale modalità di controllo delle fitopatie ha influenzato per lungo tempo la ricerca in questo settore, non stimolando lo studio di metodologie alternative (Viggiani, 1994). Nel quadro della razionalizzazione della difesa fitosanitaria, la lotta "a calendario" è stata gradualmente sostituita dalla "lotta guidata", in base alla quale gli interventi vengono eseguiti dopo aver accertato con opportuni rilievi il reale rischio di danno da parte delle avversità.

I vantaggi derivanti dall'impiego di prodotti chimici in campo agricolo si riassumono, in definitiva, nella disponibilità di composti che assicurano un risultato soddisfacente a breve termine, nonché nella relativa semplicità di applicazione. Queste considerazioni giustificano in parte l'enorme diffusione dei pesticidi in un tempo relativamente breve; basti pensare che la farmacopea agricola, che

contava una cinquantina di prodotti nell'anteguerra, annovera oggi oltre 500 prodotti attivi con più di 55.000 formulati commerciali (Viggiani, 1994).

Tuttavia numerosi effetti indesiderabili di tipo ecologico, tossicologico ed economico sono stati correlati all'uso dei prodotti chimici, tra cui:

- a) la necessità di ripetere gli interventi, in molti casi dopo pochissimi giorni;
- b) l'alto costo legato all'insorgere della resistenza da parte degli organismi da controllare;
- c) la rapida comparsa di nuove specie dannose;
- d) la soppressione dell' antagonismo naturale tra gli organismi in atto nelle colture;
- e) i rischi igienico-sanitari e ambientali legati alla presenza dei residui dei fitofarmaci;
- t) l'inefficacia dei pesticidi chimici contro alcune fitopatie, come ad esempio alcune malattie vascolari causate da funghi.

1.1.1 I fitofarmaci

I fitofarmaci sono agenti chimici immessi nell'ambiente per eliminare o in subordine danneggiare le forme di vita dannose per l'agricoltura e quindi nocive per l'ambiente, o capaci di trasmettere delle gravi patologie all'uomo e agli animali di interesse zootecnico (Klaassen *et al.*, 1986 - Marquis, 1986).

In Italia e in alcuni altri Paesi europei il termine di fitofarmaci viene

impiegato in maniera più ristretta, riferendosi agli antiparassitari impiegati in agricoltura per aumentare le rese di produzione o per preservare i prodotti durante le fasi dell'immagazzinamento e della distribuzione commerciale (Foschi *et al.*, 1985).

A seconda degli organismi bersaglio, i fitofarmaci vengono distinti in erbicidi, fungicidi, insetticidi, rodenticidi, etc. Nell'ambito di ciascun gruppo di fitofarmaci è possibile un'ulteriore classificazione in base alla natura chimica dei composti (Tabella 1.1).

Insetticidi e acaricidi	cloroorganici organofosforici carbammati
Fungicidi	ditiocarbammati e miscele composti inorganici (rame, zolfo etc.) organostannici
Erbicidi	triazine ed affini dinitrofenoli clorofenossicarbossilici
Rodenticidi	cumarinici inorganici

Tabella 1.1. Principali classi di fitofarmaci.

I fitofarmaci vengono introdotti nell'ambiente con trattamenti agricoli, utilizzazioni domestiche, attività industriali, sotto forma di gas, liquidi o polveri solubili.

Lo sviluppo e la progettazione di nuovi principi attivi si sono susseguiti con grande rapidità, talvolta prima ancora che fossero ben evidenziate le conseguenze pratiche derivanti dall'impiego di un determinato composto.

Recenti studi hanno evidenziato che molti fitofarmaci possiedono una tossicità elevata anche nei confronti dell'organismo umano, agendo con il medesimo meccanismo di azione osservato per i loro "organismi bersaglio". I rischi derivanti dall'impiego di fitofarmaci vanno considerati sotto diversi aspetti, dalla loro produzione industriale, all'applicazione in campo, fino al consumo dei prodotti agricoli che conservano tracce degli stessi. Il pericolo derivante della presenza di residui di fitofarmaci nei prodotti agricoli primari destinati all'alimentazione o alla trasformazione assume oggi l'aspetto di una vera e propria malattia sociale. L'assimilazione di fitofarmaci attraverso la nostra dieta (il fenomeno del "*carry over*") è raramente correlata in maniera diretta a fenomeni di intossicazione acuta, mentre sempre più frequentemente studi epidemiologici evidenziano correlazioni con patologie di tipo cronico.

Il livello di rischio è ovviamente maggiore per quei principi attivi che presentano una più elevata stabilità chimica e quindi un più lento degrado biologico. Spesso, inoltre, il fitofarmaco non rimane inalterato dal punto di vista chimico ma, a seguito dell'azione metabolica della pianta, viene degradato in composti che possono risultare anche più tossici del composto originario.

Altro fattore di rischio da considerare è l'eventuale presenza di

impurezze, talora tossiche, che si formano durante le procedure di sintesi dei principi attivi o a seguito delle interazioni degli ingredienti che costituiscono la formulazione commerciale del preparato (Camoni e Di Muccio, 1988).

In quest'ottica il tentativo di applicare interventi eco-compatibili in agricoltura intende minimizzare il contributo degli antiparassitari ed enfatizzare, al contrario, l'impiego di metodiche alternative impostate su sistemi razionali, di cui sia possibile valutare a pieno le conseguenze sull'agro-ecosistema.

1.2 Agricoltura biologica

La grande attenzione dei consumatori verso gli aspetti salutistici e qualitativi degli alimenti da un lato, e il rispetto dell'ambiente dall'altro, hanno posto le premesse per lo sviluppo dell'agricoltura biologica.

Un prodotto agricolo si definisce "biologico" quando per la sua produzione non sono impiegati elementi chimici di sintesi, bensì soltanto concimi ed antiparassitari naturali e si ricorre a metodi colturali naturali basati sul riciclaggio delle materie organiche naturali e sulla rotazione delle colture.

Le ragioni della crescita del settore si riconducono ad un complesso di implicazioni culturali, sociali ed economiche. L'esigenza di alimentarsi con prodotti sani e di qualità investe il consumatore del ruolo di decisore fondamentale del processo di acquisto; tuttavia, le produzioni biologiche possono rappresentare un'opportunità economica anche per gli altri attori della filiera: per gli agricoltori e le imprese di trasformazione, che possono ottenere vantaggi competitivi dalla diversificazione delle attività originarie; per la grande distribuzione, che può svolgere un'azione di avvicinamento del grande pubblico al biologico.

L'Italia per molti anni è rimasta indietro rispetto ai suoi concorrenti europei ma negli ultimi anni si è adeguata al punto tale da divenire la prima nazione europea per estensione di superfici destinate al biologico. Dagli ultimi dati, risalenti al 2000, risulta che la superficie interessata (in conversione o in biologico) è pari a 1.040.377 ha e che gli operatori del settore sono 54.004 (fonte: Servizi del Ministero delle politiche agricole e forestali). In particolare, le regioni meridionali e

insulari sono più avanti del resto del Paese dal punto di vista delle estensioni e del numero di aziende, mentre nelle regioni del Centro-Nord prevalgono i consumi.

L'agricoltura biologica, tuttavia, deve ancora superare alcuni gravi problemi; la frammentarietà dell'offerta, e quindi la difficoltà di approvvigionamento, e la distribuzione non capillare di tali prodotti, infatti, comportano un aumento dei costi in ogni anello della filiera produttiva e, di conseguenza, del prezzo finale restringendo la fetta dei potenziali acquirenti. La soluzione di questo problema richiede chiarezza, approfondimenti operativi, nonché tecnico-scientifici, in grado di sostenere ulteriormente il settore anche in vista di un miglioramento degli aspetti normativi.

La difesa fitosanitaria in agricoltura biologica rappresenta uno degli elementi più delicati anche in considerazione del fatto che i mezzi tecnici a disposizione sono relativamente esigui e non garantiscono la stessa efficacia dei prodotti chimici normalmente impiegati in agricoltura convenzionale.

L'agricoltura biologica non è in definitiva una moda recente, ma una pratica tradizionale che ha permesso la sopravvivenza e lo sviluppo dell'umanità per decine di millenni; con essa si recuperano e si adottano pratiche agricole tradizionali che mantengono ancora la loro validità, ma si fa anche largo uso di prodotti e metodiche che le conoscenze acquisite hanno messo a nostra disposizione.

1.2.1 Tecniche di produzione biologica

La comunità economica europea nel giugno del 1991 con il reg. N.2092/91 approva e riconosce il metodo di produzione biologico dei prodotti agricoli dettando negli allegati le norme di produzione, individuando il sistema di controllo e stabilendo le modalità per l'etichettatura dei prodotti.

Questo sistema di coltivazione è basato sull'interazione dinamica tra il suolo, le piante, gli animali, l'uomo, l'ecosistema e l'ambiente. Tale sistema punta al potenziamento dei cicli naturali e vuole fare uso principalmente dalle risorse naturali disponibili a livello locale.

La produzione e la trasformazione biologica si basano su una serie di principi ispiratori che possono essere così riassunti:

- produrre cibo di alta qualità e in quantità sufficiente;
- interagire in maniera costruttiva e vitale con i cicli naturali;
- considerare a un livello più ampio l'impatto sociale ed ecologico della produzione biologica e dei sistemi di trasformazione;
- stimolare e accrescere i cicli biologici all'interno del sistema agricolo, coinvolgendo i microrganismi, il suolo, la flora e la fauna, le piante e gli animali;
- sviluppare un ecosistema acquatico vitale e sostenibile;
- mantenere e aumentare nel lungo termine la fertilità del suolo;
- mantenere la diversità genetica del sistema produttivo incluse le piante spontanee e gli habitat naturali;
- promuovere un impiego salubre e appropriato dell'acqua, delle risorse acquatiche e di tutte le forme di vita ivi comprese;
- impiegare risorse rinnovabili, dove possibile, in sistemi

produttivi organizzati a livello locale;

- creare un equilibrio armonico tra la produzione vegetale e animale;
- garantire a tutti gli animali allevati condizioni di vita compatibili con le loro esigenze etologiche;
- minimizzare tutte le forme di inquinamento;
- trasformare i prodotti biologici utilizzando risorse rinnovabili;
- produrre prodotti biologici totalmente biodegradabili;
- produrre tessuti di lunga durata e buona qualità;
- garantire a tutti coloro che sono coinvolti nella produzione e nella trasformazione biologica adeguata gratificazione e soddisfazione per il proprio lavoro, fornendo altresì un ambiente di lavoro sicuro;
- progredire verso la formazione di un'intera catena di produzione, trasformazione e distribuzione che sia allo stesso tempo socialmente equa ed ecologicamente responsabile.

Con il reg. 2092 del 1991 l'Unione Europea riconosce e disciplina le coltivazioni biologiche indicando negli allegati le norme tecniche di produzione, i prodotti ammessi per i trattamenti fitosanitari e le concimazioni.

Da quel momento le aziende che vogliono produrre con il metodo dell'agricoltura biologica devono notificare l'inizio dell'attività alle regioni di appartenenza e agli organismi di controllo. L'organismo di controllo rilascia, a seguito dell'esito favorevole delle ispezioni e dei controlli effettuati, l'attestato di conformità di produzione, che andrà riconfermato anno per anno.

Alla suddetta normativa ne sono poi seguite altre aventi lo scopo di chiarire, completare e talora modificare quanto già specificato nel reg. 2092 del 1991 (vedi regg. n. 1488/97, 1073/2000, 436/2001, 473/2002).

1.3 Lotta biologica

Nell'ambito della difesa fitosanitaria, si definisce *lotta biologica* o *biocontrollo* "l'utilizzo di organismi naturali o modificati, di geni o prodotti genici, atti a ridurre gli effetti degli organismi indesiderati, e per favorire quelli utili all'uomo, alle coltivazioni, agli animali e ai microrganismi simbiotici", includendo in questa definizione anche l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare per l'ottenimento di nuove tecnologie (Accademia Nazionale della Scienza degli Stati Uniti -NAS, 1987).

L'obiettivo principale del controllo biologico è la riduzione tramite uno o più organismi della densità di inoculo o delle capacità patogeniche di un parassita nel suo stato attivo o dormiente, riduzione che si verifica naturalmente o mediante la manipolazione dei fattori ambientali, della pianta ospite, di un antagonista, oppure mediante l'introduzione massiva di uno o più antagonisti (Cook e Baker, 1983).

Le strategie di applicazione del controllo biologico si basano essenzialmente su:

- a. Il contenimento della popolazione patogena, mediante interventi sul suolo o sull'ambiente;
- b. Sfruttamento della resistenza della pianta ospite;
- c. Controllo dell'infezione mediante l'utilizzo di agenti di biocontrollo aventi attività antagonista rispetto alle specie fitopatogene (Gabriel e Cook, 1990).

1.3.1 Contenimento della popolazione patogena

Il controllo delle fitopatie può essere ottenuto mediante lo sfruttamento delle proprietà naturali dei suoli soppressivi, intendendo con ciò quegli ambienti nei quali un patogeno può vedere ridotta o addirittura annullata la sua virulenza (Cook e Baker, 1983). In altri termini, in tali suoli la capacità germinativa del patogeno, la sua crescita saprofitaria, la capacità di infettare la pianta ospite e/o la sua sopravvivenza sono ridotte, per cui la malattia risulterà del tutto assente o appena manifesta (Cook e Baker, 1983). Al contrario, nei cosiddetti “terreni conduttivi”, la malattia raggiunge i livelli più elevati (Baker, 1987). Tra queste due condizioni estreme si ritrova una serie di situazioni intermedie, che in definitiva si verificano più frequentemente.

Il fenomeno della repressività dei terreni è conosciuto fin dal secolo scorso, ed è stato riscontrato relativamente a diversi patogeni, tra cui *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis f. sp. tritici* (Agrios, 1998). La repressività di un suolo può essere trasferita da un terreno all'altro mescolando, ad esempio, una quantità relativamente piccola di terreno repressivo con uno non repressivo, ottenendo una riduzione di fitopatie causate da *F. oxysporum*, *P. cinnamomi* e *R. solani* ed altri patogeni fungini (Cook e Baker, 1983).

La repressività di un suolo è legata sia a componenti abiotiche, quali la struttura e la composizione chimico-fisica del suolo, che biotiche. Queste ultime dipendono in larga misura dalla competizione tra i diversi microrganismi che popolano il terreno, e soprattutto dalla

presenza di microrganismi antagonisti noti per la loro azione di biocontrollo. Tra questi ricordiamo funghi appartenenti ai generi *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporidesmium* e batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces*. Ad esempio in un suolo colombiano soppressivo per la *R. solani* sono stati trovati alti livelli di *Trichoderma* spp. (10^8 propaguli/g di terreno rispetto a 10^3 propaguli/g normalmente presenti nei terreni conduttivi) (Chet e Baker, 1981). E' stato anche dimostrato che tuberi di patata cresciuti in suoli ammendati con terreni contenenti un ceppo di *Streptomyces*, antagonista di *Streptomyces scabies*, agente della scabbia comune dei tuberi di patata, sono risultati sostanzialmente liberi dal patogeno (Liu *et al.*, 1995).

Un altro importante fattore che determina l'incidenza di fitopatie è da ricercarsi nell'ipovirulenza riscontrata nelle popolazioni di patogeni, anche se va sottolineato che si riscontrano frequentemente livelli di virulenza differenti nelle popolazioni di funghi fitopatogeni. L'isolamento di individui poco virulenti è risultato di particolare interesse nel caso della *Cryphonectria parasitica*, agente del cancro della corteccia del castagno. In diverse zone castanicole si è osservato una riduzione graduale degli attacchi associata alla comparsa di popolazioni meno virulente del patogeno. La presenza di micovirus e di dsRNA citoplasmatici, normalmente non associata a variazioni fisiologiche o morfologiche del ceppo fungino infetto, è risultata responsabile della ipovirulenza (Cook e Baker, 1983). Questa caratteristica può essere trasferita tramite anastomosi ifale dai ceppi non virulenti ai ceppi virulenti vegetativamente compatibili. I ceppi ipovirulenti, quindi, opportunamente applicati alle ferite, sono in grado di arrestare l'evoluzione dei cancri in atto favorendo la

regressione della malattia (Matta, 1999). La presenza di ceppi ipovirulenti è stata segnalata anche nel caso di *R. solani*, e per tale motivo la ricerca sta puntando sulla sperimentazione dell'impiego di tali ceppi nella lotta anche contro questo patogeno (Gabriel e Cook, 1990).

In molti casi si possono anche effettuare interventi sull'ambiente che portano ad una diminuzione o al completo annullamento dell'attività dei funghi fitopatogeni; tra questi si annoverano:

- la solarizzazione e le altre pratiche agronomiche atte a modificare la temperatura, l'umidità, l'intensità luminosa disponibile ed il pH del terreno, parametri ritenuti strettamente correlati con l'incidenza di diverse malattie;
- l'utilizzo di composti organici e inorganici;
- la rottura dell'interazione ospite-patogeno, mediante ad esempio l'anticipo o il ritardo della semina, la coltivazione di varietà con maturazione anticipata, etc...

Tali metodologie, tuttavia, si sono rilevate talvolta non sufficientemente efficaci nel controllo delle fitopatie o comunque di difficile applicazione in sistemi produttivi agricoli avanzati.

1.3.2 Resistenza della pianta ospite

Secondo l'American Phytopathological Society (APS) la resistenza di una pianta ospite ad una data malattia è la capacità della pianta di annullare o comunque ridurre l'attività di un patogeno. La tolleranza è invece intesa come la capacità della pianta di sopportare l'azione o

l'invasione di un patogeno senza o quasi reazione, come dimostrato dall'assenza più o meno completa di sintomi e danno.

I meccanismi di resistenza delle piante sono fondamentalmente di tipo meccanico e di tipo biochimico, cui va aggiunta una componente di resistenza non costituzionale, ovvero non ereditaria, che viene comunemente indicata col nome di "predisposizione" (determinata da fattori quali la temperatura, la luce, il contenuto idrico della pianta e del terreno, la nutrizione minerale, etc..).

La resistenza meccanica può essere di tipo pre-infezionale (precostruita o passiva) e di tipo post-infezionale (indotta o attiva). La prima è data dalla presenza di strutture capaci di ostacolare la penetrazione del patogeno e la successiva colonizzazione dei tessuti dell'ospite. Ai fini della resistenza meccanica pre-infezionale possono svolgere un ruolo di primaria importanza alcuni fattori quali lo spessore della cuticola e delle pareti cellulari, la presenza di tessuti sclerenchimatici e di strati suberizzati e lignificati, il contenuto in cera, la fuoriuscita di essudati, la presenza di tricomi e la struttura degli stomi.

Nel caso della resistenza meccanica post-infezionale vanno considerati i meccanismi di difesa che si instaurano nella pianta in seguito al riconoscimento del patogeno, con i quali la pianta tenta di bloccare la progressione del patogeno. Esempi di difese meccaniche indotte sono rappresentati dalla produzione di ormoni da ferita e di suberina, la formazione di strati ligno-suberizzati nelle pareti cellulari e di strati di abscissione, la deposizione di gomme o la morte delle cellule invase e di quelle vicine (fenomeno noto come "reazione di ipersensibilità"-RI).

La resistenza biochimica come quella meccanica può essere pre-

infezionale (precostruita) e post-infezionale (indotta). Nel primo caso è dovuta a sostanze chimiche sintetizzate precedentemente al tentativo di infezione, indicate come proinibitine o fitoncidi. Tra questi composti ritroviamo fenoli (acido caffeico, acido clorogenico, catecolo), glucosidi (saponine, glucosidi fenolici e cianogenici), lattoni insaturi, composti solforati, glucosinolati, accomunati dal fatto di essere prodotti del metabolismo secondario. Tali composti risultano tossici nei confronti dei patogeni, ma potrebbero rivelarsi dannosi per la pianta stessa ed è per questo che nelle cellule si trovano normalmente compartimentalizzati sotto forma di composti inattivi. Questi ultimi, in seguito all'attacco del patogeno, sono sottoposti a degradazione da parte di enzimi specifici e trasformati, così, in prodotti capaci di esplicare l'azione fungitossica.

La resistenza biochimica post-infezionale è legata alla secrezione di composti che non erano presenti prima dell'attacco del patogeno oppure presenti in quantità non sufficienti: i fenoli (attivati nella loro forma ossidata da fenolasi, fenolossidasi, perossidasi e polifenolossidasi), le fitoalessine, i sesquiterpeni, i ROS (reactive oxygen species), le proteine correlate alla patogenicità (PR-proteins), gli inibitori di proteasi, etc.. Si assiste anche al rafforzamento delle pareti cellulari e alla formazione di papille di callosio, all'accumulo di acido benzoico e acido salicilico, all'aumento dell'attività della lipossigenasi e alla comparsa della RI.

La reazione della pianta ad un agente patogeno risultante in una morte rapida solo di poche cellule o di una ristretta porzione di tessuto si definisce "reazione di ipersensibilità" (RI) ed è in grado di limitare la progressione dell'infezione. Potrebbe essere considerato semplicemente un fenomeno di resistenza di tipo meccanico, ma in

realtà l'infezione viene bloccata anche nelle cellule lontane dal punto di attacco, poiché sono intervenuti altri processi di resistenza biochimica post-infezionale. Ad ogni modo questo meccanismo non prevede necessariamente la formazione di un'estesa area necrotica né la morte di tutte le ife del patogeno. La RI è spesso associata alla LAR (Resistenza Localizzata Acquisita : quando l'infezione di una parte della pianta produce l'acquisizione di uno stato di resistenza nelle parti limitrofe) e alla SAR (Resistenza Sistemica Acquisita : quando lo stato di resistenza è acquisito in parti distali non ancora contagiate). La SAR è normalmente un fenomeno aspecifico e segue la RI. Fenomeni simili a quelli che si verificano nella SAR si riscontrano anche quando la pianta viene trattata con particolari microrganismi o loro metaboliti, oppure con sostanze chimiche che innalzano il potenziale di difesa della pianta (acido salicilico, ossalato, acidi grassi insaturi) (Harms, 1992).

Le applicazioni che riguardano la resistenza della pianta ospite conferiscono un importante risvolto pratico ai numerosi studi che riguardano tale argomento. Lorito *et al.* (1998) hanno effettuato la trasformazione di piante di tabacco e di patata affinché esprimessero il gene dell'endochitinasi CHIT42 del fungo di biocontrollo *Trichoderma harzianum*, in grado di conferire notevole attività antifungina. Le chitinasi di *T. harzianum* sono risultate molto più efficaci di quelle prodotte da piante e batteri per quanto riguarda la capacità di inibire funghi fitopatogeni. Questi studi confermano l'utilità del genoma fungino come fonte di geni di resistenza (Lorito *et al.*, 2001). Appare inoltre di notevole rilevanza la possibilità di conferire alla pianta la capacità di sintetizzare enzimi e tossine che inattivino i composti fitotossici prodotti dal patogeno durante

l'infezione o di aumentare la tolleranza della pianta verso di essi (Lorito e Scala, 1999).

1.3.3 Utilizzo di microrganismi antagonisti

Sono stati individuati numerosi agenti di biocontrollo aventi azione antagonista sia tra i funghi che tra batteri, virus, protozoi e nematodi, capaci di ridurre l'incidenza di varie fitopatie e/o di favorire lo sviluppo della pianta in termini di aumento della germinazione, della produzione e della fioritura e come sviluppo della parte epigea ed ipogea.

Gli agenti di biocontrollo possono essere inoculati direttamente sulla pianta o nel suolo all'inizio del ciclo di crescita della pianta (Cook e Baker, 1983). L'EPA (U.S. Environmental Protection Agency) definisce "biopesticida" qualsiasi composto naturale, microbico o biochimico capace di agire direttamente sul patogeno o di stimolare la difesa della pianta. Lo sviluppo commerciale di un biopesticida a base microbica deve rispondere a criteri di:

- Sicurezza: il prodotto deve essere facilmente e rapidamente degradabile nell'ambiente.
- Persistenza in campo: si deve garantire in campo livelli di propaguli attivi per l'ottenimento di un buon controllo del patogeno; per tale motivo sono preferite specie aggressive e capaci di rapida colonizzazione.
- Adattabilità all'ambiente: il microrganismo dovrebbe essere

adattato alle condizioni ambientali prevalenti di suolo, pH, temperatura.

- Stabilità: il microrganismo deve essere stabile durante lo stoccaggio del prodotto.
- Adeguata formulazione che consenta la facile applicazione su larga scala del prodotto con l'impiego di macchinari modesti.
- Economicità: relativamente alla coltura da proteggere, il formulato biologico dovrebbe essere economicamente conveniente rispetto ai prodotti chimici di sintesi.
- Sistema di produzione: dovrebbe essere convenzionale, su larga scala, e su misura del mercato potenziale.

La capacità di biocontrollo ed i relativi meccanismi di azione sono correlati a diversi tipi di interazione che riguardano l'organismo impiegato per il biocontrollo e, rispettivamente, il patogeno, la pianta ospite e la comunità microbica.

1.3.3.1 - Agente antagonista – Agente patogeno

Tale interazione si esplica attraverso meccanismi di antibiosi, competizione e parassitismo.

□ **L'antibiosi** si esplica attraverso la produzione da parte dei microrganismi antagonisti di metaboliti secondari in grado di inibire la crescita e lo sviluppo dei patogeni. La loro attività letale viene svolta, tuttavia, solo quando penetrano e si accumulano nelle cellule (inibizione per tossicità). Spesso questi metaboliti, caratterizzati da un

basso peso molecolare, sono prodotti dalla microflora antagonista in condizioni di ridotta disponibilità di nutrienti (Lewis *et al.*, 1991). Tra gli agenti produttori di antibiotici maggiormente studiati si ricordano diverse specie di *Pseudomonas* produttrici di fenazine, i primi antibiotici chiaramente implicati nel biocontrollo.

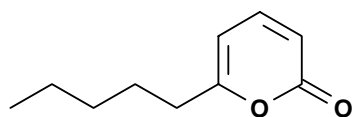
Tra i funghi antagonisti produttori di antibiotici va menzionato il caso di *Trichoderma* spp, da cui sono stati ricavati molti antibiotici caratterizzati sia dal punto di vista chimico che biologico; questi composti possono essere suddivisi in tre categorie:

- i. volatili: -particolarmente interessanti in quanto conferiscono un significativo vantaggio ecologico al microrganismo produttore;
- ii. estraibili in ambiente acquoso: -non-volatili;
- iii. peptaiboli: -peptidi idrofobici caratterizzati dall'alto contenuto di due amminoacidi non comuni, l'acido α -amminoisobutirrico (Aib) e l'isovalina (Iva) (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991); presentano inoltre l'amminoacido N-terminale acetilato e al C-terminale un amminoalcol (Ritieni *et al.*, 1995). I peptaiboli esibiscono varie attività biologiche oltre a quella antibiotica, tra le quali l'emolisi e il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, legate ad una elevata capacità di modificare le proprietà delle membrane (Jung *et al.*, 1981).

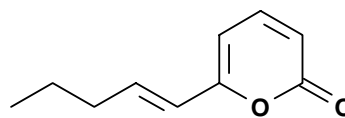
Trichoderma è in grado di produrre numerose sostanze capaci di inibire la crescita miceliare di numerose specie di funghi; in particolare sono stati fin'ora isolati e caratterizzati:

- il 6-Pentil- α -pirone (1) ed un suo analogo, il 6-(Penten-1-enil)- α -

pirone (2), entrambi associati ad un caratteristico odore di cocco; il secondo in particolare presenta una spiccata capacità inibitoria verso *Phytophthora cinnamoni*. (Collins e Halim, 1972; Moss *et al.*, 1975; Benoni, *et al.*, 1990; Cutler *et al.*, 1986; Prapula *et al.*, 1992).

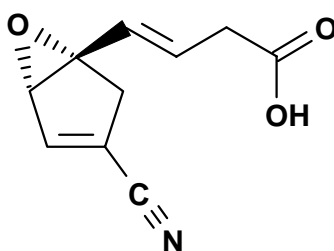


(1)

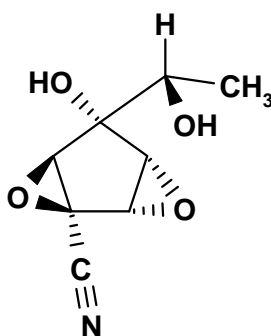


(2)

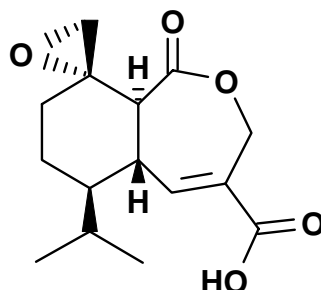
- la Dermadina, isolata da un ceppo di *T. viride* (UC 4785) nel 1966 (Pyke e Dietz, 1966).



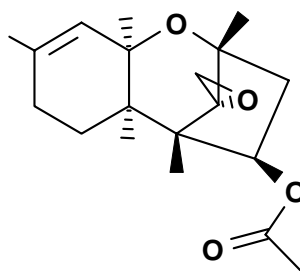
- la Trichoviridina, ottenuta nel 1970 da diversi ceppi di *Trichoderma* (Yamano *et al.*, 1970).



- l'Acido Eptelidico, la cui struttura è riportabile a quella di un sesquiterpene (Itoh *et al.*, 1980).



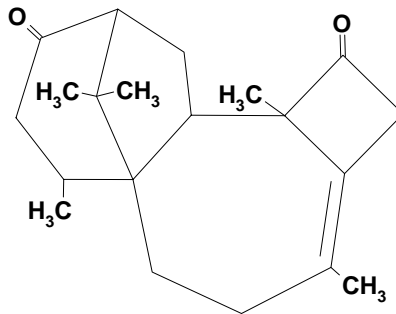
- la Trichodermina, un tricotecene sesquiterpene (Gotfredsen e Vangedal, 1965) dotato sia di attività antibiotica che di attività micotossica (Betina, 1989).



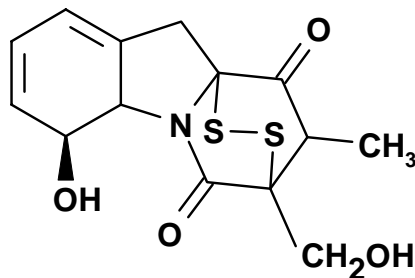
- la Trichotossina a50 (neutra) e a40 (acida) (Bruckner *et al.*, 1985), le Alameticine 1 e 2 (Brewer *et al.*, 1987) degli antibiotici di natura peptidica che possono essere inseriti nel gruppo dei peptaiboli.

- le Trichodecenine 1 e 2 e le Trichovirosine 1-14, anche esse facenti parte del gruppo dei peptaiboli (Fujita *et al.*, 1994) e capaci di formare dei canali all'interno delle membrane (Wada *et al.*, 1995).

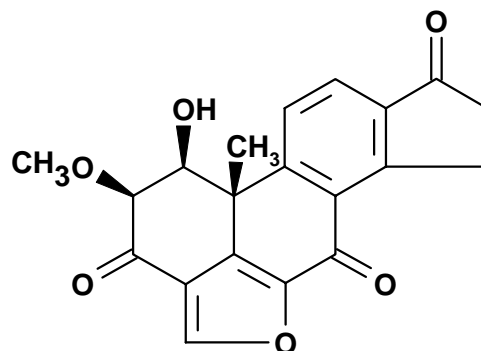
- l'isoharziandione metabolita dotato di notevole attività antagonista confermata nei confronti di *Sclerotium rolfii*, agente del “marciume del colletto” del carciofo (Mannina *et al.*, 1998).



La produzione di Viridina e Gliotossina, molecole note già da diversi anni, è attribuita al genere *Trichoderma* (Brian e Hamming, 1945; Brian *et al.*, 1946; Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991).



Gliotossina



Viridina

□ **La competizione** è un meccanismo di biocontrollo che può realizzarsi per lo spazio, per le sostanze nutritive o per altri fattori indispensabili all'attività e allo sviluppo del patogeno. Un importante esempio di competizione per i nutrienti è fornita da alcuni batteri agenti di biocontrollo (in particolare quelli appartenenti al genere *Pseudomonas*) che nei terreni con pH acido ostacolano il patogeno riducendo la disponibilità di ferro. Tale nutriente è normalmente disponibile per i microrganismi solo in basse concentrazioni e a pH neutri (Duijff *et al.*, 1994). Per tale motivo questi batteri, ma anche alcuni funghi, hanno sviluppato sistemi di assimilazione del ferro altamente efficaci, basati sull'uso di siderofori (proteine con un dominio di legame selettivo per il ferro) e sul trasporto all'interno della cellula mediato da una proteina specifica (carrier). Non esiste una specificità nell'utilizzo di siderofori, poiché sia altri microrganismi che le piante stesse possono usufruirne. La strategia competitiva all'antagonista consiste nell'escludere il patogeno dalla sua nicchia ecologica abituale, esponendolo a stress ambientali e nutrizionali e/o interrompendone il ciclo riproduttivo. Essa, tuttavia, non implica un contatto diretto tra i due ed inoltre è spesso adoperata negli antagonismi tra diversi patogeni o persino tra gli stessi agenti di biocontrollo.

Un'altra modalità attraverso cui si esplica il controllo di numerosi patogeni terricoli è rappresentato dalla competizione per i siti di infezione. E' stata osservata la riduzione della colonizzazione delle radici da parte di *F. oxysporum* in presenza di ceppi non patogeni della stessa specie (Schneider, 1984; Mandeel e Baker, 1991; Eparvier e Alabouvette, 1994).

□ Il **parassitismo** è un fenomeno che consiste in una interazione specifica tra un organismo antagonista ed un patogeno, durante la quale l'antagonista stabilisce un'intima associazione con il patogeno, da cui preleva parte e/o tutti i suoi nutrienti, senza offrire alcun tipo di vantaggio. L'interazione prevede normalmente una fase di contatto fisico con l'ospite ed assomiglia per molti versi alla tipica interazione pianta-patogeno. Prima della fase di contatto si ha una fase di riconoscimento dell'ospite a distanza, una crescita chemiotattica verso questo, l'instaurazione di un'interazione fisica compatibile tra i due organismi, la formazione di strutture specializzate (tipo appressori), la penetrazione e quindi la colonizzazione dell'ospite seguita dalla fase di evasione. Può verificarsi un duplice livello di parassitismo e si parla, in tal caso, di iperparassitismo, mentre un'interazione specifica tra antagonista e patogeno fungini è detta micoparassitismo. Esistono micoparassiti facoltativi (*Trichoderma* spp.) ed obbligati (*Ampelomyces quisqualis*).

In questo processo partecipano attivamente enzimi di tipo litico (chitinasi, glucanasi, proteasi) capaci di degradare le pareti cellulari e che quindi consentono la colonizzazione dei tessuti dell'ospite. Il micoparassitismo culmina con la lisi del micelio ospite, dei suoi conidi, clamidospore, sclerozi e delle altre strutture di conservazione.

Negli ultimi anni numerosi passi in avanti sono stati compiuti nella comprensione della dinamica dell'interazione fungo patogeno - agente di biocontrollo, cercando anche di individuare i geni coinvolti in tale meccanismo, al fine di selezionare organismi che esprimano caratteristiche utili nel controllo biologico (Haran *et al.*, 1996).

1.3.3.2 Interazione Pianta – Antagonista

L'interazione con la pianta è legata a fenomeni di colonizzazione da parte dell'organismo impiegato nel biocontrollo o a fenomeni di resistenza indotta. Nel primo caso la colonizzazione dell'agente di biocontrollo sulla pianta impedisce ai patogeni di attaccare la pianta. Molto spesso la capacità di colonizzazione non è direttamente correlata con quella di biocontrollo, ed è influenzata da fattori esterni, quali ad esempio le caratteristiche del terreno e delle radici, l'accumulo di metaboliti secondari, la tolleranza osmotica, la capacità di utilizzo degli essudati e di produrre enzimi degradativi, etc...

In alcuni casi, e qui si fa riferimento al fenomeno della resistenza indotta, gli agenti di biocontrollo inducono un sostanziale cambiamento nella capacità della pianta di difendersi dalle malattie, attivando spesso gli stessi geni utilizzati per la protezione contro microrganismi patogeni (attivazione della risposta ipersensibile e della resistenza sistemica acquisita- SAR). Ad esempio il ceppo di *Pseudomonas fluorescens* CHAO, che produce il sideroforo pioverdina, induce la SAR e la sintesi di proteine correlate alla patogenesi (PR-proteins), proteggendo la pianta anche da patogeni virali. Questa specie produce anche un lipopolisaccaride presente sulla superficie cellulare, che da solo induce resistenza a *Fusarium* in assenza del batterio. Un simile fenomeno è stato anche trovato con *Trichoderma*.

1.3.3.3 Interazione Comunità Microbica – Antagonista

L'interazione dell'organismo usato per il biocontrollo con la comunità microbica risulta particolarmente complessa ma altrettanto fondamentale per la comprensione dei meccanismi di azione e per una corretta applicazione del biofitofarmaco.

Il presupposto di questo tipo di interazione è che l'impiego di agenti di biocontrollo possa alterare l'equilibrio tra le specie esistenti in favore delle specie non patogene; si può ad esempio ipotizzare che, grazie a questo meccanismo, si stabilisca sulle radici una popolazione di microbi del suolo in luogo di quelli tipici della rizosfera, provocando così un disorientamento dei patogeni (ipotesi del camuffamento).

Funghi e batteri antagonisti, oltre al controllo delle fitopatie, possono anche avere effetti benefici sulle piante. Diversi autori hanno segnalato la presenza di numerosi vantaggi per le piante, consequenziali al trattamento dei semi o delle radici con funghi e batteri antagonisti, in particolar modo con specie appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Trichoderma* (Whipps,1997).

1.3.3.4 Microrganismi autorizzati in Italia nella lotta biologica contro i parassiti

★ Batteri

Bacillus thuringiensis

I prodotti a base di *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sono stati i primi insetticidi biologici a essere diffusamente impiegati per la difesa delle colture. Ricerche effettuate già agli inizi del 1900 evidenziarono le proprietà insetticide del *Bacillus thuringiensis*; tuttavia solo agli inizi degli anni '60 l'industria cominciò a mettere a punto dei preparati

idonei per l'utilizzazione in agricoltura.

B. thuringiensis è un batterio Gram-positivo, caratterizzato dalla costante presenza di un cristallo di natura proteica contenente una tossina, la δ -endotossina, attiva nei confronti di numerose specie di insetti. A oggi, sono state isolate più di 30 sottospecie del batterio attive contro molte specie di insetti, dai ditteri ai lepidotteri e ai coleotteri, distinte per le differenti proprietà antigeniche dei flagelli (sierotipo). Le principali sottospecie oggi impiegate nella lotta microbiologica sono le seguenti:

- *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (sierotipo H 3a, 3b ceppo HD/1), impiegato essenzialmente per la lotta contro le larve dei lepidotteri;
- *B. thuringiensis* var. *israelensis* (sierotipo H 14), utilizzato per il controllo delle larve delle zanzare nelle zone acquitrinose;
- *B. thuringiensis* var. *temebrionis* (sierotipo H 8a, 8b) per combattere le larve dei coleotteri in orticoltura;
- *B. thuringiensis* var. *aizawai* (sierotipo H 7), di minore interesse, impiegato per combattere la tignola della cera.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, *B. thuringiensis* è attivo solamente per ingestione sulle larve, nei confronti delle quali l'efficacia risulta inversamente proporzionale all'età e quindi al peso. Questo bacillo agisce senza bisogno di riprodursi all'interno dell'organismo ospite, ma come un vero e proprio veleno. Quando giunge nell'intestino medio della larva dell'insetto sensibile il *B. thuringiensis* viene sottoposto ai normali processi digestivi ed il cristallo proteico si diffonde nell'intestino. Qui, a contatto con i succhi digestivi dell'ospite e in presenza di un ambiente altamente alcalino, il

cristallo proteico si scioglie liberando la tossina attiva che paralizza i muscoli dell'apparato digerente, determinando così la morte dell'insetto.

Streptomyces griseoviridis

Questo microrganismo, ampiamente diffuso in natura, possiede delle caratteristiche tali da interferire con la crescita e la sopravvivenza dei patogeni. In particolare agisce in base a quattro tipi di meccanismi: la competizione per il substrato e lo spazio, l'antibiosi basata sulla produzione da parte degli antagonisti di metaboliti secondari tossici, il parassitismo, in cui l'antagonista compie il suo ciclo biologico a spese dell'organismo fitopatogeno e, infine, la resistenza indotta, che ha luogo mediante l'attivazione da parte dell'antagonista dei meccanismi di resistenza della pianta.

L'impiego di *Streptomyces griseoviridis* in qualità di biofungicida deriva dall'osservazione delle proprietà soppressive possedute dalle torbe bionde di *Sphagnum* di origine finlandese nei confronti di diverse malattie delle piante. Nel corso di studi condotti dall'Università di Helsinki venne osservato come gli *Streptomyces* costituissero una flora microbica abbondante in tali torbe. Uno dei ceppi (il K61, che si ritrova comunemente in natura), risultato tra i più promettenti in prove di laboratorio, venne successivamente impiegato a livello industriale. I principali bersagli di questo microrganismo sono rappresentati da *Fusarium* spp., agenti di tracheofusariosi, nonché da altri funghi fitopatogeni come *Alternaria* spp., *Pythium* spp., e *Phomopsis* spp.

✦ Virus

Virus della granulosi di *Cydia pomonella* (CpGV)

I virus della famiglia *Baculoviridae* vengono normalmente impiegati in agricoltura biologica per il controllo di insetti fitofagi. Alla famiglia appartiene un unico genere, *Baculovirus*, suddiviso in tre sottogruppi A, B e C. Alla prima suddivisione appartengono i virus della poliedrosi nucleare (NPV), al sottogruppo B i virus della granulosi (GV) e al sottogruppo C i virus privi di corpi d'occlusione, detti NOBV. La struttura del virione, di forma bastoncellare e dotato di membrana lipoproteica esterna, è comune a tutti i membri della famiglia. Nella maggior parte dei *Baculoviridae*, i virioni sono inglobati in una matrice proteica di struttura cristallina in maniera individuale (GV) oppure in numero elevato (NPV). Il corpo d'occlusione ha la funzione di proteggere i virioni, che sono estremamente sensibili alla luce ultravioletta.

I *Baculoviridae* si replicano solo nel nucleo delle cellule ospiti. Ogni singolo virus risulta piuttosto specifico e in grado di infettare poche specie nell'ambito di un unico o di un limitato numero di generi della stessa famiglia di insetti.

Il virus della granulosi di *Cydia pomonella* (CpGV) fu originariamente isolato da una larva di carpocasca in America centrale. I preparati a base del virus si ottengono, normalmente, manipolando le larve morte per infezione, allo scopo di ottenere una sospensione di inclusioni virali miscibili con acqua. Il virus viene purificato, per centrifugazione e successivamente formulato con l'aggiunta di additivi specifici in modo da ottenere una sospensione concentrata.

Il meccanismo d'azione inizia generalmente quando l'insetto ingerisce

accidentalmente i corpi occlusivi del virus. Una volta giunte nell'ambiente alcalino dell'intestino, grazie anche alle proteasi alcaline contenute nei succhi digerenti, queste forme di resistenza si dissolvono liberando le particelle virali nel mezzo. In tal modo i virioni contaminano le cellule epiteliali dell'ospite e si riproducono a loro spese. Da qui i virioni neoformati escono penetrando nell'emocele, da dove estendono l'infezione praticamente a tutti gli altri tessuti. CpGV risulta infettivo per almeno 6 specie di tortricidi, ma *Cydia pomonella* costituisce l'unica specie di interesse economico contro la quale sono stati autorizzati i formulati presenti in commercio.

✧ Funghi entomopatogeni

La caratteristica principale che contraddistingue i funghi entomopatogeni è la capacità di penetrare attivamente il corpo degli artropodi attraverso la cuticola, l'apparato boccale ed altre aperture naturali. I funghi maggiormente impiegati nella lotta microbiologica sono i Deuteromiceti; altre specie (ad esempio quelle appartenenti alla famiglia delle *Entomophthoraceae*) rivestono comunque un importante ruolo nel mantenimento di un equilibrio funzionale degli insetti nell'ecosistema.

Beauveria bassiana

B. bassiana è un fungo ubiquitario capace di attaccare circa 500 specie di insetti, appartenenti soprattutto all'ordine dei lepidotteri e dei coleotteri. Le spore di questo fungo a contatto con l'insetto germinano, penetrando attraverso la cuticola tra le zone della testa e

dei segmenti toracici, mediante una combinazione di azione meccaniche ed enzimatiche. Lo sviluppo successivo del fungo all'interno dell'insetto, accompagnato alla produzione di tossine (beauvaricina) e dalla perdita di acqua e nutrienti, ne determina la morte in 3-5 giorni. In condizioni di elevata umidità l'insetto viene ricoperto da un feltro bianco costituito dalla ife fungine e dalle tipiche strutture di diffusione, i conidi. I ceppi di *B. bassiana* attualmente in commercio sono attivi contro tutti gli stadi (uova, neanidi, pupari e adulti) degli aleurodidi che attaccano la maggior parte delle colture orticole ed ornamentali in serra ed in pieno campo (in particolare sono attivi contro *Bemisia tabaci*, *Bemisia argetifolii*, *Trialeurodes vaporariorum*).

Questo fungo è un patogeno specifico di artropodi e non è infettivo, tossico o patogeno per i mammiferi; inoltre, non arreca danno agli entomofagi utili. Nonostante i suoi numerosi vantaggi, va sottolineato comunque che la persistenza di *Beauveria bassiana* nel suolo risulta essere molto breve.

✧ Funghi antagonisti

Ampelomyces quisqualis

Questo fungo è un deuteromicete impiegato per il controllo dell'oidio, essendo un antagonista naturale specifico nei confronti di varie specie di oidio. Attualmente è utilizzato un isolato di *Ampelomyces quisqualis*, il numero 10, scoperto in Israele. Il microrganismo viene prodotto per fermentazione sommersa in modo da ottenere le spore che costituiscono la formulazione commerciale tipica; queste, a seguito di reidratazione (che avviene con la preparazione della miscela antiparassitaria), germinano nel micelio dell'oidio, parassitizzandolo.

A. quisqualis è particolarmente attivo sugli agenti del mal bianco appartenenti alla famiglia delle *Erisiphaceae*. Le oltre 64 specie di oidio suscettibili all'azione dell'antagonista appartengono ai generi *Brasilomyces*, *Erisiphe*, *Leveillula*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Sphaeroteca*, e *Uncinula*, che rappresentano i principali agenti del mal bianco (attaccano 256 specie vegetali).

Trichoderma

Al genere *Trichoderma* appartengono molte specie di funghi filamentosi saprofiti appartenenti al gruppo dei Deuteromiceti che sono naturalmente presenti nel terreno. *Trichoderma* è un organismo ubiquitario, facile da isolare e coltivare, non patogeno per le piante superiori. Risulta essere un forte competitore nella sua nicchia trofica e possiede un sistema enzimatico capace di attaccare una grande varietà di funghi patogeni; è inoltre un micoparassita in grado di produrre numerosi antibiotici.

Le capacità antagoniste di questo microrganismo nei confronti di numerosi patogeni sono state messe in evidenza sin dagli anni '30, il che ha suggerito l'idea di utilizzarlo come modello per studiare i processi di biocontrollo.

L'attività antifungina di *Trichoderma* si esplica principalmente mediante la competizione aggressiva, il micoparassitismo e la produzione di sostanze antibiotiche. La competizione alimentare si realizza mediante la sottrazione delle sostanze contenute negli essudati presenti sulla superficie degli organi vegetali (macro e microelementi, zuccheri, alcoli, pectine, aminoacidi, acidi organici) impedendo, in tal modo, la germinazione delle spore del patogeno. L'attività fungicida vera e propria ha luogo allorché il fungo viene attratto dalle sostanze

emesse dalle ife del micelio ospite (la parassitizzazione è specifica). Una volta raggiunto il fitoparassita, *Trichoderma* ne avvolge il micelio con le proprie ife, emettendo enzimi litici (β -1,3-glucanasi e chitinasi) in grado di dissolvere la parete e consentire la penetrazione all'interno del micelio dell'ospite.

L'attività del fungo si esercita prevalentemente su *Botrytis cinerea* (per il quale è stata ottenuta la registrazione in Italia), ma va segnalata anche su numerosi altri patogeni (*Sclerotinia* spp., *Rhizoctonia* spp., etc...). Anche se diversi formulati vengono impiegati sia per trattamenti al terreno che per applicazioni fogliari, il preparato registrato in Italia viene raccomandato solo per quest'ultimo tipo di utilizzazione ed è autorizzato per trattamenti su vite e pomodoro.

Le specie del genere *Trichoderma* maggiormente utilizzate per il controllo biologico sono *T. harzianum* e *T. virens* (Papavizas, 1985). In particolare, gli enzimi chitinolitici di questi due ceppi sono stati ampiamente studiati perché ritenuti responsabili della degradazione della parete cellulare nei funghi contenenti chitina (De la Cruz *et al.*, 1992; Di Pietro *et al.* 1993, Lorito *et al.*, 1993 b , 1994 b). Numerosi lavori dimostrano che *T. harzianum*, da solo o in combinazione con altre specie di *Trichoderma* oppure con prodotti chimici, attacca direttamente agenti patogeni quali ad esempio *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotinia* e *Botrytis*. Particolarmente interessante è il sinergismo degli enzimi litici di *Trichoderma* con alcuni fungicidi inibitori della sintesi degli steroli (flusilazolo, miconazolo), della chitina e dei β -glucani. Gli enzimi degradativi delle pareti cellulari (i CWDEs - Cell Wall Degrading Enzymes), favoriscono la penetrazione dei fungicidi nei siti specifici d'azione che raggiungono così concentrazioni più elevate nei siti bersaglio. Ad esempio i MACs

(Membrane-Affecting Compounds), tra cui vi sono i fungicidi indicati sopra, inducono una degradazione dei complessi enzimatici chitina e glucano sintasi, presenti sul plasmalemma, rendendo il fungo incapace di riparare i danni prodotti sulla parete dagli enzimi litici.

L'alto sinergismo tra gli enzimi, i fungicidi o MACs suggerisce l'applicazione di questi composti per migliorare la resistenza delle piante alle malattie (Woo *et al.*, 1998) e per la produzione di nuovi formulati anticrittogamici (Lorito *et al.*, 1994 a) che consentirebbero nella lotta integrata di ridurre la quantità di pesticidi chimici impiegati e di conseguenza anche l'impatto ambientale. Numerose sono le specie di *Trichoderma* attualmente utilizzate nei formulati commerciali; in particolare esistono 16 preparati registrati negli USA a base di *Trichoderma spp.*, per un totale di circa 15 ceppi diversi.

E' stato osservato che alcune specie di *Trichoderma* hanno un effetto sinergico con i PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), organismi capaci di colonizzare le radici e produrre benefici alla coltivazione potenziando la crescita e controllando le malattie, e con i funghi micorizzogeni (Clavet *et al.*, 1993). Questo dato è particolarmente interessante per l'applicazione di tali miceti nel controllo biologico, dal momento che si possono selezionare specie di *Trichoderma* da utilizzare nella lotta biologica che siano compatibili con agenti biologici simbiotici.

La capacità di *Trichoderma* di potenziare l'accrescimento delle piante in assenza di patogeni è stata recentemente studiata e ha mostrato tra gli effetti più evidenti una diminuzione del tempo di germinazione, un incremento della percentuale di germinazione ed un maggiore sviluppo dell'apparato radicale. Questi benefici sembrano dovuti alla capacità del fungo di controllare i patogeni minori, di stimolare la

produzione di vitamine o ormoni da parte della pianta e di convertire i nutrienti non utilizzabili in composti nutritivi utili per la pianta stessa.

1.4 *Sepedonium*

Relativamente all'impiego di microrganismi antagonisti ai fini di un controllo biologico delle fitopatie si inserisce lo studio dei funghi microscopici appartenenti al genere *Sepedonium*. Di particolare interesse per le capacità antagoniste e antitumorali sono le specie *chrysospermum* e *ampullosporum* (Ando *et al.*, 1969; Tamura *et al.*, 1968; Kato *et al.*, 1969).

S. chrysospermum, stadio anamorfico di *Hypomyces chrysospermum*, è un ifomicete micofago noto come parassita di *Boletales* e di diverse specie di *Agaricaceae*, *Aphylophorales* e *Gasteromycetes* (Domsch *et al.*, 1980; Hawksworth, 1981).

Le colonie di questo fungo, inizialmente di colore bianco, assumono con il passare del tempo una intensa colorazione giallastra quando allevate su PDA (Potato Dextrose Agar) (Figura 1.1).



a



b

Figura 1.1: crescita di *S. chrysospermum* su piastra di PDA - a) fronte; b) retro

Al microscopio presenta dei grossi macroconidi sferici e spinosi (Figura 1.2) che possono essere accompagnati da conidi di dimensioni più piccole provenienti da corti conidiofori. Tali spore possono

rappresentare un semplice metodo di riconoscimento del fungo. Possiede, inoltre, ife settate e conidiofori singoli o ramificati (Figura 1.3).

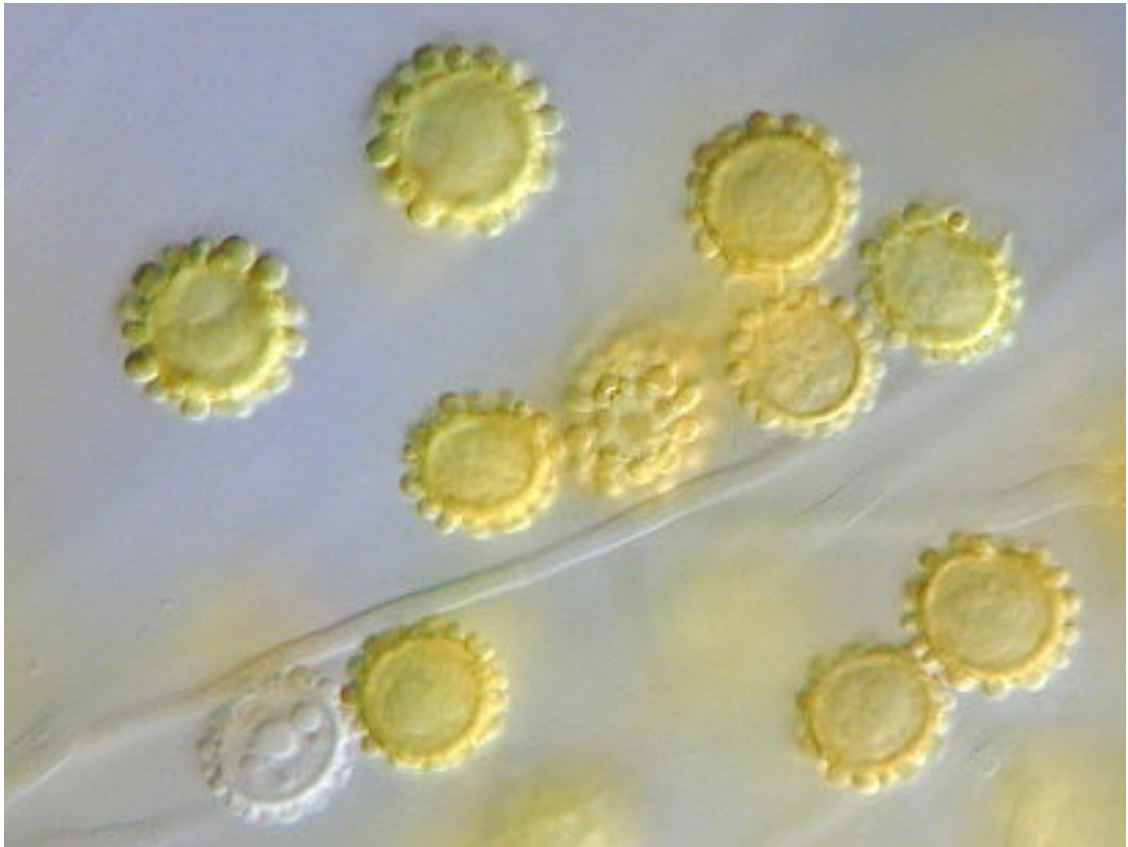


Figura 1.2: spore di *S. chrysospermum*.

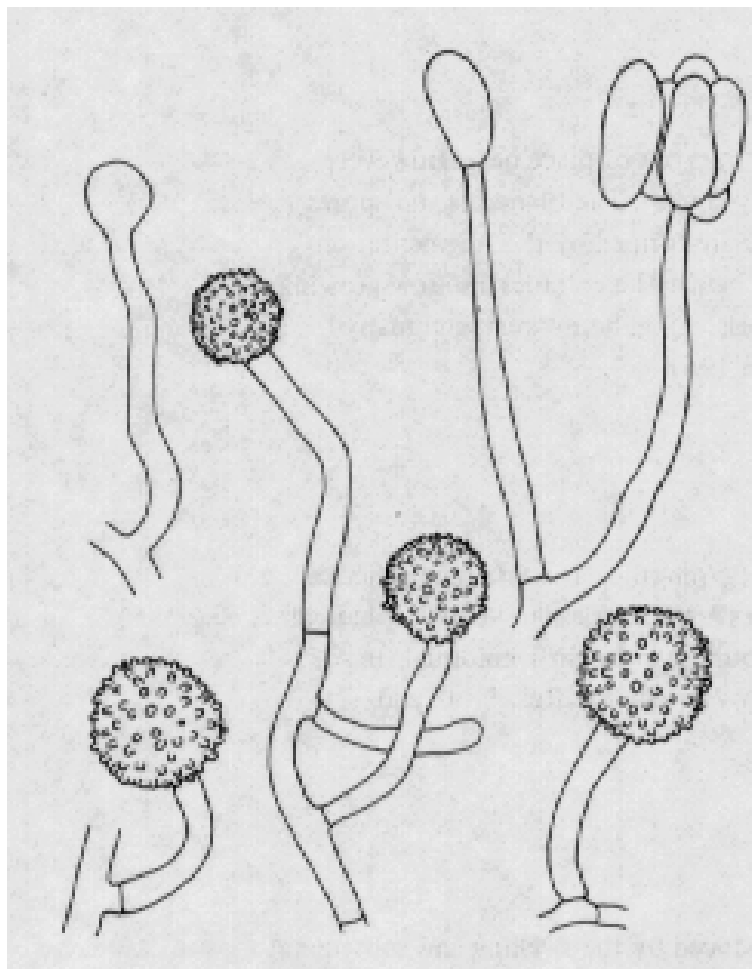


Figura 1.3: conidiofori *S. chrysospermum*

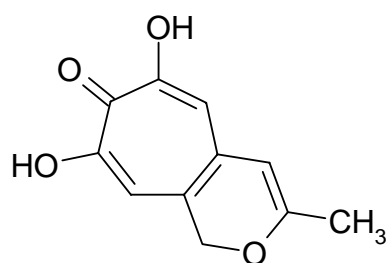
S. chrysospermum è un fungo terricolo con un areale di distribuzione molto ampio (Abdel-Hafez *et al.*, 1987; Arnold, 1971; Arnold, 1986; Koval *et al.*, 1973; Koval, 1974; Sun *et al.*, 1978; Tubaki, 1975); mostra notevoli attitudini saprofitarie, una buona tolleranza ad alcuni fungicidi e la capacità di colonizzare il terreno (Kuthubutheen e Pugh, 1979). *S. chrysospermum* produce, inoltre, notevoli quantità di enzimi extracellulari dotati di attività chitinolitica e gluconolitica (Touzé-Soulet *et al.*, 1980).

Le proprietà antagoniste di *S. chrysospermum* sono state dimostrate *in vitro* nei confronti di due importanti e diffusi funghi fitopatogeni terricoli: *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Zoina *et al.*, 1990).

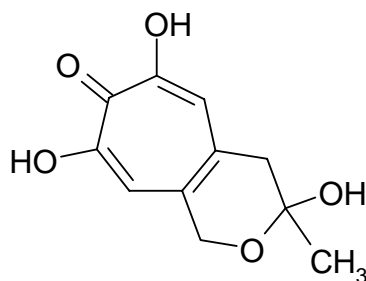
Probabilmente, in maniera del tutto analoga a quanto avviene per i funghi appartenenti al genere *Trichoderma*, anche *Sepedonium* manifesta la sua attività antagonista attraverso processi di competizione, parassitismo, antibiosi.

La capacità di produrre metaboliti secondari ad attività antibiotica è stata in parte dimostrata grazie all'isolamento ed alla caratterizzazione di alcuni composti dai filtrati colturali del fungo.

I principali metaboliti isolati e caratterizzati da filtrati colturali di *S. chrysospermum* sono la sepedonina ed il suo analogo strutturale, l'anidrosepedonina (Divekar *et al.*, 1965) (Figura 1.4).



sepedonina



anidrosepedonina

Figura 1.4: struttura chimica della sepedonina e della anidrosepedonina

L'impiego di composti contenuti ^{13}C si è dimostrato di particolare importanza per chiarire taluni meccanismi molecolari nell'ambito di differenti processi chimici e biochimici (Vinale *et al.*, 1999). Studi ottenuti impiegando precursori arricchiti a ^{13}C hanno evidenziato che entrambi questi metaboliti sono biosintetizzati dal fungo attraverso metilazione di un intermedio polichetidico derivante da acetato e malonato, seguita da un riarrangiamento e da una ciclizzazione (Figura 1.5) (Wright *et al.*, 1969).

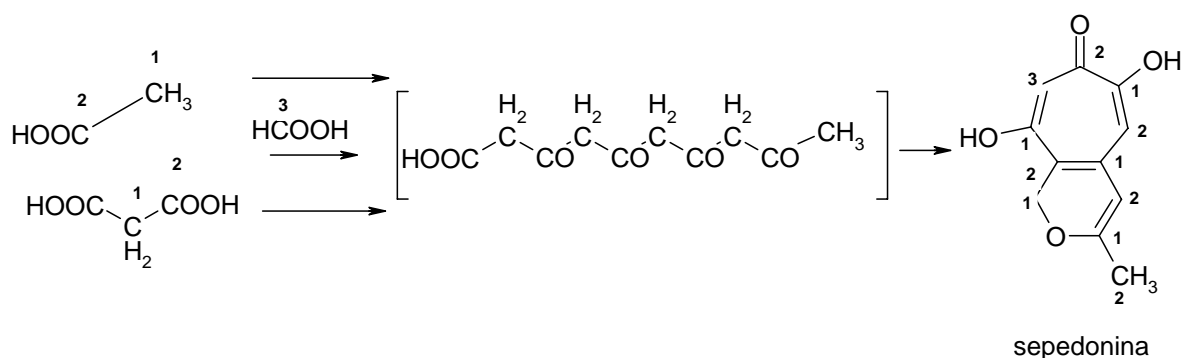
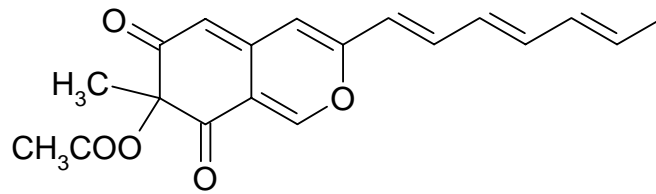


Figura 1.5: biogenesi della sepedonina

L'anidrosepedonina è ottenuta in maggiori quantità a discapito del suo analogo strutturale quando il mezzo di coltura dal quale si ottiene il filtrato non è tamponato (Divekar *et al.*, 1965). Tale osservazione permette di affermare che, a seconda delle condizioni ambientali, il

fungo ha la possibilità di produrre un metabolita o l'altro.

L'attività antagonista di *S. chrysospermum* è dovuta tra l'altro alla capacità di produrre la crisoidina (Closse e Hauser, 1973), un metabolita fungitossico di facile diffusione nel mezzo colturale dotato di un ampio spettro di azione (Figura 1.6).



crisoidina

Figura 1.6: struttura della crisoidina

S. chrysospermum produce la crisoidina in quantità e in tempi dipendenti dal substrato in cui viene allevato (Zoina *et al*, 1990). E' evidente che la differente composizione dei mezzi colturali influenza notevolmente il metabolismo del fungo e di conseguenza la sintesi della sostanza, indipendentemente dallo sviluppo che il micete manifesta su diversi substrati. La crisoidina è un prodotto finale del metabolismo secondario del fungo in quanto nei substrati liquidi essa raggiunge progressivamente, con lo sviluppo del micelio, livelli che rimangono piuttosto stabili nel tempo.

L'attività antagonista di *Sepedonium* può essere quantificata mediante la riduzione dell'alone di crescita della colonia del patogeno o attraverso la formazione di bande di inibizione.

I peptaiboli, inoltre, rappresentano altre molecole importanti nell'effetto antagonista e nell'antibiosi del fungo. Funghi del genere *Sepedonium* appartenenti alla specie *ampullosporum* sono capaci di produrre ampullosporina, un peptaibolo costituito da 15 unità aminoacidiche (Figura 1.7) (Ritzau *et al.*, 1997). E' stata studiata la capacità di questo composto di formare canali ionici elicoidali all'interno delle membrane, testando tale attività in una membrana artificiale e valutando la differenza di permeabilità ionica (Grigoriev *et al.*, 1997).

Ac-L-Trp-L-Ala-Aib-Aib-L-Leu-Aib-L-Gln-Aib-Aib-Aib-L-Gln-L-Leu-Aib-L-Gln-L-Leuol

Figura 1.7 : Struttura della Ampullosporina (Aib: acido α -amminobutirrico; Leuol: L-leucinolo)

Alcuni funghi appartenenti al genere *Hypomyces* sono attualmente considerati ottimi produttori di nuovi composti attivi. In particolare sono stati registrati metodi per la preparazione di nuovi composti ad elevata attività di biocontrollo a partire da colture pure di questo fungo (Patent application WO 96/16014 A1).

1.5 Scopo della tesi

L'obiettivo generale del presente lavoro è quello di valutare le capacità antagoniste di *S. chrysospermum* (Bull.) Link: Fr. per considerare la possibilità di utilizzare tale fungo quale nuovo agente di lotta biologica da impiegare da solo o in combinazione con altri microrganismi già utilizzati nel biocontrollo.

Si è inteso, inoltre, approfondire la conoscenza delle basi molecolari del meccanismo di biocontrollo di *S. chrysospermum* identificando metaboliti antibiotici ed alcuni enzimi litici prodotti e rilasciati dal fungo nel substrato di crescita.

Il lavoro eseguito può essere suddiviso nelle fasi di seguito riportate:

1 - Valutazione *in vitro* dell'attività antagonista di *S. chrysospermum* nei confronti di alcuni agenti fitopatogeni

Per la realizzazione di questa parte del progetto di tesi si è provveduto anzitutto alla selezione di agenti fitopatogeni, del mezzo di crescita da utilizzare e del tipo di saggio di antagonismo *in vitro*.

2 - Valutazione *in vivo* dell'attività antagonista di *S. chrysospermum* nei confronti di alcuni agenti fitopatogeni

Durante questa fase si intende procedere alla valutazione *in vivo* dell'attività antagonista di *S. chrysospermum* nei confronti di alcuni agenti fitopatogeni (in particolare è stato valutato il comportamento del fungo nei confronti di un agente fogliare ed uno terricolo). La scelta della pianta sulla quale effettuare il saggio di biocontrollo *in*

vivo è stata ovviamente condizionata dalla scelta dei patogeni selezionati.

3 – Studio delle basi molecolari del meccanismo di biocontrollo in *S. chrysospermum*

Per lo svolgimento di questa parte del lavoro si è provveduto all'ottenimento di filtrati colturali bioattivi di *S. chrysospermum* su opportuni mezzi di crescita in fase liquida. All'ottenimento dei suddetti filtrati è seguita l'applicazione di metodologie di estrazione, purificazione e caratterizzazione chimico/biologica delle molecole di interesse. Si è quindi proceduto con l'estrazione delle molecole dotate di attività antibiotica e delle molecole proteiche dotate di attività biologica, che sono state successivamente isolate e parzialmente caratterizzate. Sono anche stati valutati eventuali interazioni sinergiche tra le molecole coinvolte nel biocontrollo.

4 – Sintesi chimica di alcune molecole di interesse coinvolte nel biocontrollo

In quest'ultima fase del progetto di tesi si è inteso valutare la possibilità di realizzare la sintesi chimica di uno o più antibiotici prodotti da *S. chrysospermum* partendo da precursori disponibili in commercio. Lo scopo è quello di ottenere quantità sostanziali di prodotti attivi, anche per sviluppare applicazioni biotecnologiche ed industriali o metodi di "marcatura" del processo di biocontrollo (talora tale antagonista venisse applicato su larga scala).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi utilizzati e condizioni di crescita

Il ceppo di *S. chrysospermum* (Bull.) Link: Fr. impiegato (ceppo 704) è stato isolato nel bosco del Parco Gussone di Portici (NA) da una varietà di *Boletales* sp. presso i laboratori di Patologia Vegetale del Dipartimento di Arboricoltura Botanica e Patologia Vegetale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Le spore dei ceppi, conservate a -80° C come sospensione conidica in glicerolo 20%, sono state incubate a 25° C per circa 15 giorni su piastre Petri contenenti PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) per consentirne la germinazione. Dopo l'incubazione i conidi di *S. chrysospermum* sono stati raccolti, filtrati con lana di vetro e lavati con acqua distillata sterile.

Il filtrato è stato centrifugato in modo da raccogliere i conidi, successivamente risospesi in una soluzione al 20 % di glicerolo. La concentrazione dei conidi impiegata nei saggi successivi è stata determinata con l'ausilio di una vetrino contaglobuli.

Le sospensioni conidiche sono state conservate a 4°C.

2.2 Saggi di biocontrollo *in vitro*

La capacità antagonista di *S. chrysospermum* (ceppo 704) è stata valutata attraverso saggi *in vitro* che hanno simulato un confronto diretto tra patogeno ed antagonista in piastra. La capacità antagonista di *S. chrysospermum* è stata saggiata nei confronti di *Rhizoctonia solani* (Kuhn ceppo 1556, isolato da pomodoro), *Pythium ultimum* (Trow ceppo 1617, isolato da peperone), *Fusarium oxysporum forma specialis phaseoli* (FOP1) e *Botrytis cinerea* (ceppo patogeno 309, isolato da tabacco).

In primo luogo si è provveduto alla crescita dei due microrganismi (il patogeno e l'antagonista) su piastre di PDA alla temperatura di 25°C per 14 giorni.

I saggi di biocontrollo sono stati effettuati prelevando dischetti di 5 mm di diametro dalle colonie sia del patogeno che dell'antagonista e ponendole in piastre di PDA a 6 cm di distanza l'uno dall'altro.

Nel caso di *Rhizoctonia solani* e di *Pythium ultimum*, il patogeno è stato trasferito su piastra quando la colonia dell'antagonista aveva raggiunto i 5 cm di diametro. La temperatura di crescita utilizzata per il saggio è stata di 25°C e per ogni prova sono state effettuate cinque repliche.

La capacità antagonista è stata valutata in base all'ampiezza della zona di inibizione formatasi in seguito alla crescita dei due microrganismi dopo 21 giorni di crescita. L'alone di inibizione stabile è stato misurato in centimetri assegnando tre segni positivi nel caso in cui tale alone è superiore ad 1 cm (+++ = > 1 cm),

due segni positivi nel caso in cui è compreso tra 0.5 e 1 cm ($++ = > 0.5 \text{ cm}$ e $< 1 \text{ cm}$) ed un segno positivo nel caso in cui è inferiore a 0.5 cm ($+ = < 0.5 \text{ cm}$).

2.3 Saggi di biocontrollo *in vivo*

Con i saggi effettuati *in vivo* è stata valutata la differente capacità di biocontrollo del ceppo 704 di *Sepedonium* utilizzato nei confronti dei funghi fitopatogeni *Rhizoctonia solani* (Kuhn ceppo 1556, isolato da pomodoro) e *Botrytis cinerea* (ceppo patogeno 309, isolato da tabacco).

2.3.1 Saggio *in vivo* nei confronti di *R. solani* (patogeno terricolo)

I saggi sono stati realizzati utilizzando semi di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* cv borlotto). Questi sono stati prima sterilizzati con ipoclorito di sodio al 2% per 15 minuti, quindi lavati abbondantemente con acqua distillata sterile e infine posti in piastre dove sono stati trattati con sospensioni di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum*.

Alle spore è stata aggiunta una miscela adesiva (Pelgel in soluzione acquosa al 13,3% P/V) nel rapporto di 1:3, in modo da ottenere inoculi aventi una concentrazione finale di 10^8 spore/ml. I semi, opportunamente ricoperti dall'inoculo (1 ml di inoculo/10 gr di semi), sono stati rimescolati ogni mezz'ora ed esposti ad un flusso di aria per favorire l'adesione dell'inoculo. Al fine di assicurare che il Pelgel non avesse effetti rilevanti sullo sviluppo dei semi, sono state eseguite prove di controllo in cui i semi sono

stati trattati con la sola sostanza adesiva. I semi sono stati quindi messi a dimora nel terreno setacciato, sterilizzato ed addizionato del micelio del patogeno terricolo.

Il patogeno *R. solani* (ceppo 1556 isolato da pomodoro) è stato allevato per 7 giorni alla temperatura di 25° C in coltura agitata (120 rpm) su PDB (Potato Dextrose Broth, Difco). La biomassa prodotta è stata filtrata con dischi di carta Miracloth sterili e lavata con acqua sterile; è stata quindi uniformemente distribuita nel terreno sterile alla dose di 0.35, 0.6 e 0.9 g l⁻¹ di terreno.

I semi di fagiolo trattati sono stati messi nel terreno ad una profondità di 3 cm ed i vasetti, frequentemente irrigati, sono stati mantenuti a 25° C in camera di crescita.

In tutti i saggi sono state previste tre repliche per ogni trattamento ed un controllo con terreno sterile privo del patogeno.

Il materiale vegetale infetto è stato posto su PDA per isolare il patogeno e quindi verificarne l'identità. La valutazione della malattia è stata effettuata a partire dal 7 giorno dalla semina e poi ad intervalli regolari di una settimana, valutando il numero dei semi germinati, l'altezza delle piantine, la percentuale di piantine morte o attaccate dal patogeno rispetto a quelle presenti nei controlli con terreno sterile.

2.3.2 Saggio *in vivo* nei confronti di *B. cinerea* (patogeno fogliare)

Per i saggi di biocontrollo con *B. cinerea* Pers. è stato utilizzato il ceppo patogeno 309 isolato da tabacco. Per ciascun trattamento sono stati messi a dimora 6 semi di fagiolo cv borlotto per ogni vaso contenente circa 1 litro di terreno sterile. Dopo 10-15 giorni dalla semina, le prime foglie vere sono state inoculate con 20 µl di una sospensione di spore su diverse foglie di una stessa pianta, inoculando ciascuna foglia in almeno due punti differenti. L'inoculo conteneva una concentrazione di 10⁷ spore/ml del ceppo 704 di *S. chrysospermum* da saggiare e 5 x 10⁶ o 1 x 10⁶ spore/ml di *B. cinerea* sospesi in un tampone contenente una La sospensione conidica è stata ottenuta allevando il fungo bersaglio su piastre Petri contenenti MEA (Malt Extract Agar, Difco) alla temperatura di 25° C. Dopo 10 giorni il micelio ed i conidi ottenuti sono stati raccolti, filtrati con lana di vetro e lavati con acqua distillata sterile. Allo scopo di facilitare la raccolta dei conidi idrofobici è stata aggiunta qualche goccia di Tween20 alla sospensione prima che venisse filtrata.

Il filtrato è stato centrifugato in modo da raccogliere i conidi, successivamente risospesi in una soluzione al 20 % di glicerolo. La concentrazione dei conidi impiegata nei saggi successivi è stata determinata con l'ausilio di una vetrino contaglobuli.

In tutti i saggi sono state previste tre repliche per ogni trattamento ed un controllo con un inoculo privo delle spore del patogeno.

I vasi sono stati coperti con buste di plastica trasparenti per ottenere un microclima saturo di umidità e condizioni favorevoli allo sviluppo della malattia. Le piante sono state mantenute in camere di crescita ed i vasi frequentemente scambiati di posto per mantenere omogenee le condizioni sperimentali.

Per la valutazione dei saggi sono stati considerati il numero e la dimensione delle macchie necrotiche e clorotiche (espresse in mm^2) formatesi sulle foglie.

2.4 Produzione di filtrati colturali attivi di *S. chrysospermum* (ceppo 704)

Dalle colonie di *S. chrysospermum* (ceppo 704) precedentemente allevate, un'aliquota della sospensione conidica è stata piastrata sul substrato di crescita PDA. Le colture di inoculo, ottenute mediante crescita a 25° C per 14-21 giorni, sono state successivamente impiegate per l'ottenimento di colture liquide. A questo proposito dal margine di colonie in attivo accrescimento sono stati prelevati otto dischetti di 5 mm di diametro con i quali è stata inoculata una soluzione di 500 ml di SM contenente:

- KH ₂ PO ₄	680 mg/l
- K ₂ HPO ₄	870 mg/l
- KCl	200 mg/l
- NH ₄ NO ₃	1000 mg/l
- CaCl ₂	200 mg/l
- MgSO ₄ · 7H ₂ O	200 mg/l
- FeSO ₄	2 mg/l
- MnSO ₄	2 mg/l
- ZnSO ₄	2 mg/l
- Saccarosio	5 g/l
pH 6 con HCl 1N	

La crescita delle colture è stata effettuata mediante incubazione a 25° C per 16-21 giorni sotto agitazione continua (120 rpm). Al termine dell'incubazione le colture sono state filtrate su carta Whatman con pori da 0.45 µm, consentendo così l'ottenimento

dei filtrati colturali richiesti per i saggi.

I filtrati sono stati difatti impiegati per i test di attività antagonista come descritto successivamente nel paragrafo 2.6.1.

2.5 Isolamento e caratterizzazione di metaboliti bioattivi

2.5.1 Isolamento e caratterizzazione della 2,4 diidrossi – 3,6-dimetilbenzaldeide

Il filtrato colturale di *S. chrysospermum* (ceppo 704) con pH 4.6, ottenuto come descritto nel paragrafo precedente, è stato concentrato a pressione ridotta alla temperatura di 50° C, quindi estratto per tre volte con acetato di etile dopo correzione del pH a 2.9 con HCl 1N.

La fase organica separata è stata anidrificata addizionando solfato di sodio anidro per 30 min in agitazione e concentrata a pressione ridotta, ottenendo un residuo finale di circa 291 mg.

All'estratto organico ottenuto è stata successivamente addizionata una miscela di cloroformio/isopropanolo (95:5, v/v), che ha fornito un precipitato insolubile (61.7mg), successivamente caratterizzato, il quale ha manifestato una blanda attività antagonista nei test biologici.

L'estratto organico solubile (229.7 mg), invece, è stato caricato su una colonna cromatografica (lunghezza 1.30 m; diametro: 4 cm) di gel di silice; le fasi eluenti impiegate sono state in successione: cloroformio/isopropanolo (95:5 v/v), cloroformio/isopropanolo (9:1 v/v), cloroformio/isopropanolo (8:2 v/v) ed infine metanolo (100%).

L'andamento cromatografico è stato monitorato mediante cromatografia su strato sottile (TLC- Thin-Layer-Chromatography) su lastre di gel di silice eluite con cloroformio/isopropanolo (95:5 v/v).

Dall'analisi cromatografica sono state ottenute 7 frazioni omogenee di cui due, la FRA 16-28 e la FRA 29-38, che hanno rispettivamente un peso di 32.4 e 41.7 mg, sono risultate particolarmente attive (rispettivamente 100% e 89% nei saggi di inibizione alla crescita) su *Botrytis cinerea*. In entrambe le frazioni si nota la presenza di un prodotto con il medesimo valore di Rf cromatografico.

L'ulteriore purificazione delle due frazioni attive è stata eseguita impiegando 4 TLC analitiche (0.25 mm di spessore), eluite con una miscela di cloroformio/isopropanolo (95:5 v/v). Dalle due TLC della frazione FRA 16-28 sono state evidenziate 5 bande, mentre dalle due TLC della frazione FRA 29-38 sono state evidenziate 6 bande, individuate mediante esposizione delle lastre cromatografiche alla lampada UV. Tale procedimento cromatografico ha condotto all'isolamento di 11 bande allargate di cui una, la banda denominata 1-29A (2.1 mg - Rf 0.49), è risultata attiva al biotest di inibizione della crescita.

Al fine di ottenere con un elevato grado di purezza l'estrazione del composto corrispondente alla suddetta banda, è stata eseguita una purificazione finale mediante HPTLC - High-performance-thin-layer-chromatography (0.25 mm di spessore) eluita con una miscela cloroformio/isopropanolo (95:5 v/v). Da quest'ultima operazione è stato possibile ricavare il composto voluto, nella misura di mg 1.5 (il grado di purezza è stato determinato

mediante una analisi con gascromatografo GC- 17A -Shimadzu con rivelatore a spettrometria di massa QP-5000 Shimadzu).

Il prodotto così ottenuto è stato sottoposto ad indagini per la determinazione strutturale utilizzando estensivamente metodi spettroscopici e spettrometrici.

Le cromatografie analitiche su strato sottile (TLC e HPTLC) sono state effettuate su lastre di gel di silice DC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ della Merck, pronte all'uso, dello spessore di 0.25 mm. La rilevazione delle lastre cromatografiche è stata effettuata mediante:

- esposizione a raggi UV (lunghezze d'onda di 253 e 365 nm);
- per esposizione ai vapori da sublimazione di iodio;
- nebulizzazione delle lastre con H₂SO₄ al 10% in metanolo e con acido fosfomolibdico al 5% in etanolo e successivamente riscaldandole in stufa a 100° C per 10 minuti.

Le cromatografie su colonna sono state effettuate mediante gel di silice Merck, Kieselgel 60, (0.063-0.2 µm).

I solventi ed i reattivi utilizzati sono tutti della Fluka (A.G. Bush, Svizzera) se non altrimenti indicato.

Il punto di fusione è stato determinato mediante Gallemkamp-Melting Point Apparatus.

Gli spettri UV sono stati registrati in Soluzione di CHCl₃ con Spettrofotometro Shimadzu UV 2100.

Gli spettri di massa in impatto elettronico sono stati ottenuti con un gas cromatografo GC-17A con rivelatore a spettrometria di massa QP-5000 Shimadzu (temperatura della sorgente 220°C) dotato di una colonna della lunghezza di 30 metri della Restek corporation (65% difenile - diametro interno 0.25 µm).

La cromatografia in fase gassosa è stata effettuata iniettando 1 ml di campione (Solvente: CHCl₃) a concentrazione 0.3 mg/ml a 150° C in condizioni di split chiuso. Il programma di riscaldamento ha previsto una temperatura di partenza di 60° C ed una rampa di riscaldamento di 15° C per 5min sino a 270° C per 10 minuti.

Lo spettro IR è stato registrato con uno spettrometro Perkin Elmer 1760-X solubilizzando il campione in CHCl₃.

Gli spettri ¹H-NMR e ¹³C-NMR sono stati registrati in CDCl₃ con un apparecchio Bruker AMX-600 operante a 600.13 e 150.92 MHz.

I chemical shift sono espressi in ppm.

2.5.2 Isolamento e caratterizzazione della anidrosepedonina

Dall'estratto organico ottenuto, come descritto nel precedente paragrafo, dal filtrato colturale di *S. chrysospermum* è stato ricavato un composto, la anidrosepedonina, che è stata purificata mediante tre successive cristallizzazioni a 4°C, impiegando lo stesso acetato di etile usato per l'estrazione iniziale e dilavando i cristalli con *n*-esano. Sono stati così ottenuti dei cristalli di colore giallo tenue.

L'isolamento del composto è stato seguito mediante TLC su lastre di gel di silice (DC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ della

Merck con spessore di 0.25 mm) e rilevando le bande esponendo le lastre ad una lampada UV con lunghezze d'onda di 253 nm e di 365 nm (eluente impiegato cloroformio/metanolo 70:30 v/v).

La caratterizzazione chimica del composto è stata effettuata mediante analisi degli spettri UV-Vis e degli spettri di massa.

Gli spettri UV sono stati registrati in Soluzione di CHCl₃ con Spettrofotometro UNICAM – Heyios β.

Gli spettri di massa Maldi-TOF sono ottenuti con uno spettrometro Shimadzu.

2.5.3 Isolamento di peptaiboli

Il filtrato colturale di *S. chrysospermum*, concentrato a pressione ridotta a 50°C, è stato estratto con *n*-butanolo, nuovamente concentrato e successivamente trattato con esano. La frazione insolubile è stata dissolta in acqua e purificata mediante cromatografia a fase inversa su colonna C18 (Resteck) (eluenti: H₂O 50 ml; H₂O/MeOH 50:50 v/v 50 ml; MeOH 50 ml). Eliminato il metanolo mediante distillazione a pressione ridotta, le frazioni purificate sono state liofilizzate ed utilizzate per le successive indagini.

La cromatografia è stato monitorata mediante TLC su gel di silice, come descritto nel precedente paragrafo.

Per la caratterizzazione chimica si è ricorso alla analisi spettrometrica LC-MS in electrospray e spettrometria Maldi – TOF.

Gli spettri di massa sono stati ottenuti mediante il sistema LC-MS con interfaccia API 100 (Atmospheric Pressure Ionisation) accoppiato ad una pompa HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Il gradiente utilizzato prevedeva l'uso di due fasi: la fase A era costituita da acqua, mentre la fase B da metanolo. Il gradiente partiva sempre dal 100% della fase A e vi ritornava, alla fine della corsa cromatografica che durava 30 minuti, per ripristinare le condizioni iniziali (Tabella 2.1). I dati sono stati elaborati utilizzando il Bio Multi View software (Sciex). I cromatogrammi sono stati monitorati a 220 nm.

<i>Tempo</i> <i>(min)</i>	<i>Fase A</i> <i>(%)</i>	<i>Fase B</i> <i>(%)</i>
0.1	100	0
30	50	50
50	50	50
55	0	100
75	100	0

Tabella 2.1. Gradiente lineare impiegato per il metodo LC-MS.

Gli spettri di massa Maldi-TOF sono ottenuti con uno

spettrometro Shimadzu.

2.5.4 Isolamento di enzimi coinvolti nei meccanismi di biocontrollo.

2.5.4.1 Purificazione di enzimi secreti da *S. chrysospermum*

Dopo 8 giorni di crescita il liquido colturale è stato raccolto separando il micelio per filtrazione ed è stato concentrato circa 20 volte mediante distillazione a pressione ridotta prima di essere dializzato in tampone citrato-fosfato 25mM pH 6.0.

Le proteine sono state purificate come descritto in letteratura (Lorito *et al.*, 1994a) utilizzando cromatografia su gel (gel filtration), seguita da un ultimo passaggio su Rotofor o in alternativa direttamente mediante elettroforesi preparativa Prep Cell (Biorad). Le frazioni finali sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti per accertare l'avvenuta purificazione.

2.5.4.2 Saggi di attività enzimatica di chitinasi e glucanasi secrete da *S. chrysospermum*

Per valutare la produzione enzimatica, *S. chrysospermum* è stato

allevato in coltura liquida in presenza di diverse sorgenti di carbonio.

Beute contenenti 50 ml di PDB sono state inoculate con 40 μ l di una sospensione di conidi (1×10^6 /ml) e lasciate in agitazione per 48 ore a 25° C. La biomassa prodotta, raccolta con l'ausilio di un setaccio, è stata trasferita asetticamente in 250 ml di mezzo salino SM (Harman *et al.*, 1993) contenente l'1% (peso/volume) di saccarosio, il 4% (peso/volume) di chitina colloidale (Schirmbock *et al.*, 1994) o il 2% di glucosio.

I filtrati colturali sono stati raccolti dopo 5 giorni e sottoposti a dialisi in acqua a 4° C, utilizzando membrane con esclusione molecolare a 12 kDa. Infine, i filtrati dializzati sono stati concentrati circa 20 volte usando il PEG 8.000 (polietilenglicole) e conservati a -20° C fino al loro uso per i saggi enzimatici o per le successive fasi di purificazione.

Le concentrazioni di proteine totali nei vari filtrati sono state determinate con il Micro BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL) (Sigma), e nei saggi comparativi le concentrazioni nei campioni saggiati sono state equalizzate. L'attività endochitinasica è stata misurata quantificando la riduzione di torbidità di una sospensione di chitina colloidale 10 mg/ml in tampone potassio fosfato 50 mM pH 6.7 (Harman *et al.*, 1993). Per effettuare questo saggio, sono stati messi ad incubare, in tubi da 10 ml, 500 μ l di sospensione di chitina e 500 μ l di frazioni di preparato da saggiare, per 24 ore a 30° C. Terminata l'incubazione, il volume nei tubi è stato portato a 5 ml con acqua bidistillata sterile ed è stata misurata l'assorbanza ottica a 510 nm mediante lettura spettrofotometrica. La riduzione di torbidità

della sospensione è stata calcolata sulla base del valore ottenuto per i controlli (presi come 0% di riduzione) contenenti acqua invece del preparato da analizzare.

Per determinare l'attività esochitinasica, è stato utilizzato un saggio effettuato in piastre ELISA, in grado di distinguere tra l'attività N-acetilglucosaminidasica (NAGase) e quella chitobiosidasica (biase).

Il substrato di reazione usato per misurare l'attività glucosaminidasica è il *p*-nitrofenil- β -D-N-acetilglucosaminide (Sigma), mentre per l'attività chitobiosidasica è stato utilizzato il *p*-nitrofenil- β -D-N-N'-diacetilchitobiosio (Sigma). Entrambi i substrati sono stati disciolti ad una concentrazione di 0,3 mg/ml in tampone potassio fosfato 50 mM pH 6.7, posti nei pozzetti della piastra a cui sono stati aggiunti 30 μ l di substrato enzimatico, 10 μ l di preparato da saggiare, e 50 μ l di tampone, eccetto che nei controlli dove in sostituzione del preparato è stato messo solo tampone. La piastra è stata incubata a 50° C per 30 minuti, e poi sono stati aggiunti 30 μ l di Na₂CO₃ 0,4 M per arrestare la reazione enzimatica. Attraverso la misura dell'assorbanza a 405 nm (spettrofotometro Titerteehk) è stata valutata la quantità di *p*-nitrofenolo rilasciato dall'attività enzimatica.

L'attività β -1,3 glucanasica è stata determinata misurando secondo Ashwell (1957) la quantità di gruppi riducenti rilasciati dall'attività enzimatica su laminarina (un polimero del glucosio con legami β -1,3), come descritto da Lorito *et al.* (1994 a).

Per effettuare questo saggio è stata preparata una soluzione di laminarina (Sigma) di 1 mg/ml in tampone citrato-fosfato 50 mM pH 6,7. Duecentocinquanta µl del suddetto substrato sono stati aggiunti a 250 µl di preparato da saggiare (acqua nei controlli) in tubi di polipropilene da 10 ml. I tubi sono stati incubati a 37° C per 2 ore in leggera agitazione. Contemporaneamente sono stati preparati gli standard per la curva di taratura utilizzando crescenti concentrazioni di glucosio (20, 40, 80, 120, 160, 200, 240 µg/ml). Terminata l'incubazione, alle miscele di reazione sono stati aggiunti 250 µl di reagente rameico (fosfato sodico bibasico 28 gr/L, tartrato potasso-sodico 40 gr/L, NaOH 1N 100 ml/L, solfato di rame pentaidrato 10%, solfato anidro di sodio 180 gr/L). I campioni così trattati sono stati incubati a 120° C per 20 minuti e poi raffreddati rapidamente su ghiaccio. Ad essi sono stati aggiunti 250 µl di arseniomolibdato di ammonio (ammonio molibdato 50 gr/lt, acido solforico concentrato 42 ml/L, sodio arsenato 6 gr/L).

Tutti i campioni sono stati portati, con l'aggiunta di acqua, ad un volume finale di 8,5 ml prima di effettuare la lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 510 nm. I gruppi riducenti rilasciati dall'attività enzimatica sono stati stimati come glucosio equivalenti mediante confronto con la curva di taratura.

Ogni saggio enzimatico è stato effettuato con almeno tre repliche per ogni campione.

2.6 Saggi di attività biologica dei singoli composti e dei filtrati culturali

2.6.1 Saggi di antibiotici

Per la determinazione dell'attività biologica sono stati effettuati dei saggi in condizioni di sterilità utilizzando come fungo bersaglio la *Botryotinia fuckeliana* fc. *Botrytis cinerea*. L'attività biologica monitorata ha valutato, in particolare, la germinazione dei conidi e l'allungamento del tubetto germinativo del fungo bersaglio.

Il saggio è stato condotto a 25° C su piastre ELISA tipo Falcon 3911 da 96 pozzetti; in ogni pozzetto sono stati caricati 20 µl di tampone di germinazione, 10 µl di sospensione conidica (2000 spore per ogni pozzetto) e 15 µl di sostanza da saggiare a varie concentrazioni.

Il tampone di germinazione impiegato è rappresentato da una soluzione 20 mM di fosfato di potassio e 20 mM di glucosio. La sospensione conidica, ottenuta come precedentemente descritta (par. 2.3.2) è stata aliquotata in frazioni aventi la concentrazione di 10⁵ spore/ml.

I composti saggiati sono stati:

- o la 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide isolata dai filtrati culturali di *S. chrysospermum* (solvente impiegato nel saggio: dimetilsolfossido [DMSO]/acqua - 2/98 v:v);

-
- l'orcinolo (solvente impiegato nel saggio acqua), il resorcinolo (solvente impiegato nel saggio dimetilsolfossido [DMSO]/acqua - 2/98 v:v) e il 2,5-dimetilresorcinolo (solvente impiegato nel saggio: dimetilsolfossido [DMSO]/acqua - 2/98 v:v) (Fluka - A.G. Bush, Svizzera) analoghi strutturali della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide;
 - gli enzimi coinvolti nel biocontrollo ed isolati dai filtrati;
 - le miscele contenenti gli enzimi coinvolti nel biocontrollo e la 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide;
 - la anidrosepedonina (solvente impiegato nel saggio: dimetilsolfossido [DMSO]/acqua - 2/98 v:v);
 - gli estratti ottenuti secondo la metodica di estrazione dei peptaiboli (solvente impiegato nel saggio: acqua).

La lettura dei saggi è stata effettuata, rispettivamente, dopo 6 e 48 ore di incubazione mediante microscopio ottico invertito, ed è espressa come percentuale di germinazione relativa al controllo trattato con 15 µl di acqua bidistillata.

Per ottenere tale valore percentuale è stato calcolato il numero delle spore germinate per ogni 100 spore presenti nel controllo ed esso è stato confrontato con i valori ottenuti nei trattamenti con le varie sostanze da saggiare. Dividendo il valore delle spore germinate nel pozzetto con la sostanza da saggiare per il valore delle spore del controllo e moltiplicando per cento si ottiene la percentuale di germinazione, il cui complemento a cento fornisce la percentuale di inibizione. Il confronto con il solvente serve a valutare l'effetto dello stesso sulla germinazione delle spore. Ogni conta di spore germinate è stata effettuata in triplicato

(Lorito *et al.*, 1996).

2.6.2 Saggi di fitotossicità

Il saggio è stato condotto sulla 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide impiegando quale solvente una miscela di DMSO/H₂O (2:98 v/v) a differenti concentrazioni della molecola e come controllo il solo solvente privo della sostanza da saggiare. L'attività fitotossica della molecola è stata monitorata mediante infiltrazione su foglie di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* cv borlotto). Le infiltrazioni sono state effettuate su due nervature fogliari per ogni pianta saggiata.

I livelli di fitotossicità sono stati ottenuti misurando l'area necrotica dopo 6 e 48 ore ed il valore è stato espresso attribuendo un punteggio pari a 4 al sintomo di necrosi più consistente ed 1 al minimo.

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte per ogni trattamento.

2.7 Sintesi chimica della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide

La sintesi chimica della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide è stata realizzata secondo la procedura messa a punto da Casiraghi *et al.* (1980) alla quale sono state applicate alcune modifiche.

In un pallone a tre colli da 250 ml equipaggiato con un condensatore a riflusso, un termometro ed una sorgente di azoto, sono stati addizionati toluene anidro (10 ml), 2,5-dimetilresorcinolo (690 mg, 5 mmol), tetracloruro di stagno (IV) (130 mg, 0.5 mmol) e tributilammina (370 mg, 2 mmol). La miscela di colore giallo è lasciata in agitazione per 20 minuti a 60° C. Successivamente è stata aggiunta la p-formaldeide (330 mg, 11 mmol) e la soluzione, che ha assunto un colore rosso, è stata portata a 100 ± 2 °C per 8 ore.

Dopo averla raffreddata, la miscela di reazione è stata trattata con acqua distillata, acidificata a pH 2 con HCl 1 N ed estratta con etere etilico. L'estratto etero, separato con imbuto separatore, è stato lavato con una soluzione satura di cloruro di sodio, anidrificato con solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. La 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide è stata purificata mediante ricristallizzazione in acetato di etile.

La reazione è stata monitorata mediante TLC su lastre di gel di silice dello spessore di 0.25 mm (DC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ della Merck). La rilevazione delle lastre cromatografiche è stata effettuata come già descritto nei precedenti esperimenti.

La caratterizzazione chimica della molecola è stata completata

mediante analisi degli spettri di massa che sono stati ottenuti mediante il sistema LC-MS con interfaccia API 100 (Atmospheric Pressure Ionisation) accoppiato ad una pompa HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Il toluene anidro è stato ottenuto aggiungendo 10 mg di litio alluminio idruro a 50 ml di toluene e lasciando reagire la miscela per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente la miscela è stata filtrata e la soluzione limpida distillata a pressione ridotta.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

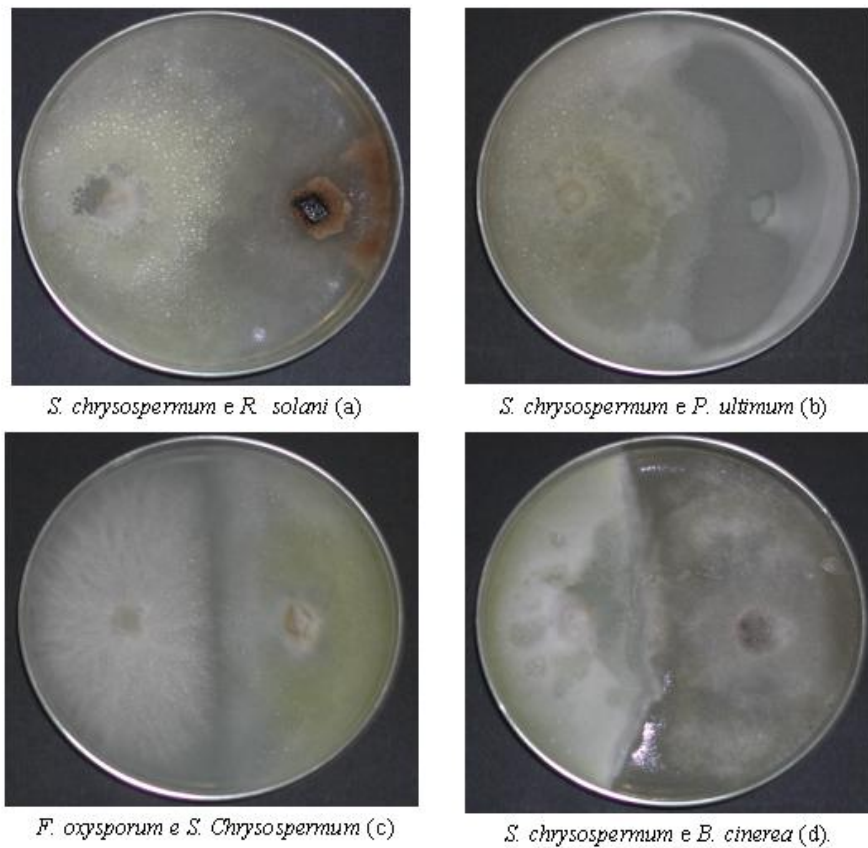
3.1 Saggi di attività *in vitro*

Le capacità di biocontrollo *in vitro* di *S. chrysospermum* sono state già dimostrate nei confronti dei patogeni *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Zoina *et al.*, 1990). Prove preliminari effettuate anche *in vivo* in pieno campo hanno evidenziato che, tra vari ceppi saggiati, il 704 mostra le migliori attitudini antagoniste. Questo isolato è stato quindi scelto nel presente lavoro di tesi per lo studio delle capacità di biocontrollo di *S. chrysospermum*.

Una prima valutazione della capacità antagonistica è stata condotta mediante saggi *in vitro* confrontando direttamente in piastra il patogeno e l'agente di biocontrollo. I saggi sono stati realizzati nei confronti di alcuni tra i principali agenti di fitopatie, quali *R. solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*.

Nel caso di *R. solani* e di *P. ultimum*, dal momento che sul substrato impiegato tali microrganismi mostravano una velocità di crescita maggiore rispetto all'antagonista, i patogeni sono stati inoculati quando la colonia dell'antagonista aveva raggiunto i 5 cm di diametro. Nella Fotografia 3.1 è possibile notare la presenza degli aloni di inibizione prodotti da *Sepedonium* al margine delle colonie dei patogeni. In Tabella 3.1 sono riportati i dati relativi alle prove di antagonismo ottenuti per ciascun patogeno. L'azione antagonista risulta in tutti i casi ben evidente, anche se nei confronti di *P. ultimum* l'alone di inibizione ha raggiunto dimensioni maggiori. I dati così

ottenuti rappresentano la prima evidenza sperimentale dell'attività di biocontrollo svolta dal ceppo 704 di *S. chrysospermum*. La capacità del ceppo utilizzato di inibire la crescita delle specie fitopatogene su menzionate è stata successivamente confermata mediante saggi *in vivo*, così da ridurre l'incertezza dei dati causata dall'influenza della composizione del mezzo colturale sulle condizioni sperimentali (dati riportati nel paragrafo 3.2).



Fotografia 3.1: saggi di confronto diretto in piastra tra *S. chrysospermum* e *R. solani* (a), *P. ultimum* (b), *F. oxysporum* (c) e *B. cinerea* (d).

Tabella 3.1 - Prove di antagonismo in piastra

Patogeno	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>P. ultimum</i>
<i>S. chrysospermum</i>	I ++	I ++	I ++	I +++

I = Alone di inibizione stabile

(+++ => 1 cm - ++ => 0.5 cm e < 1 cm - + =< 0.5 cm)

Substrato impiegato: PDA; temperatura di incubazione: 25°C.

3.2 Saggi di attività *in vivo*

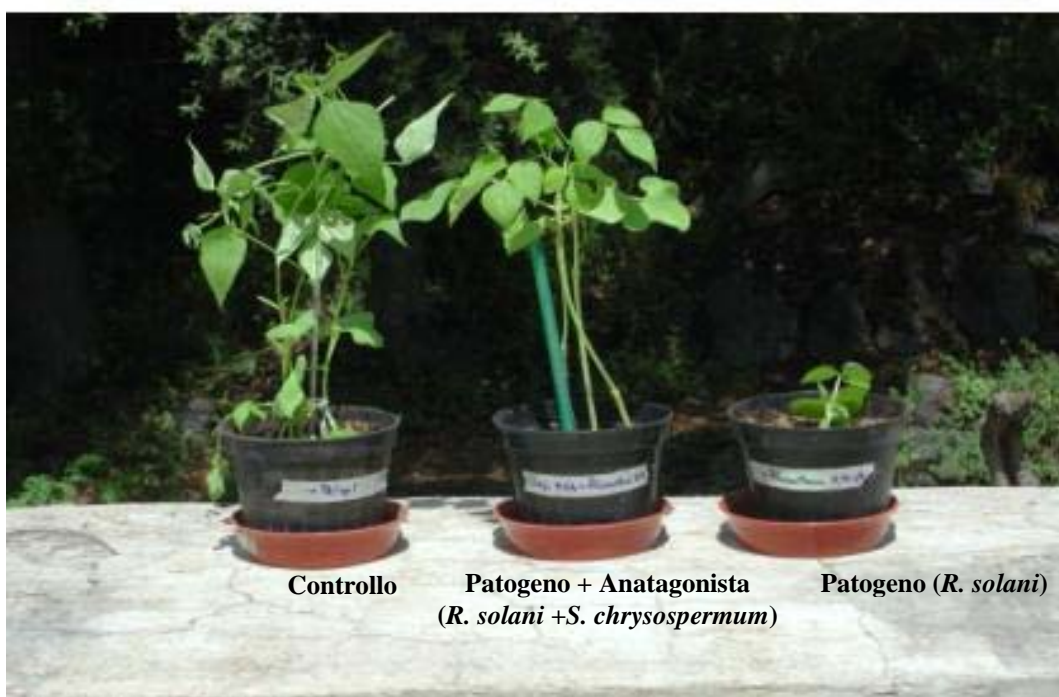
Al fine di valutare le capacità di biocontrollo *in vivo* del ceppo 704 di *S. chrysospermum*, sono stati condotti saggi nei confronti di due agenti fitopatogeni, di quali uno è un importante patogeno terricolo (*R. solani*) e l'altro un patogeno che attacca la parte aerea (*B. cinerea*).

3.2.1 Saggio *in vivo* nei confronti di *R. solani* (patogeno terricolo)

I saggi di biocontrollo eseguiti nei confronti di *R. solani* hanno mostrato una notevole capacità di *S. chrysospermum* di proteggere le piante dall'attacco dell'agente patogeno.

I test sono stati realizzati usando semi di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* cv borlotto), ospite su cui il patogeno provoca il cancro dell'ipocotile, seminati in terreno inoculato. Le prove sono state effettuate aggiungendo quantità crescenti di micelio di *R. solani* nel terreno sterile (rispettivamente 0,35, 0,6 e 0,9 g l⁻¹); tali concentrazioni si sono rivelate sufficienti per ottenere la comparsa dei sintomi tipici della patologia e quindi per la valutazione dell'esperimento.

I dati raccolti riguardano la percentuale di germinazione e di sopravvivenza dei semi trattati, nonché l'altezza media delle piante espresse in centimetri. Come si evidenzia dalla Fotografia 3.2, le piante i cui semi sono stati trattati con spore di *S. chrysospermum*, hanno sviluppato la malattia a livelli più bassi rispetto a quelle non trattate.



Fotografia 3.2. Saggio di biocontrollo *in vivo* su fagiolo nei confronti di *R. solani* (0.35 g l^{-1}) mediante l'impiego di *S. chrysospermum*. Trattamenti effettuati sui campioni (da sinistra): controllo senza alcun trattamento, semi trattati con sospensione di spore di *S. chrysospermum* in terreno inoculato con *R. solani*, semi non trattati in terreno inoculato con *R. solani*.

In figura 3.1 è riportata la percentuale di germinazione dei semi di fagiolo per ogni tipo di trattamento effettuato. L'effetto di biocontrollo di *S. chrysospermum* si manifesta con l'aumento della percentuale di germinazione dei semi trattati in presenza dell'antagonista.

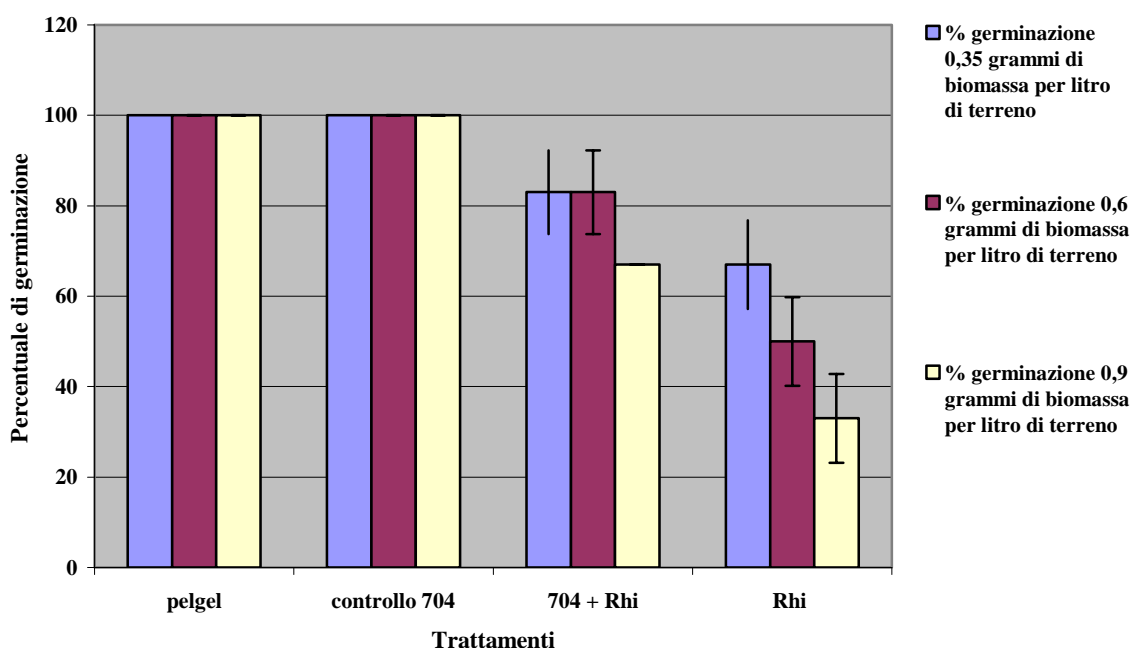


Figura 3.1: Percentuale di germinazione di semi di fagiolo in seguito al trattamento con spore di *S. chrysospermum* per il controllo di *R. solani*. Trattamenti: pelgel = controllo con semi trattati con pelgel; controllo 704 = controllo con semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum*; 704 + Rhi = semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum* in terreno inoculato con *R. solani*; Rhi = semi non trattati in terreno inoculato con *R. solani*.

In figura 3.2 ed in figura 3.3 sono riportate le percentuali di sopravvivenza dei semi di fagiolo 6 e 22 giorni dopo ciascun trattamento effettuato. Anche da questi dati è emerso il contributo di *S. chrysospermum* alla protezione dei semi nei confronti del patogeno.

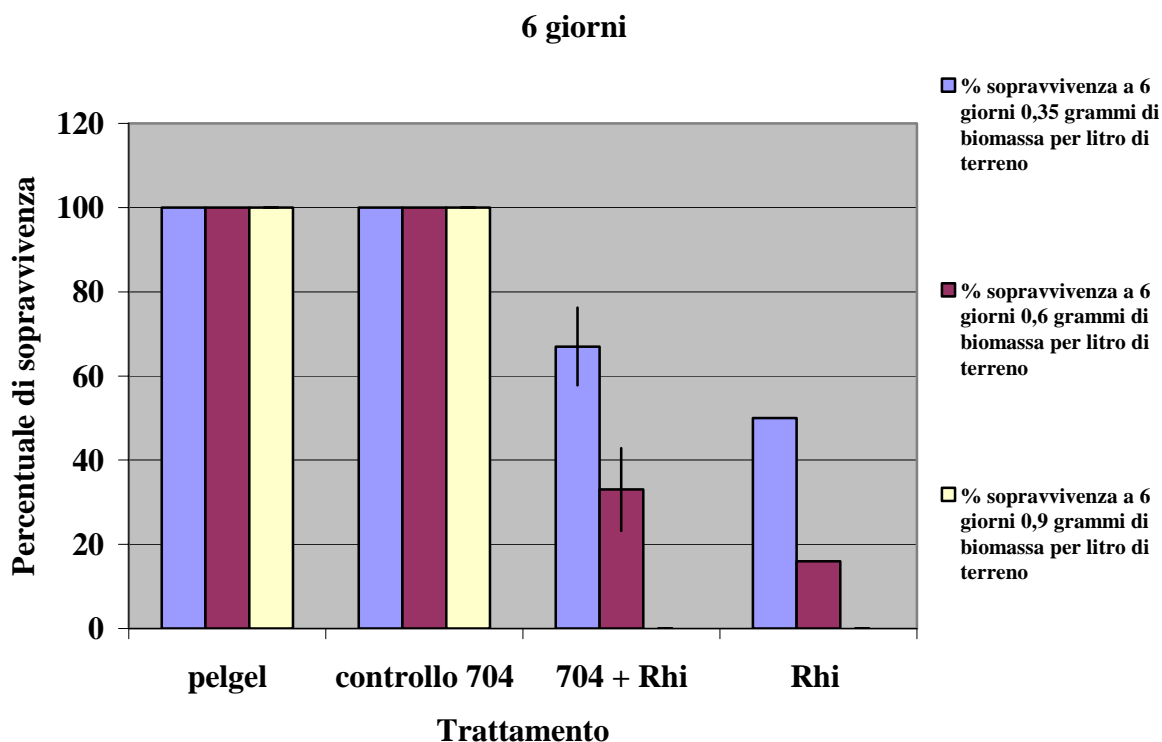


Figura 3.2: Percentuale di sopravvivenza al 6° giorno di trattamento con quantità crescenti di biomassa di *R. solani*. Trattamenti: pelgel = controllo con semi trattati con pelgel; controllo 704 = controllo con semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum*; 704 + Rhi = semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum* in terreno inoculato con *R. solani*; Rhi = semi non trattati in terreno inoculato con *R. solani*.

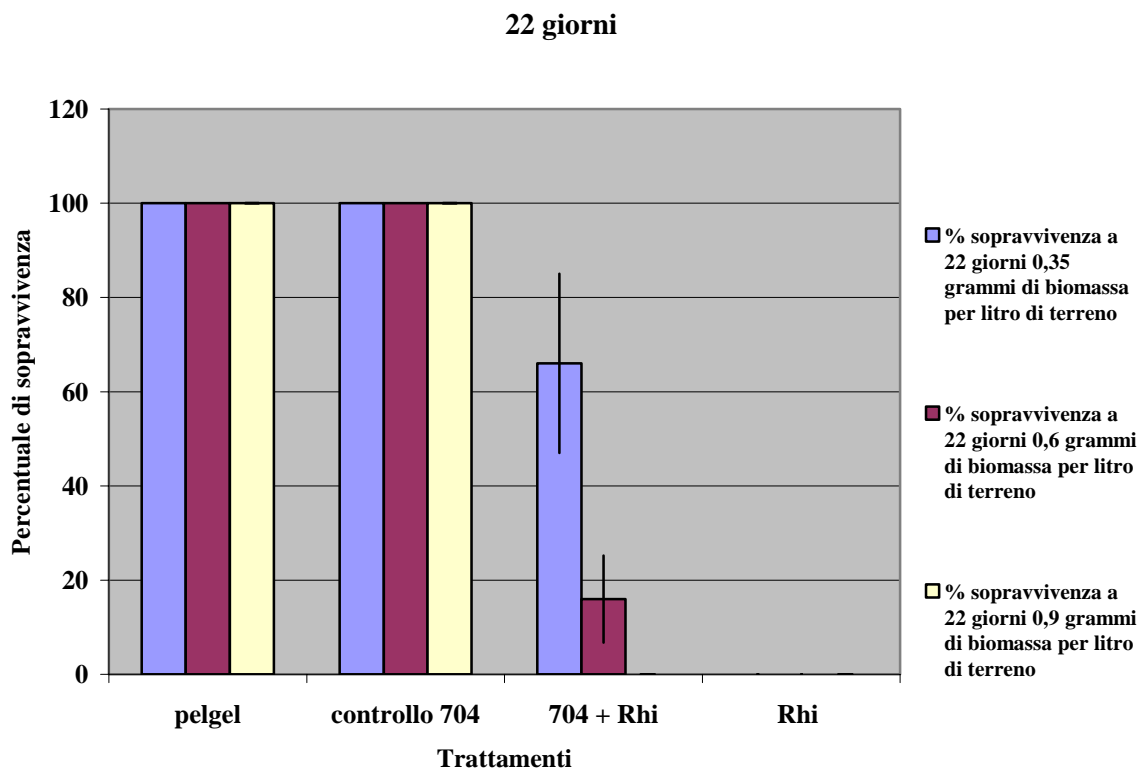


Figura 3.3: Percentuale di sopravvivenza al 22° giorno di trattamento con quantità crescenti di biomassa di *R. solani*. Trattamenti: pelgel = controllo con semi trattati con pelgel; controllo 704 = controllo con semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum*; 704 + Rhi = semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum* in terreno inoculato con *R. solani*; Rhi = semi non trattati in terreno inoculato con *R. solani*.

In figura 3.4 ed in figura 3.5 sono riportate le altezze medie delle piante di fagiolo 6 e 22 giorni, rispettivamente, dopo ciascun trattamento effettuato. Anche dall'analisi di questo dato emerge il contributo di *S. chrysospermum* alla protezione delle piante nei confronti del patogeno.

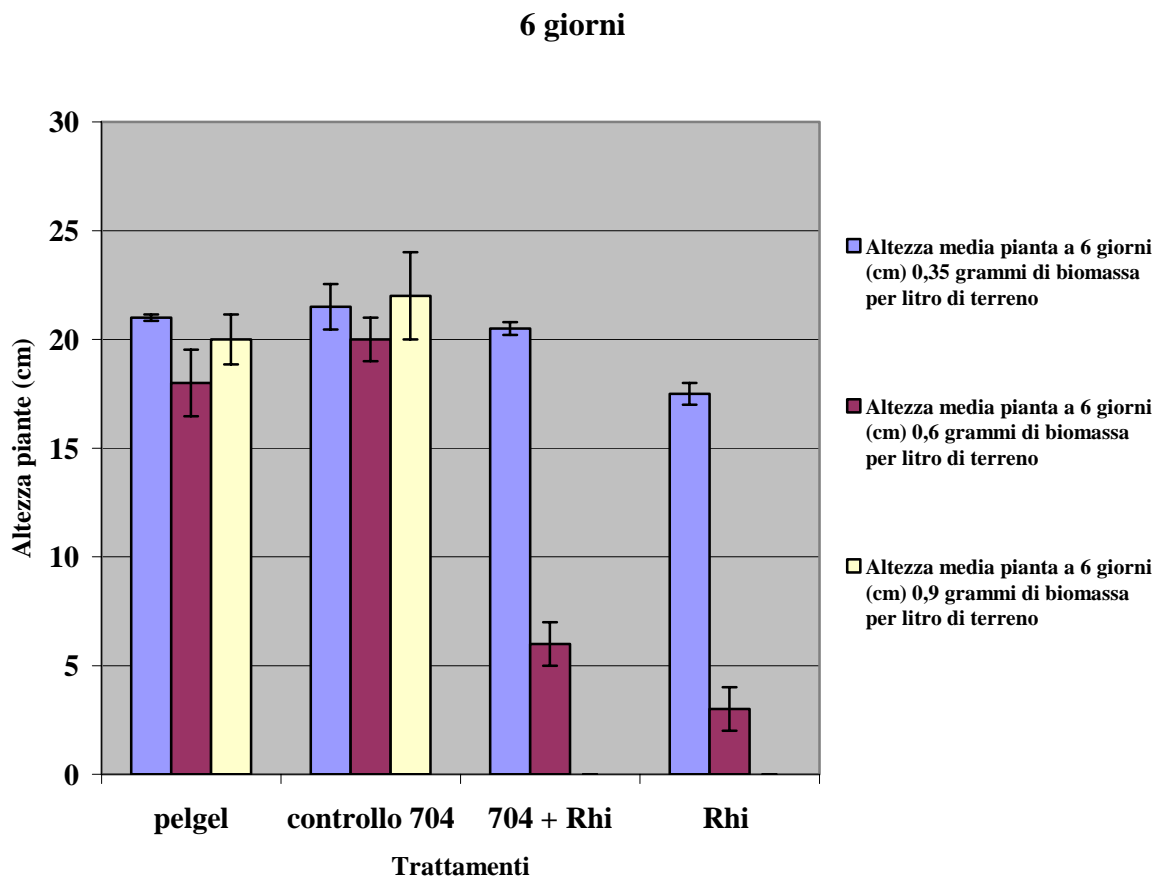


Figura 3.4: Altezza media delle piante al 6° giorno di trattamento con quantità crescenti di biomassa di *R. solani*. Trattamenti: pelgel = controllo con semi trattati con pelgel; controllo 704 = controllo con semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum*; 704 + Rhi = semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum* in terreno inoculato con *R. solani*; Rhi = semi non trattati in terreno inoculato con *R. solani*.

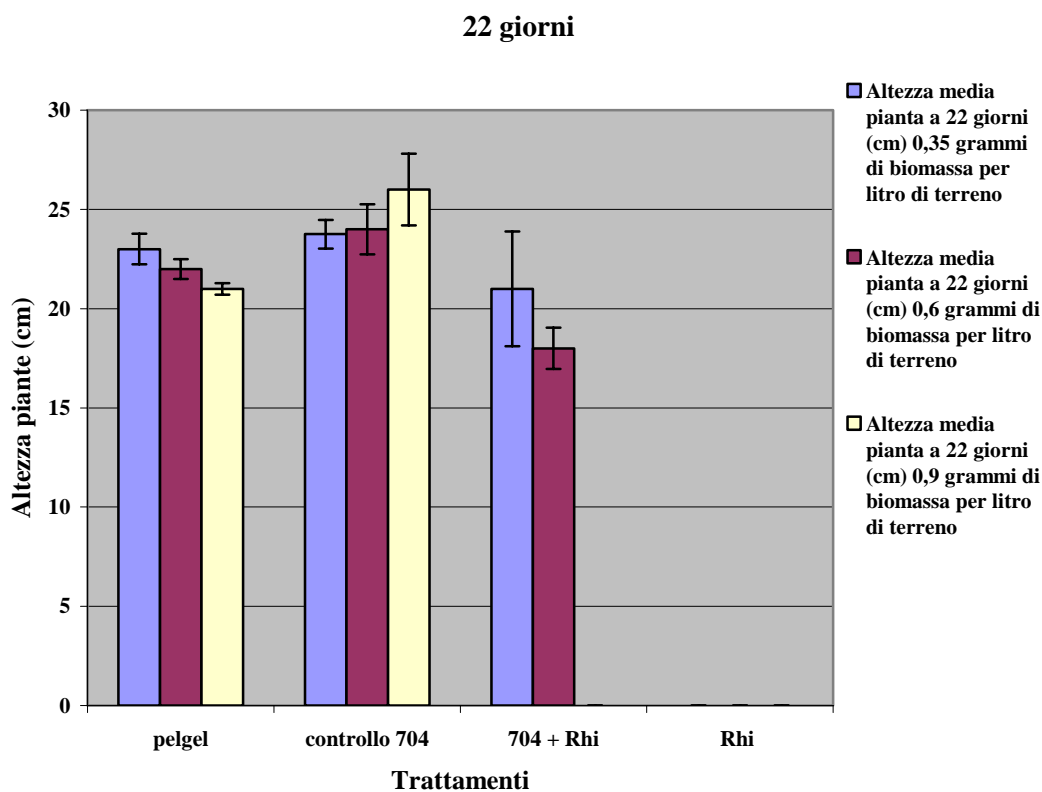


Figura 3.5: Altezza media delle piante al 22° giorno di trattamento con quantità crescenti di biomassa di *R. solani*. Trattamenti: pelgel = controllo con semi trattati con pelgel; controllo 704 = controllo con semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum*; 704 + Rhi = semi trattati con sospensione di spore del ceppo 704 di *S. chrysospermum* in terreno inoculato con *R. solani*; Rhi = semi non trattati in terreno inoculato con *R. solani*.

Dall'analisi dei dati è possibile evidenziare come la presenza del microrganismo antagonista, oltre ad avere un ruolo nella difesa dall'attacco dei patogeni, potrebbe favorire la crescita della parte epigea delle piante trattate.

Diversi autori hanno segnalato numerosi effetti diretti sulla pianta come conseguenza del trattamento dei semi o delle radici con funghi e batteri antagonisti ed in particolar con *Pseudomonas* spp e *Trichoderma* spp (Whipps,1997).

Sono stati infatti evidenziati, a seconda del trattamento eseguito della specie vegetale utilizzata, un aumento della germinazione, della produzione e della fioritura ed un significativo sviluppo della parte epigea ed ipogea. L'incremento della crescita si ipotizza sia legato alla produzione di vitamine, alla conversione di diversi composti presenti nel terreno in nutrienti utilizzabili dalla pianta e all'incremento della disponibilità e assimilabilità di alcuni minerali (Kleifeld and Chet, 1992).

Alcuni lavori eseguiti su cultivar di mais, pomodoro e tabacco mostrano che diverse specie di *Trichoderma* sono in grado di produrre una sostanza capace di incrementare la germinazione dei semi e lo sviluppo della parte aerea e dell'apparato radicale della pianta. Sono inoltre da evidenziare gli effetti positivi sulla crescita delle piante dovuti alla fissazione dell'azoto operata da *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp. e da *Pseudomonas* (Okon, 1985; Kloepper *et al.*, 1989; Hong *et al.*, 1991).

Questi dati, avvalorati dalla capacità dimostrate da alcune specie di *Trichoderma* di agire in sinergismo con i PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), e con i funghi micorizzogeni (Clavet *et al.*,

1993), appaiono particolarmente interessanti per l'applicazione di microrganismi nella lotta biologica compatibilmente con la presenza di agenti biologici simbiotici.

Il ceppo 704 di *S. chrysospermum* è stato impiegato nei saggi di controllo biologico contro *R. solani* allo scopo di valutare gli effetti dell'interazione sull'attività antagonista. Tutte le piante i cui semi sono stati trattati con le spore di questo microrganismo sono apparse generalmente più vigorose, hanno presentato una maggiore velocità di crescita, una maggiore percentuale di germinazione e una mortalità in presenza del patogeno nettamente inferiore rispetto alle stesse piante non trattate con l'antagonista. Tale evidenza, oltre a confermare i dati già presenti in letteratura in merito agli effetti benefici svolti dagli agenti di biocontrollo sulle piante, suggerisce l'utilizzo del ceppo di *S. chrysospermum* come biofitofarmaco o biofertilizzante.

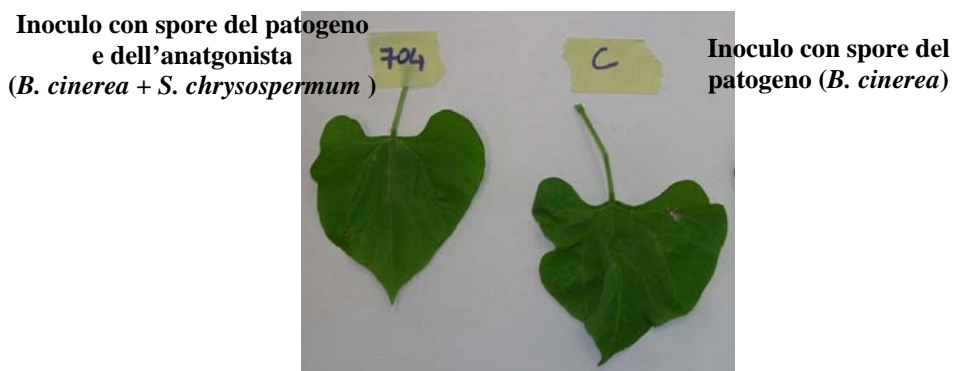
3.2.2 Saggio *in vivo* nei confronti di *B. cinerea*

Per i saggi di biocontrollo con *B. cinerea* sono stati utilizzati semi di fagiolo della stessa varietà impiegata per i saggi con *R. solani*: essi sono stati posti a germinare in vaso contenente terreno sterile. I test effettuati hanno mostrato una notevole capacità del ceppo impiegato di proteggere le piante dall'attacco di questo patogeno.

Dopo 10-15 giorni dalla semina le prime foglie vere sono state inoculate con 20 µl di una sospensione contenente una concentrazione di 10^7 spore/ml del ceppo 704 di *S. chrysospermum* e 5×10^6 o 1×10^6 spore/ml di *B. cinerea* sospese in un tampone di germinazione.

Per la valutazione dei test sono stati considerati il numero e la dimensione delle macchie necrotiche e clorotiche formatesi, rispettivamente, 48, 76 e 96 ore dopo l'inoculo.

Le piante le cui foglie sono state inoculate con spore di *S. chrysospermum* e *B. cinerea* hanno mostrato un quadro sintomatologico meno severo rispetto a quelle inoculate con il solo patogeno (Fotografia 3.3). Nelle Figure 3.6 e 3.7 si evidenzia in modo particolare come l'azione di biocontrollo si espliciti in modo più efficace nel caso in cui la concentrazione di spore di *B. cinerea* è di 1×10^6 spore/ml.



Fotografia 3.3: saggio *in vivo* nei confronti di *B. cinerea*; (a) piante di fagiolo le cui foglie sono state inoculate con spore di *S. chrysospermum* e *B. cinerea*, (b) foglie staccate da piante di fagiolo inoculate con spore di *S. chrysospermum* e *B. cinerea*.

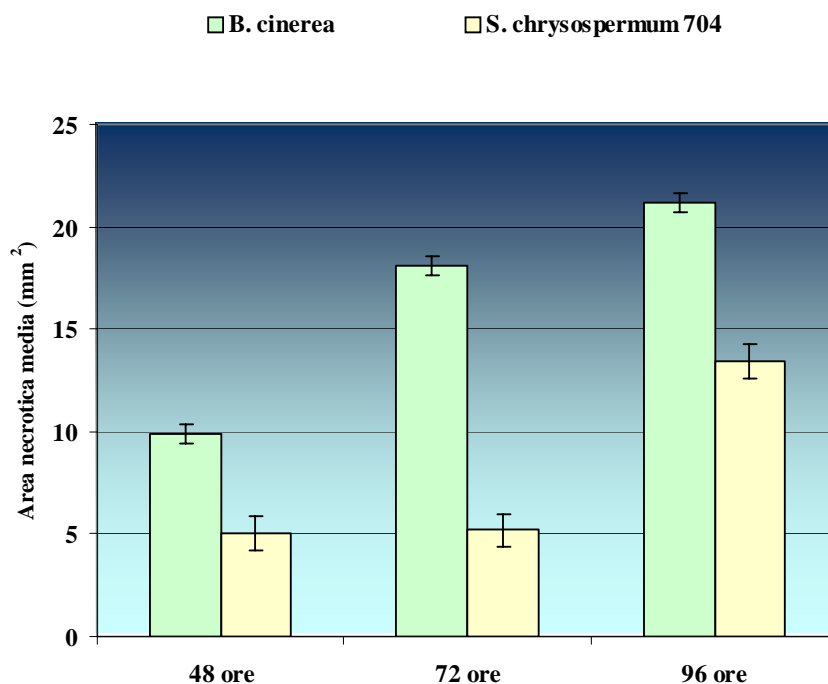


Figura 3.6: Valutazione dell'attività di biocontrollo *in vivo* su foglie di fagiolo nei confronti di *B. cinerea* (concentrazione di spore 1×10^6 spore/ml).

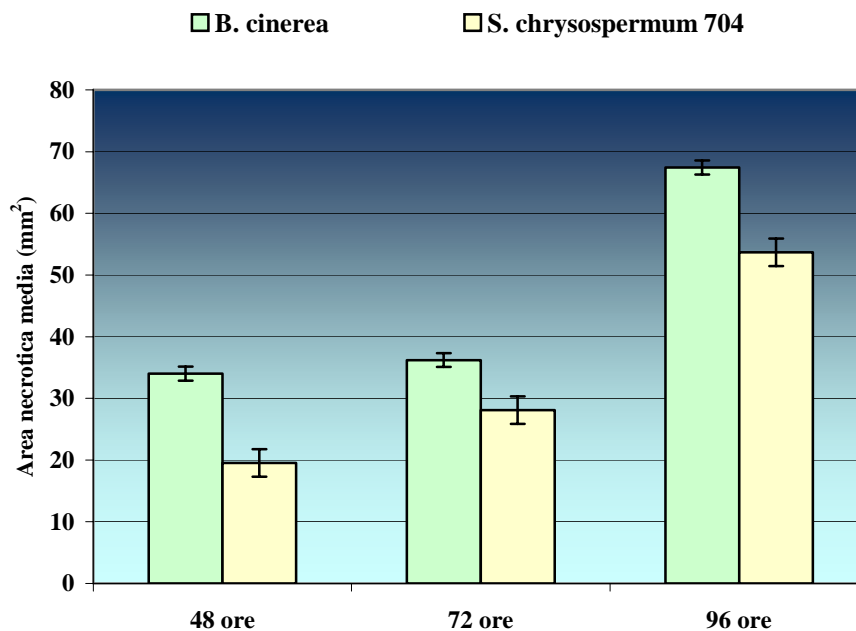


Figura 3.7: Valutazione dell'attività di biocontrollo *in vivo* su foglie di fagiolo nei confronti di *B. cinerea* (concentrazione di spore 5×10^6 spore/ml).

Gli esperimenti condotti hanno permesso di evidenziare che le piante le cui foglie sono state trattate con una miscela di spore dell'antagonista e del patogeno fogliare hanno mostrato una diminuzione dell'area necrotica o clorotica media inferiore rispetto ai relativi controlli privi dell'agente di biocontrollo.

A conferma del fatto che *S. chrysospermum* fosse un valido antagonista, i dati ottenuti hanno permesso di riportare l'attività di biocontrollo *in vivo* svolta dal microrganismo impiegato nei confronti di patogeni di varia natura.

Numerosi lavori presenti in letteratura hanno dimostrato l'efficacia riscontrata dall'agente di biocontrollo *T. harzianum*, da solo o in combinazione con altre specie di *Trichoderma* oppure con prodotti chimici, nei confronti di agenti patogeni quali ad esempio *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotinia* e *Botrytis* (Lorito *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 1998). Nel caso di *Trichoderma* l'elevato sinergismo riscontrato tra gli enzimi e i fungicidi o MACs (Membrane-Affecting Compounds), suggerisce l'applicazione di questi composti per migliorare la resistenza delle piante alle malattie (Woo *et al.*, 1998) e per la produzione di nuovi formulati anticrittogamici (Lorito *et al.*, 1994 a) che consentirebbero nella lotta integrata di ridurre la quantità di pesticidi chimici impiegati e di conseguenza anche l'impatto ambientale.

Ciò può risultare altrettanto vero per *Sepedonium*, dal momento che la riduzione della comparsa dei sintomi tipici delle patologie provocate dai microrganismi utilizzati nei saggi può far presupporre un ampio spettro di azione e di utilizzazione pratica di questo agente di biocontrollo.

3.3 Studio dei meccanismi di biocontrollo di *Sepedonium chrysospermum*

Nella fase successiva si è proceduto allo studio delle basi molecolari del meccanismo di biocontrollo in *S. chrysospermum*, attraverso la determinazione dei metaboliti secreti dal fungo.

3.3.1 Isolamento, purificazione e caratterizzazione chimica della 2,4 diidrossi – 3,6 dimetilbenzaldeide

S. chrysospermum è stato allevato su terreno di crescita 0.2 SM (CS) contenente saccarosio (2%), per l'ottenimento del brodo colturale.

Da un'indagine preliminare l'estratto organico del ceppo di *S. chrysospermum* in esame è risultato attivo al test di antibiosi nei confronti di *B. cinerea*. La valutazione è stata effettuata mediante il saggio d'inibizione della germinazione delle spore e dell'allungamento del tubetto germinativo del patogeno. In figura 3.8 è riportato lo schema di estrazione e purificazione messo a punto a partire da filtrati colturali di *S. chrysospermum* per l'ottenimento della 2,4 diidrossi – 3,6 dimetilbenzaldeide.

In particolare il brodo di coltura filtrato e concentrato (acidificato con HCl 1N a pH 3) ha mostrato una buona attività di inibizione nei saggi nei confronti di *B. cinerea*.

Le fasi di estrazione dell'estratto organico sono state condotte mediante l'impiego di acetato di etile in quanto, dalle prove effettuate,

è risultato il solvente più adatto, dal momento che evitava la formazione di emulsioni e ha consentito il recupero della maggiore quantità di principi attivi contenuti nel filtrato.

L'estratto organico, ottenuto dopo l'allontanamento del solvente, è apparso come un solido di colore giallo intenso di cui la parte solubile in CHCl₃/iso-OH (95:5 v/v) ha manifestato al test di inibizione su *B. cinerea* una elevata attività antagonistica (100% di attività inibitoria ottenuta saggiando il preparato a 100 ppm) mentre il residuo insolubile si è dimostrato blandamente attivo (10 % di attività inibitoria ottenuta saggiando il preparato a 100 ppm).

La misura dell'attività antibiotica è stata ottenuta confrontando il numero di spore del campione, la cui germinazione è risultata inibita dai composti saggiati, con il controllo contenente il solo solvente (rappresentato da una miscela di DMSO –dimetilsolfossido - ed H₂O in rapporto 2:8 v/v) e riportando il valore in percentuale.

La componente solubile è stata frazionata su colonna di gel di silice impiegando un sistema di eluizione a gradiente di polarità (CHCl₃/iso-OH 95:5 v/v; CHCl₃/iso-OH 9:1 v/v; CHCl₃/iso-OH 8:2 v/v; MeOH) ed ottenendo 7 frazioni omogenee. In Tabella 3.2 sono riportati gli intervalli di R_f delle singole frazioni.

Tabella 3.2: intervalli di Rf delle singole frazioni ottenute dalla separazione cromatografica su colonna di gel di silice della componente solubile in CHCl₃/iso-OH 95:5 v/v dell'estratto organico.

FRAZIONE	INTERVALLO DI Rf
FRA T-10	0.97-0.84
FRA 11-15	0.76-0.67
FRA 16-28	0.61-0.48
FRA 29-38	0.56-0.47
FRA 39-52	0.37-0.28
FRA 53-71	0.26-0.17
Sc. MeOH	0.00-0.08

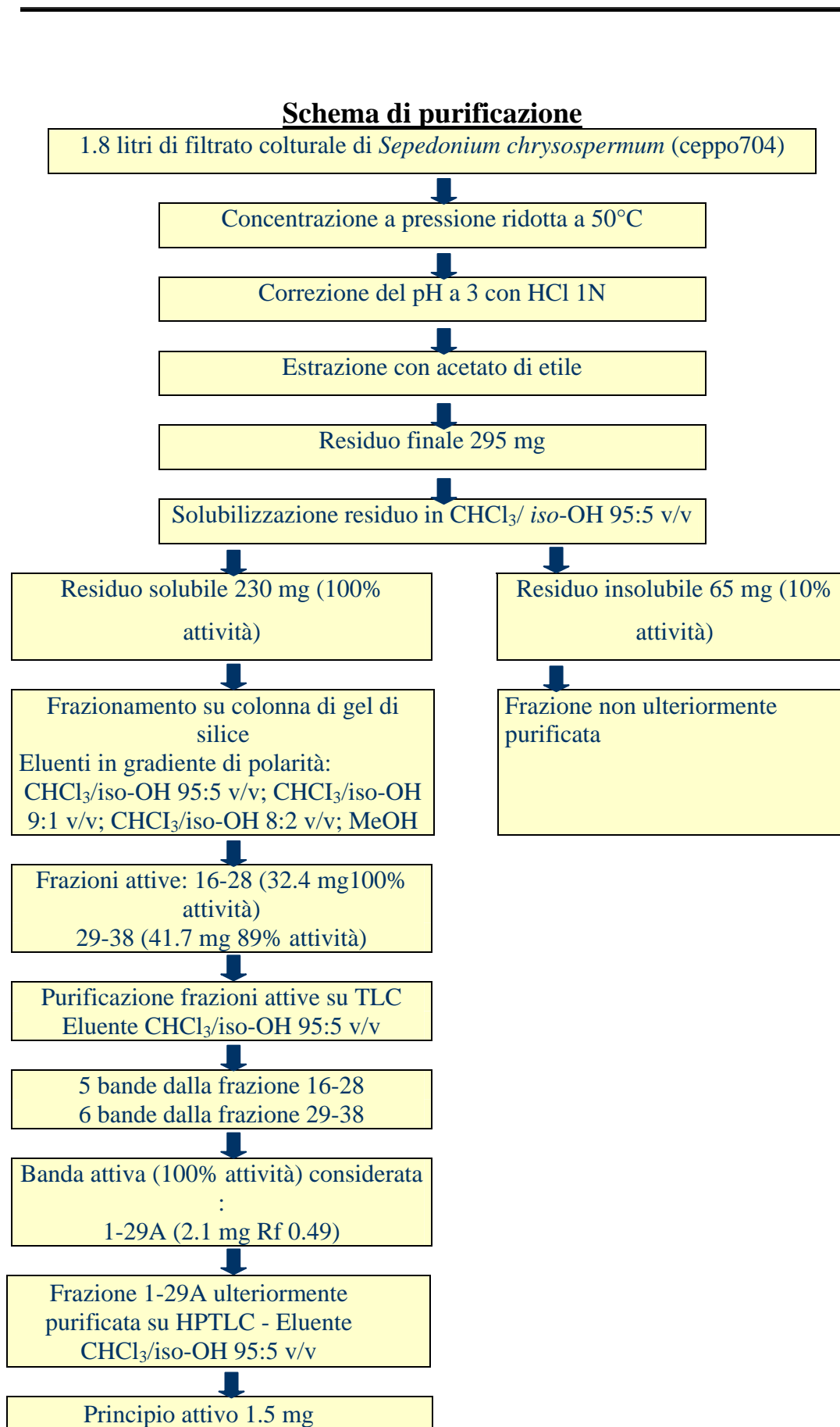


Figura 3.8: Schema di purificazione del metabolita attivo

I campioni ottenuti dalla separazione cromatografica sono stati successivamente sottoposti a valutazione della attività e del peso secco. In Tabella 3.3 è riportata la quantità di sostanza recuperata da ciascuna frazione con le rispettive attività biologiche. Si può osservare che il massimo dell'attività è presente nelle frazioni 16-28 e 29-38.

Tabella 3.3: quantità di sostanza recuperata da ciascuna frazione cromatografica con le rispettive attività biologiche

Frazione	Peso in mg	Percentuale di inibizione della germinazione delle spore di <i>B. cinerea</i>
T-10	12.4	32 %
11-15	15.6	27 %
16-28	32.4	100 %
29-38	41.7	89 %
39-52	38.9	60 %
53-71	22.8	58 %
MeOH	65.9	37 %

Al fine di purificare ulteriormente le frazioni ottenute, sono state utilizzate 4 TLC preparative dalle quali sono state isolate, rispettivamente, 5 bande cromatografiche dalla frazione 16-28 e 6 bande dalla frazione 29-38. Tali frazioni sono state sottoposte ai saggi di attività nei confronti di *B. cinerea*. La frazione indicata come 1-29A è risultata particolarmente interessante in quanto dotata di elevata attività. Il composto isolato, cromatografato su TLC di silice

utilizzando un sistema eluente composto da una miscela $\text{CHCl}_3/\text{iso-OH}$ 95:5 v/v, ha un R_f di 0.49.

La frazione 1-29A, analizzata per HPLC su colonna eluita in modalità isocratica con $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (6:4 v/v), ha mostrato un picco cromatografico principale dopo 10.77 minuti di eluizione (Figura 3.9).

Un ulteriore passaggio di purificazione è stato realizzato su lastre HPTLC eluite con $\text{CHCl}_3/\text{iso-OH}$ 95:5 v/v.

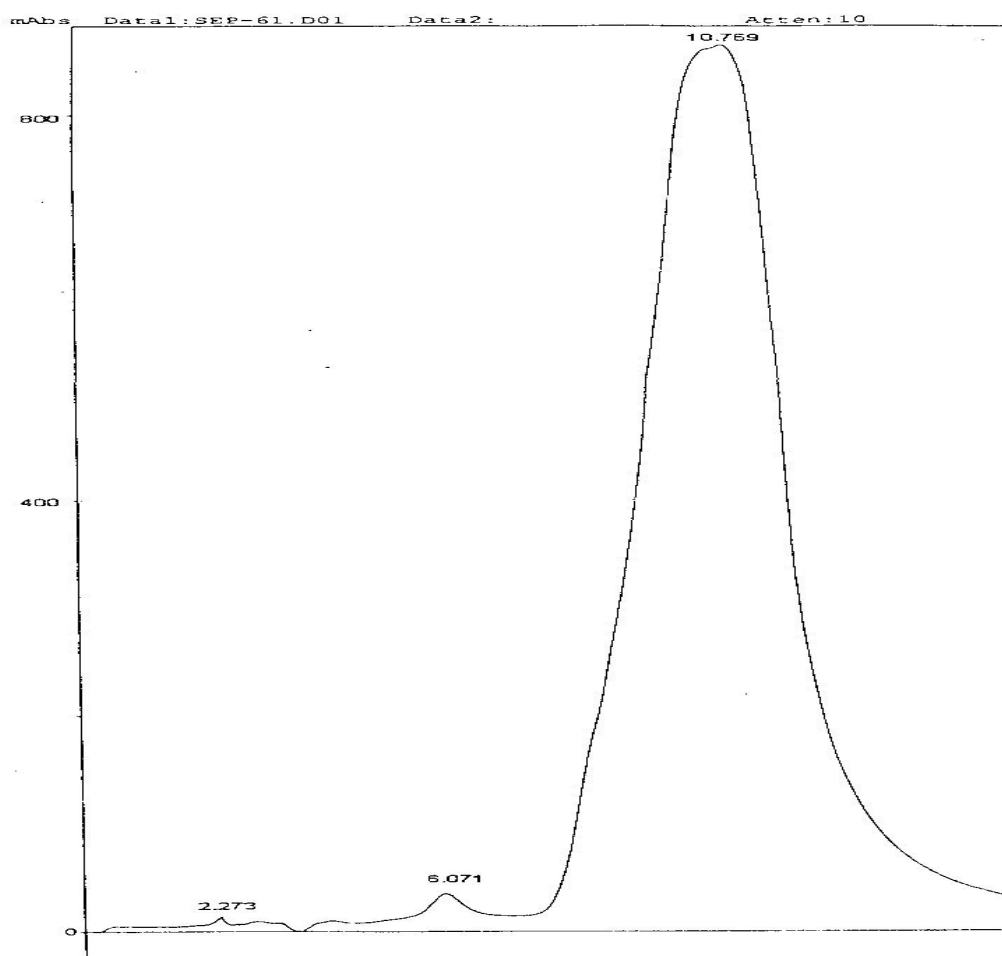


Figura 3.9: frazione 1-29A, analizzata per HPLC su colonna eluita in modalità isocratica con $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (6:4 v/v); picco cromatografico principale a 10.77 minuti.

Il grado di purezza finale del metabolita isolato è stato verificato mediante gascromatografia con rivelatore a spettrometria di massa ad impatto elettronico (GC/MS); l'analisi ha fornito un singolo picco cromatografico ad un tempo di ritenzione pari a 13.06 minuti (Figura 3.10).

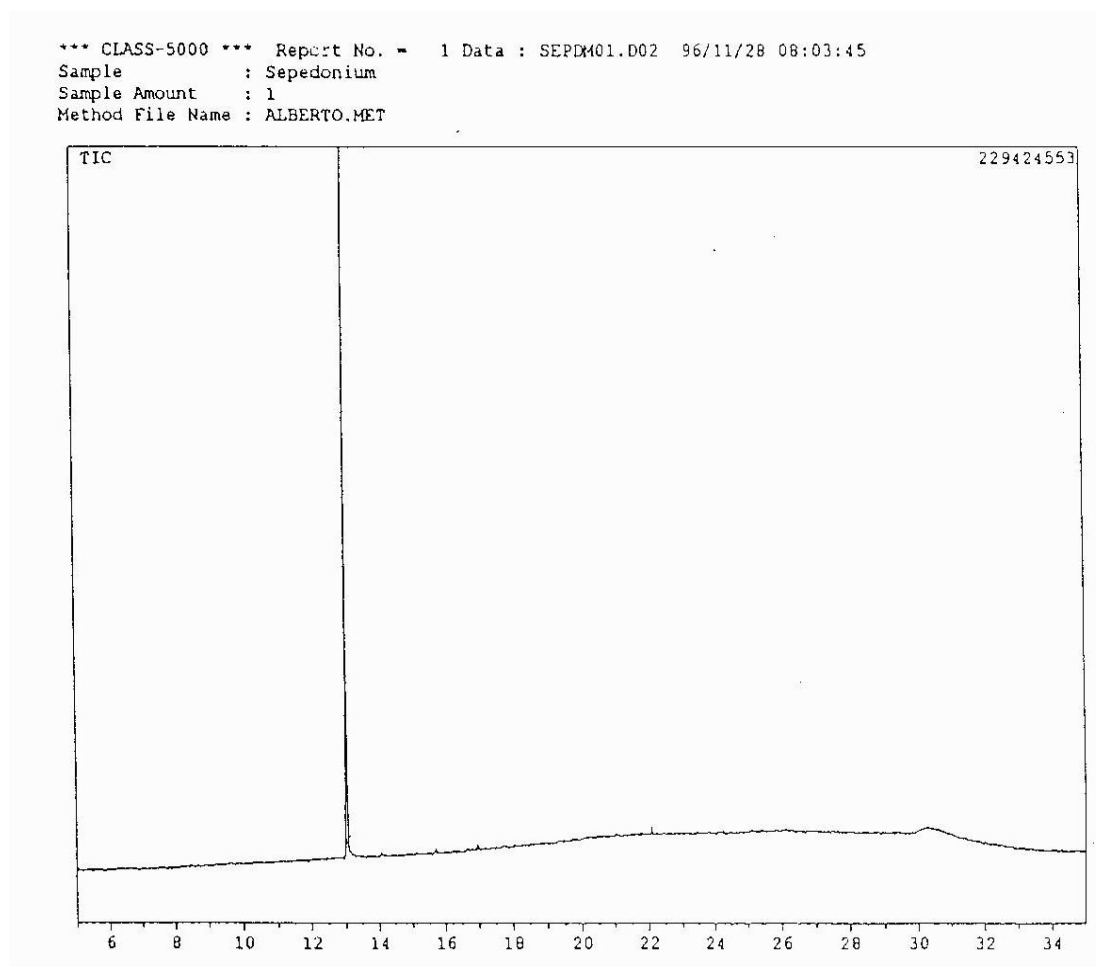


Figura 3.10: purezza finale del metabolita isolato verificata mediante gascromatografia con rivelatore a spettrometria di massa ad impatto elettronico (GC/MS); singolo picco cromatografico ad un tempo di ritenzione pari a 13.06 minuti.

I test di inibizione della germinazione delle spore di *B. cinerea* hanno confermato l'elevata attività (100%) del principio isolato (concentrazione impiegata: 100 ppm).

Il composto isolato 1-29A si presenta, in seguito all'allontanamento della miscela di solventi $\text{CHCl}_3/\text{iso-OH}$ (95:5 v/v), come un solido amorfo bianco ed è risultato resistente alla cristallizzazione. Il suo punto di fusione è risultato essere di 137-140°C, e lo spettro UV mostra un picco massimo di assorbimento a λ_{max} 294.5 nm con un valore di ϵ_{max} di 591.69 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ in CHCl_3 ed un secondo picco di assorbimento a λ_{max} 240.50 nm con un valore di ϵ_{max} di 241.1 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ in CHCl_3 .

Lo spettro IR riportato in Figura 3.11 presenta varie bande caratteristiche. In particolare si evidenzia la presenza:

- di un picco caratteristico a 1723 cm^{-1} relativo alla vibrazione di stiramento (stretching) del C=O aldeidico aromatico (Silverstein *et al.*, 1981);
- di una banda caratteristica a 1602 cm^{-1} relativa alla vibrazione di stiramento dei legami carbonio-carbonio (C=C) degli anelli benzenici (Silverstein *et al.*, 1981);
- di una banda caratteristica a 1464 cm^{-1} relativa alla vibrazione di piegamento (bending) del C-H, di cui ne suggerisce la presenza (Silverstein *et al.*, 1981);
- di una banda caratteristica a 3590-3650 cm^{-1} relativa alla vibrazione di stiramento del legame O-H, che permette di ricavare informazioni sulle interazioni di legami idrogeno. L'assorbimento del gruppo O-H in soluzioni molto diluite di

-
- alcool o di fenoli determina un picco “sharp” per la mancanza di legami idrogeno intermolecolari (Silverstein *et al.*, 1981);
- di una banda caratteristica a 2800-3000 cm^{-1} relativa allo stiramento del legame C-H dovuta ai gruppi metilici (Silverstein *et al.*, 1981).

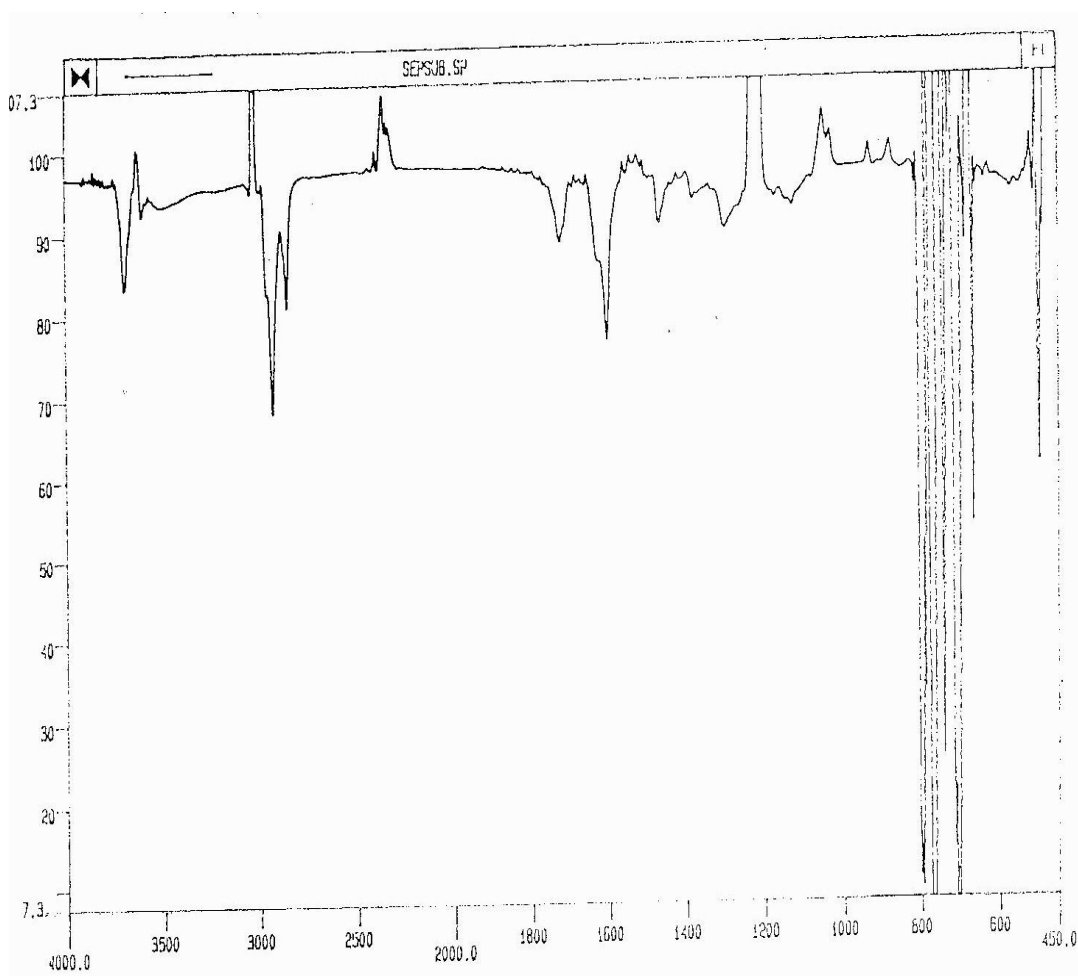


Figura 3.11: spettro IR della molecola isolata.

Il campione è stato sottoposto ad un'ulteriore caratterizzazione mediante spettrometria di massa ad impatto elettronico (EI-MS). Dalla analisi degli spettri di massa (Figura 3.12) ottenuti si evidenziano:

- lo ione molecolare M^+ a 166 m/e;
- picco caratteristico a 165 ($M^+ - H$) m/e;
- picco caratteristico a 137 ($M^+ - CHO$) m/e;
- picco caratteristico a 120 ($M^+ - CHO-OH$) m/e.

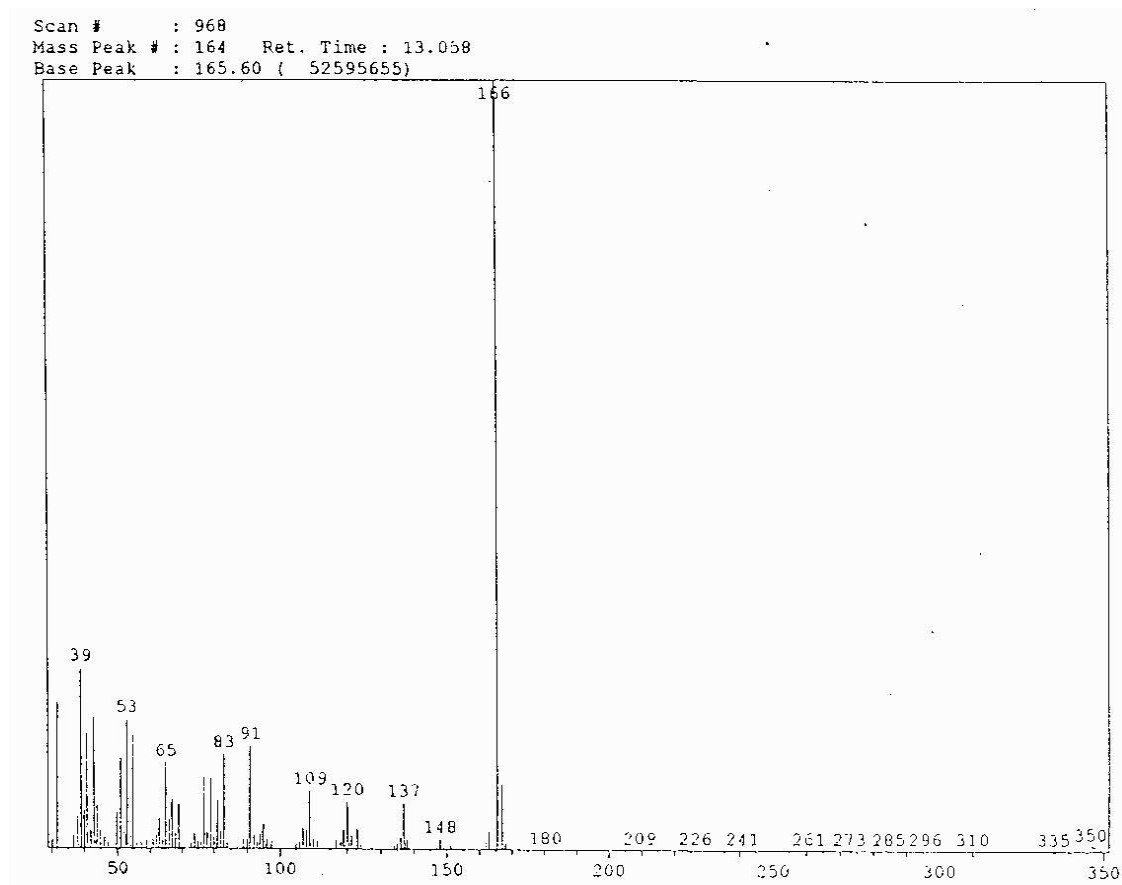


Figura 3.12: caratterizzazione mediante spettrometria di massa ad impatto elettronico (EI-MS) del composto isolato.

Per il completamento della caratterizzazione chimico-strutturale sono state effettuate indagini utilizzando uno spettrometro NMR 600 MHz. Lo spettro protonico, ottenuto in CDCl_3 (Figura 3.13), presenta segnali di vario tipo che vanno da 2,0 a 12,7 ppm, mentre lo spettro ^{13}C , anch'esso ottenuto in CDCl_3 (Figura 3.14), mostra nove diversi tipi di atomi di carbonio. I valori in ppm e le relative attribuzioni sono riportati in Tabella 3.3.

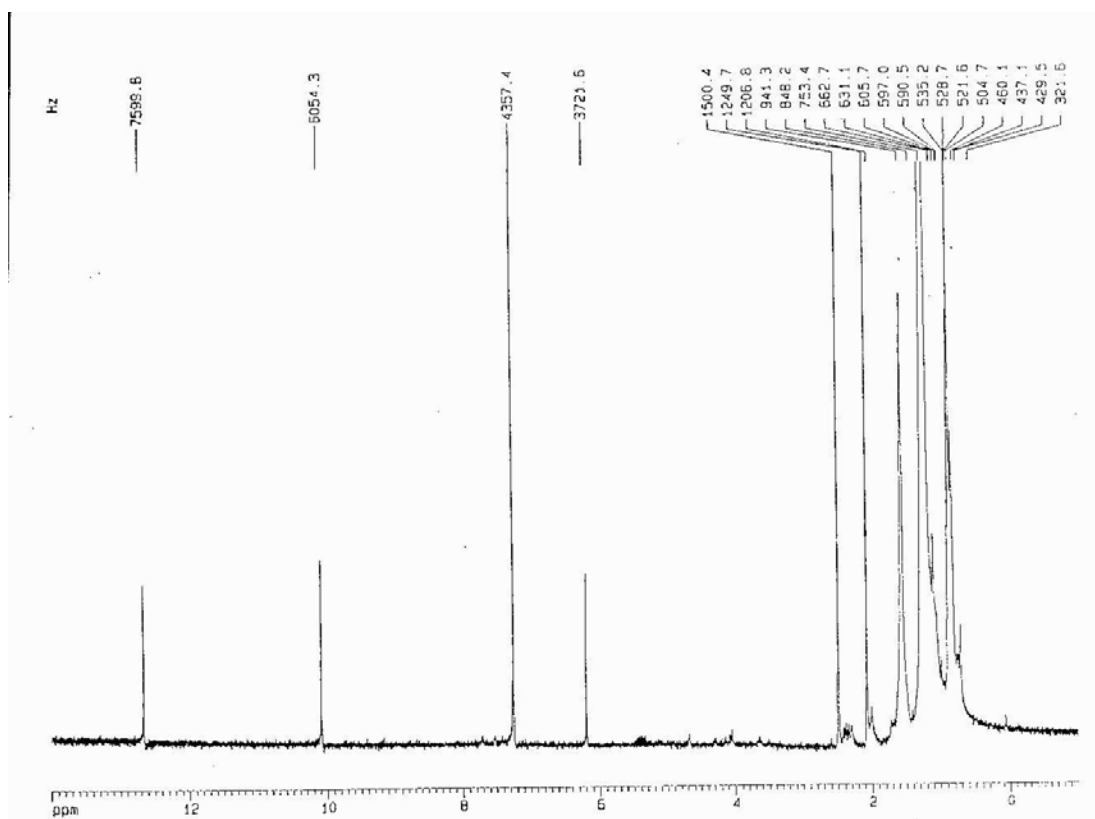


Figura 3.13: spettro protonico, ottenuto in CDCl_3 della molecola isolata

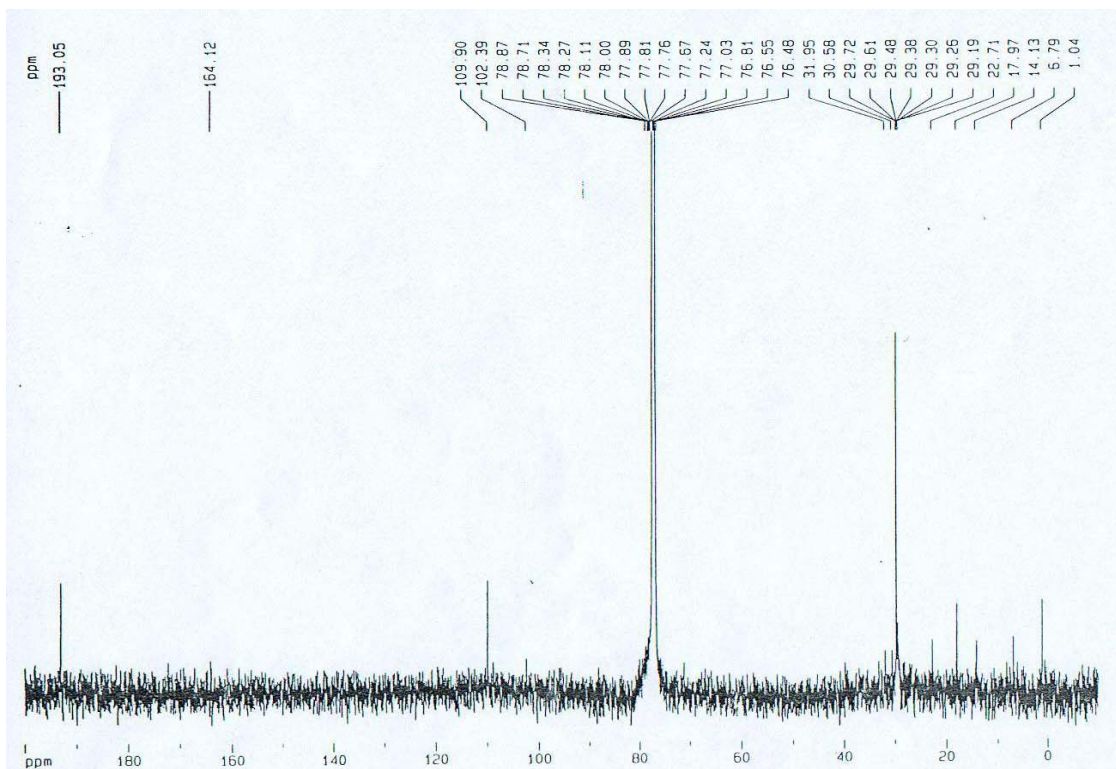


Figura 3.14: spettro ^{13}C , ottenuto in CDCl_3

Tabella 3.3. Dati ^1H and ^{13}C NMR del composto isolato

Numero carbonio	^1H – NMR (CHCl_3)	^{13}C - NMR (CHCl_3)
1		141.5 ppm
2		161.0 ppm
3		110.0 ppm
4		164.5 ppm
5	6.2 ppm (1H, s)	108.8 ppm
6		113.0 ppm
7	10.0 ppm (1H, s)	193.0 ppm
8	2.0 ppm (3H, s)	7.0 ppm
9	2.5 ppm (3H, s)	18.0 ppm
2 OH	12.7 ppm (1H, s)	

I dati spettrometrici e spettrofotometrici hanno permesso di individuare la struttura molecolare del composto dotato di attività antibiotica: la 2,4-Diidrossi-3,6-Dimetil-Benzaldeide (DMB - struttura è riportata in Figura 3.15).

Il composto isolato è stato completamente caratterizzato dal punto di vista chimico-strutturale. Da un'analisi effettuata nelle banche dati relative ai composti naturali è emerso che tale molecola è stata già purificata da altre forme microbiche (William *et al.*, 1993; Jiao *et al.*, 1994) ma è la prima volta che tale composto viene isolato da filtrati colturali di *S. chrysospermum* o da un fungo le cui capacità di biocontrollo sono state determinate.

Jiao e collaboratori hanno isolato due composti fenolici biologicamente attivi dai filtrati colturali del fungo ascomicete *Valsa ambiens*, agente di cancro del ciliegio. I saggi biologici, valutati in termini di inibizione della crescita delle radici e degli ipocotili di lattuga, hanno mostrato che le molecole isolate presentano un'attività di tipo fitotossico. L'estrazione e l'isolamento condotti nel suddetto lavoro sono stati effettuati secondo uno schema analogo a quello riportato in figura 3.8 con l'unica variante rappresentata dalla sostituzione dell'isopropanolo con il metanolo. Per quanto riguarda le rese di estrazione, il lavoro riportato in letteratura mostra un quantitativo del composto purificato decisamente inferiore a quella ottenuto nel presente lavoro (0.3 mg contro 0.85 mg per litro di filtrato). Una resa paragonabile è invece stata ottenuta da William *et al.*, che hanno isolato la 2,4-diidrossi-3,6-dimetil-benzaldeide a partire dai filtrati colturali del fungo *Leptosphaeria herpotrichoides*, un comune patogeno dei cereali. In entrambi i lavori presenti in

letteratura i dati di caratterizzazione chimico-strutturali della molecola in esame sono in accordo con quelli ottenuti a partire dai filtrati colturali di *S. chrysospermum*.

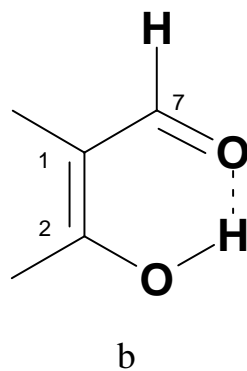
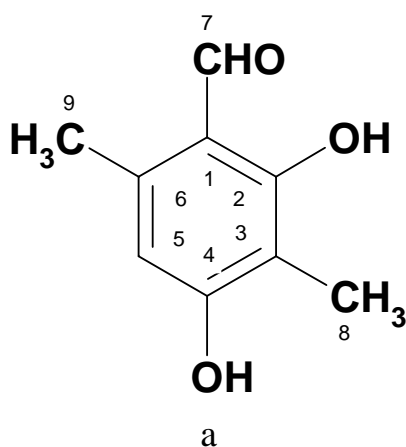


Figura 3.15: a) Struttura della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide (DMB); b) legame idrogeno intramolecolare della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide

3.3.2 Caratterizzazione biologica della 2,4 diidrossi – 3,6 dimetilbenzaldeide

La caratterizzazione biologica della molecola isolata è stata condotta per studiare le sue capacità antibiotiche e eventuali effetti fitotossici.

L'inibizione della germinazione dei conidi di *B. cinerea* e dell'allungamento del tubo germinativo (espresso quale rapporto tra il diametro maggiore delle spore e la lunghezza del tubo germinativo) determinata dalla 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide è stata valutata a differenti concentrazioni (da 50 a 0.005 ppm). In tal modo è stato possibile determinare l'intervallo di concentrazione entro cui l'attività del composto si manifesta a livelli apprezzabili. In Figura 3.16 e 3.17 sono riportati, rispettivamente, la percentuale di inibizione della geminazione dei conidi e dell'allungamento del tubo germinativo di *B. cinerea* a varie concentrazioni del principio attivo. E' possibile evidenziare come l'attività del composto sia valutabile fino a 0.05 ppm e come a tale concentrazione sia maggiormente evidente una inibizione sull'allungamento del tubo germinativo piuttosto che sulla germinazione dei conidi di *B. cinerea*.

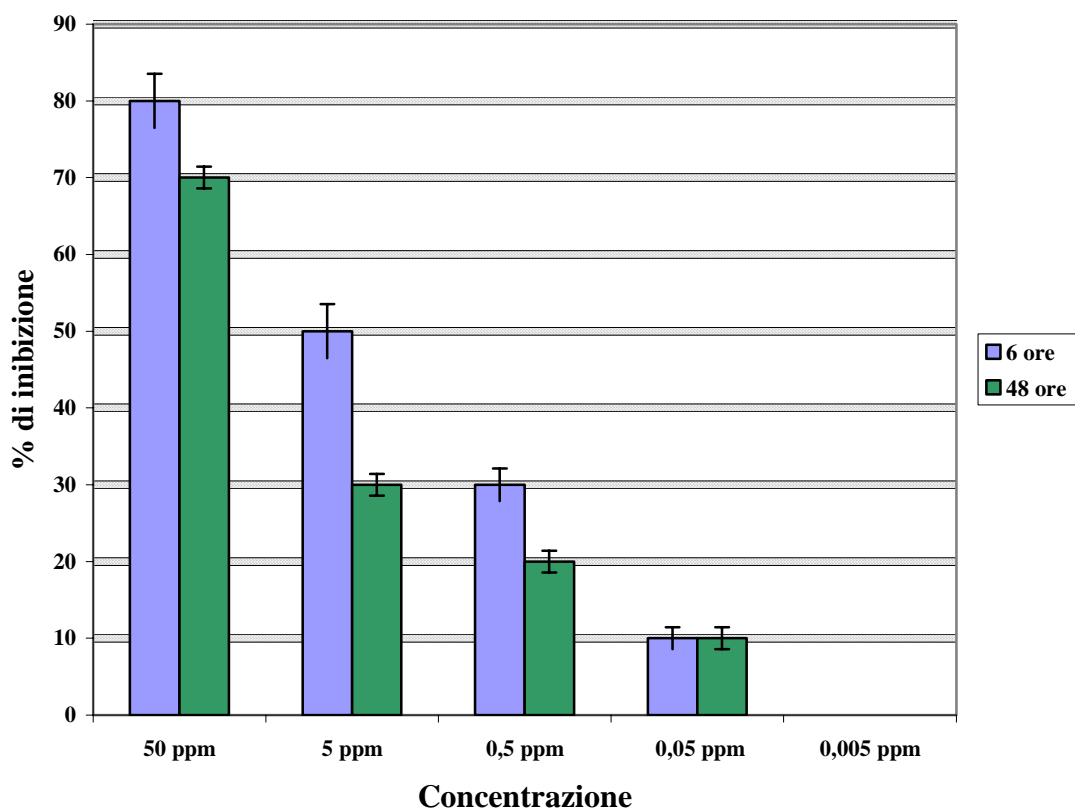
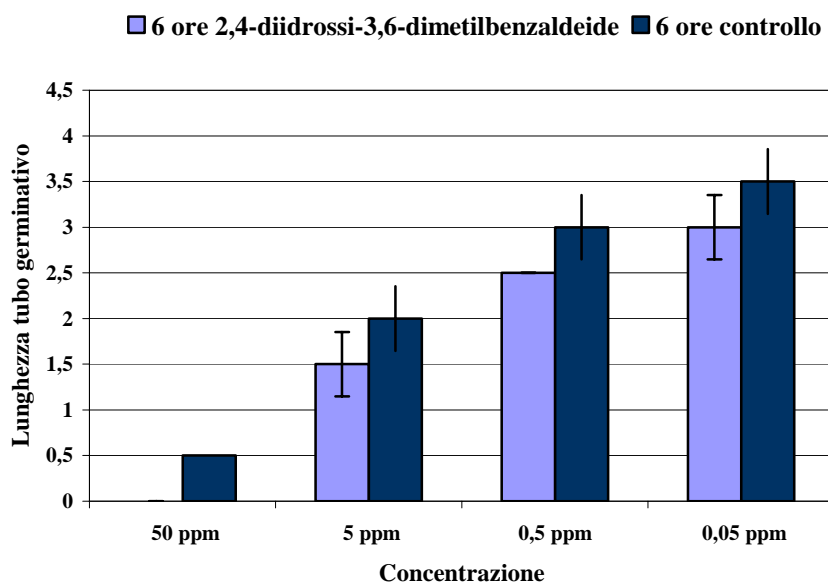
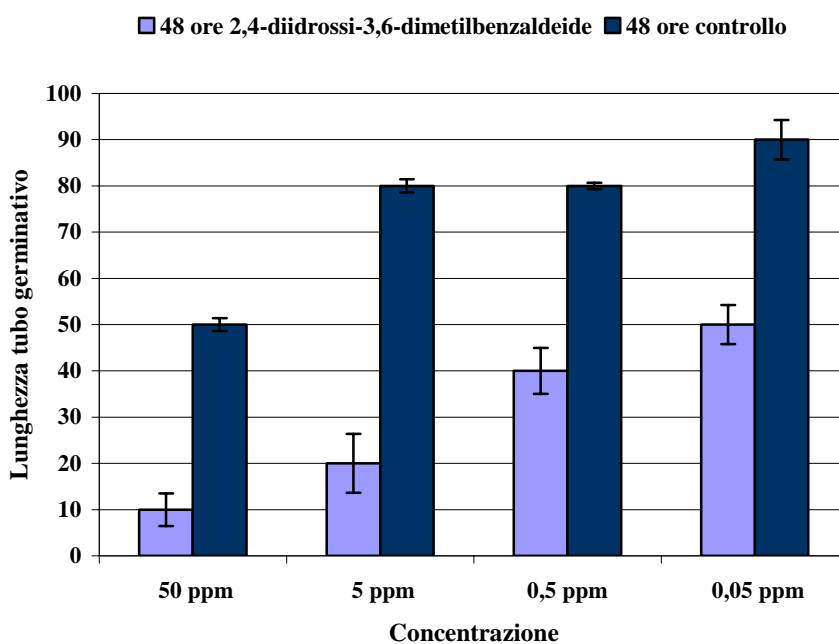


Figura 3.16: Inibizione della germinazione delle spore di *B. cinerea* da parte della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide (risposta lineare rispetto al variare della concentrazione).



(a)



(b)

Figura 3.10: Inibizione sull'allungamento del tubo germinativo delle spore di *B. cinerea* della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide dopo 6 (a) e 48 (b) ore dall'inoculo (il controllo contiene la miscela del solvente impiegata per il test la cui composizione varia in funzione della diluizione considerata).

Per i test di fitotossicità sono state impiegate piante di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* cv Borlotto) nelle cui foglie sono state effettuate infiltrazioni della molecola purificata a varie concentrazioni.

I danni provocati dall'azione fitotossica della molecola sono stati rilevati dopo 48 ore dalla infiltrazione attribuendo valori di tossicità relativa compresi tra 0 (min.) e 4 (max.).

Il composto, come si evidenzia dalla Fotografia 3.4, ha dimostrato di possedere una scarsa fitotossicità anche se applicato in forma purificata. In Figura 3.18 è riportata la tossicità relativa del composto in funzione della concentrazione.

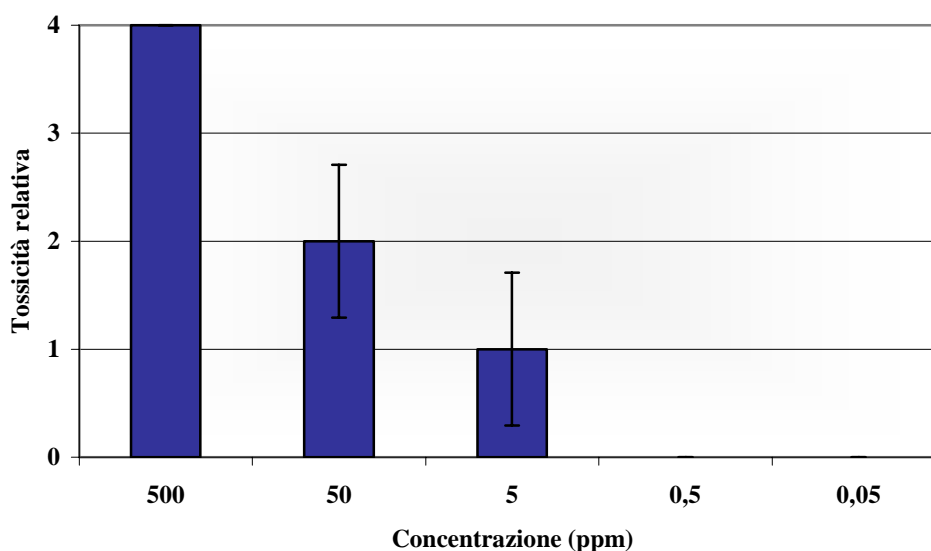
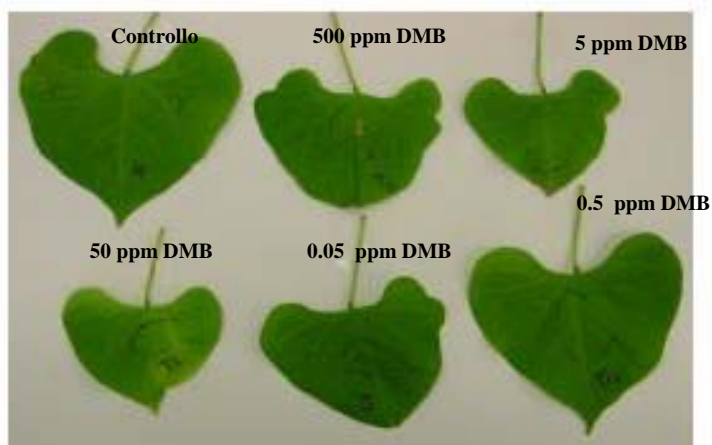


Figura 3.18: saggi di fitotossicità mediante infiltrazione fogliare della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide su fagiolo.



(a)



(b)

Fotografia 3.4: saggio di fitotossicità del metabolita 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide dopo 48 ore dall'infiltrazione; (a) piante di fagiolo le cui foglie sono state infiltrate con 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide [DMB], (b) foglie staccate da piante di fagiolo infiltrate con 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide.

L'analisi complessiva dei dati ottenuti per la caratterizzazione biologica della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide suggerisce che tale metabolita riveste un ruolo nei processi di biocontrollo che vedono coinvolto *S. chrysospermum*.

L'interazione tra l'organismo impiegato per il biocontrollo ed il patogeno si esplica attraverso vari meccanismi, tra cui l'antibiosi, la competizione ed il parassitismo. L'antibiosi rappresenta una componente estremamente importante che si realizza attraverso la produzione, da parte dei microrganismi antagonisti, di metaboliti secondari in grado di inibire la crescita e lo sviluppo dei patogeni. L'attività letale di queste sostanze viene svolta solo quando penetrano e si accumulano nelle cellule (inibizione per tossicità). Spesso questi metaboliti, caratterizzati da un basso peso molecolare, sono prodotti dalla microflora antagonista in condizioni di ridotta disponibilità di nutrienti (Lewis *et al.*, 1991).

Tra i microrganismi produttori di antibiotici più studiati vi sono le Pseudomonadi fluorescenti. I primi antibiotici chiaramente implicati nel biocontrollo ad opera di *P. fluorescens* sono stati i derivati delle fenazine (Weller e Cook, 1983; Brisbane e Rovira, 1988). Le evidenze decisive sul ruolo delle fenazine nel meccanismo di biocontrollo si sono avute con l'analisi dei mutanti difettivi per la produzione dei composti antimicrobici, nei quali si assisteva ad una diminuzione della capacità di biocontrollo di alcune malattie (Thomashow e Weller, 1988; Pierson e Thomashow, 1992).

Tra i bacilli produttori di antibiotici una delle specie più studiate è il *Bacillus cereus*, batteri particolarmente interessanti dal punto di vista del biocontrollo per la capacità di produrre endospore termostabili. L'analisi dei mutanti di *B. cereus* ha mostrato una relazione

significativa tra la capacità di biocontrollo delle malattie provocate da alcuni oomiceti e la produzione di due antibiotici, la zwittermicina A e Kanosamina (Silo-Suh *et al.*, 1994).

Tra i funghi antagonisti produttori di antibiotici va menzionato il caso di *Trichoderma* spp, da cui sono stati ricavati molti antibiotici caratterizzati sia dal punto di vista chimico che biologico; questi composti possono essere suddivisi in tre categorie: composti volatili di natura lipofila; composti non volatili estraibili in ambiente acquoso; composti di natura peptidica denominati peptaiboli (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991).

Al pari di *Trichoderma*, microrganismo largamente impiegato nel biocontrollo, anche *Sepedonium* potrebbe svolgere la sua funzione antagonista attraverso la produzione di molecole dotate di attività antibiotica. Infatti, in letteratura sono riportati alcuni principi naturali prodotti da tale fungo, ma non è mai stato studiato a fondo il loro ruolo nei meccanismi di biocontrollo utilizzato da *Sepedonium*, né la loro importanza per una possibile applicazione pratica. L'attività biologica evidenziata per la DMB, metabolita per la prima volta isolato da *Sepedonium*, sembra essere correlata alla sola azione fitotossica riscontrata nel lavoro di Jiao e collaboratori (1994). Gli autori, nella fattispecie, mettono in evidenza l'attività fitotossica valutata in termini di inibizione della crescita delle radici e degli ipocotili di lattuga.

Tuttavia il valore limite per il quale secondo gli autori è dimostrabile una certa attività fitotossica, pari 0.1 mM – circa 17 ppm – appare relativamente bassa. Confrontando tale risultato con i dati riportati in figura 3.16 e figura 3.17 si evidenzia che a valori di 0.5 ppm la

molecola risulta ancora attiva ai test di antibiosi, mentre non mostra attività fitotossica.

A questo proposito, in virtù della scarsa fitotossicità riscontrata da parte della molecola, si potrebbe ipotizzare un suo impiego, in maniera diretta o attraverso il microrganismo produttore, nella preparazione di formulati commerciali utilizzabili nelle pratiche di lotta biologica.

Sarebbe però importante, per una eventuale applicazione pratica del principio, valutare la tossicità verso organismi animali attraverso saggi di micotossicità. Ad esempio saggi per la valutazione dell'attività micotossica nei confronti di organismi animali vengono condotti su larve di *Artemia salina* L., un crostaceo che vive in laghi e stagni salati (Harwing e Scott, 1971). Il saggio viene realizzato in piastre per colture cellulari con pozzetti contenenti le larve in acqua marina ed a cui è stato aggiunto l'1% del composto, o della miscela di composti da analizzare. La mortalità larvale, rilevata come rapporto percentuale tra il numero di larve morte dopo 36 h a 27° C e il numero complessivo di larve in ogni pozzetto, può dare una utile indicazione sulla azione tossica dei composti analizzati.

In letteratura non esistono attualmente composti isolati da *Sepedonium* che hanno trovato applicazione diretta per il biocontrollo, anche se sono numerosi i casi di composti naturali che hanno trovato ampia applicazione. Ad esempio, sono diffusi i preparati a base di Azadiractina, un composto isolato dalla componente lipofila (olio di *Neem*) della pianta *Azadiracta indica*, che è dotato di un ampio spettro di azione e largamente diffuso nel mondo della agricoltura biologica. Tale principio viene isolato da preparati naturali o prodotto mediante

procedure sintetiche (Fukuzaki *et al.*, 2002) una delle quali è riportata in Figura 3.19.

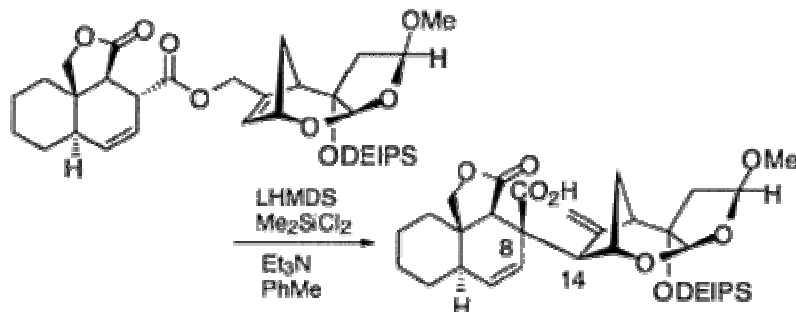


Figura 3.19: Fase principale della sintesi chimica della Azadiractina secondo Fukuzaki *et al.*, 2002.

Esiste una ampia varietà di composti naturali isolati da microrganismi ed insetti che difficilmente sono applicabili in maniera diretta, ma che possono essere utilizzati attraverso l'organismo produttore. È il caso dei funghi antagonisti del genere *Trichoderma* che nell'ultimo decennio sono stati ampiamente studiati per chiarire i meccanismi di biocontrollo. Questi studi hanno lo scopo di favorire l'applicazione di questi miceti come principi attivi in formulazioni di biofungicidi e biofertilizzanti, e di individuare geni e metaboliti utili come agenti antifungini (Harman e Kubiceck, 1998).

Al fine di comprendere le relazioni tra struttura ed attività della molecola analizzata, sono stati effettuati saggi di antibiosi su orcinolo, resorcinolo e 2,5-dimetil resorcinolo analoghi strutturali della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide (Figura 3.13).

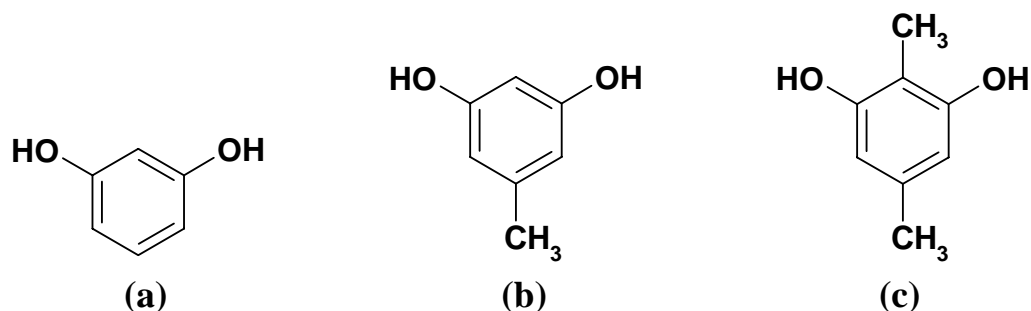


Figura 3.13: struttura del resorcinolo (a), orcinolo (b) e 2,5-dimetilresocinolo (c).

Dall'analisi dei dati di attività antifungina nei confronti di *B. cinerea* (dati non riportati) è emerso che questi composti sono dotati di una maggiore attività rispetto alla 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide. Ciò potrebbe confermare l'importanza strutturale del gruppo carbonilico nella diminuzione della attività antibiotica del composto in esame.

La diminuzione di attività della DMB potrebbe essere collegata a due fattori: i) la maggiore solubilità nei composti apolari del resorcinolo, dell'orcinolo e del 2,5-dimetilresocinolo rispetto alla 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide; ii) la presenza del carbonile aldeidico che impegna, mediante legame idrogeno, un -OH ossidrilico della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide. Nel primo caso la conseguenza è la maggiore capacità dei composti di penetrare nelle strutture cellulari attraverso la componente lipidica delle membrane. Nel secondo caso la presenza di un ossidrilico bloccato, probabilmente importante nell'attività biologica, diminuisce la capacità della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide rispetto ai suoi analoghi strutturali.

3.3.3 Isolamento e caratterizzazione chimica e biologica della anidrosepedonina

La sepedonina ed il suo analogo strutturale, la anidrosepedonina, sono stati isolati da filtrati colturali acidi di *S. chrysospermum* attraverso estrazione con acetato di etile e successive cristallizzazioni a bassa temperatura.

La caratterizzazione chimica è stata effettuata mediante analisi degli spettri UV-Vis e degli spettri di massa.

All'analisi UV, condotta in etanolo, il composto isolato presenta picchi di assorbimento massimi a λ_{\max} 249 nm, λ_{\max} 286 nm, λ_{\max} 302 nm. Gli spettri di massa Maldi-TOF, ottenuti impiegando quale matrice l'acido sinapinico, hanno messo in evidenza la presenza del picco ionico molecolare a 206 massa/carica (Figura 3.21). L'analisi degli spettri permette di affermare che la molecola isolata si trova nella forma molecolare di anidrosepedonina e non di sepedonina. Ciò è in accordo con i dati riportati in letteratura che indicano che in ambiente non tamponato le vie metaboliche sono indirizzate verso la produzione della forma molecolare anidra (Divekar *et al.*, 1965).

In letteratura non esistono dati che indichino il ruolo della sepedonina o del suo analogo strutturale nei processi di antagonismo. Per chiarire tale ruolo sono stati condotti saggi di attività nei confronti di *B. cinerea*, evidenziando gli effetti del metabolita sulla germinazione e sull'allungamento del tubo germinativo.

Come già discusso nei paragrafi precedenti, la capacità di biocontrollo si può esplicare attraverso meccanismi di antibiosi. Difatti attraverso

la produzione di metaboliti secondari in grado di inibire la crescita e lo sviluppo di numerosi agenti fitopatogeni si manifesta una elevata capacità di biocontrollo (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991). La capacità, da parte di *S. chrysospermum*, di produrre metaboliti secondari è stata in parte dimostrata grazie all'isolamento ed alla caratterizzazione di alcuni composti, quali la sepedonina, il suo analogo strutturale anidrosepedonina (Divekar *et al.*, 1965) e la crisoidina (Closse e Hauser, 1973). In letteratura però non esistono evidenze in merito al loro coinvolgimento in fenomeni di antagonismo; per andare incontro a tale esigenza è stato dimostrato il ruolo delle sepedonina nell'antagonismo nei confronti di *B. cinerea*. Dalla analisi dei dati si osserva che questo metabolita potrebbe avere un ruolo importante nel processo di antibiosi e di conseguenza nel determinismo dell'intero processo di biocontrollo (Figura 3.22 e 3.23).

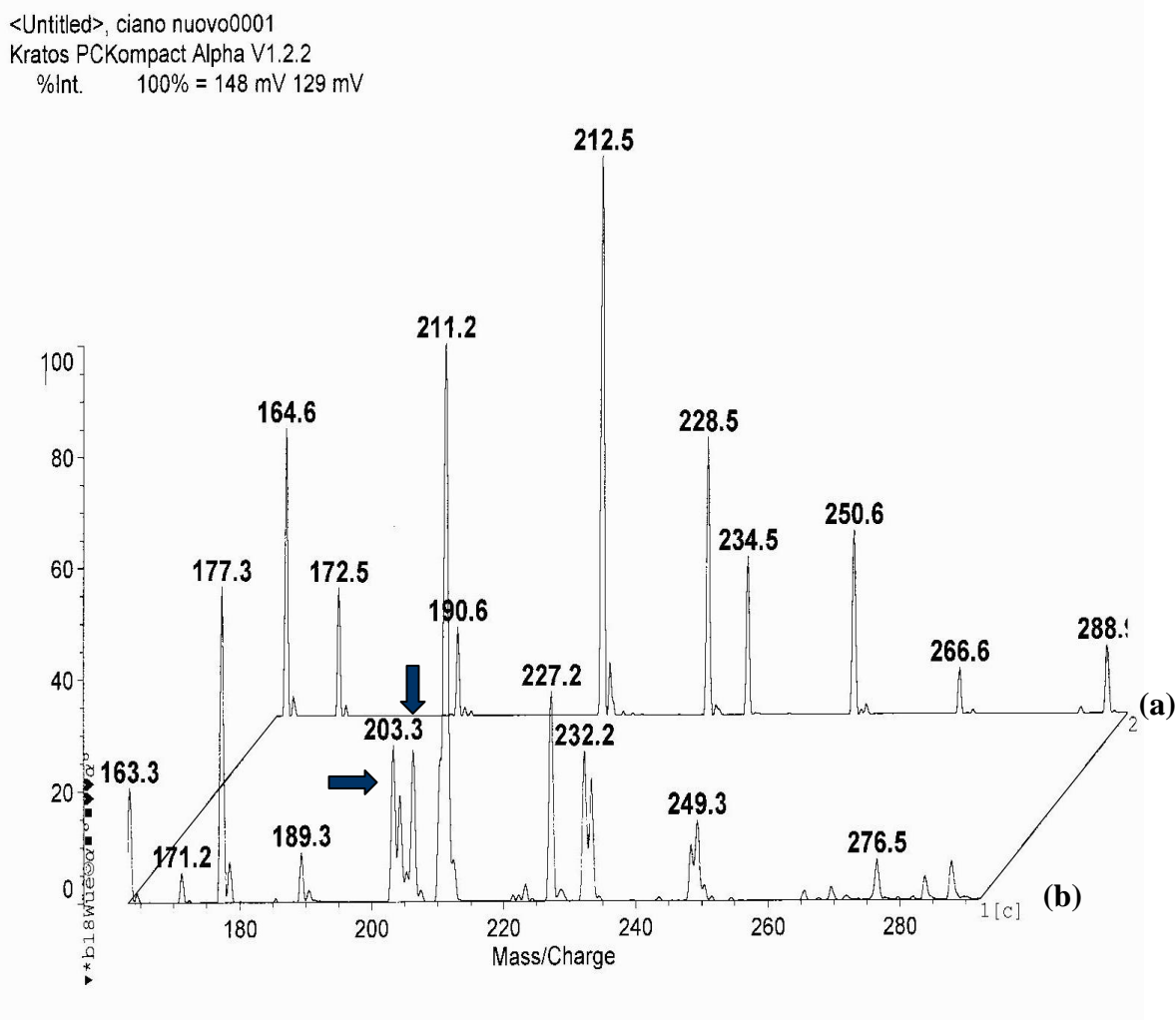


Figura 3.22: spettri di massa Maldi-TOF della sepedonina; nel quadro superiore (a) è riportato lo spettro della sola matrice mentre in quella inferiore è riportato quello della matrice con la sepedonina (b). Gli unici picchi non presenti nella matrice sono quelli relativi alla sepedonina a $203 M^+ - 3H$, $204 M^+ - 2H$ e $206 M^+$ Massa /Carica (evidenziati con una freccia).

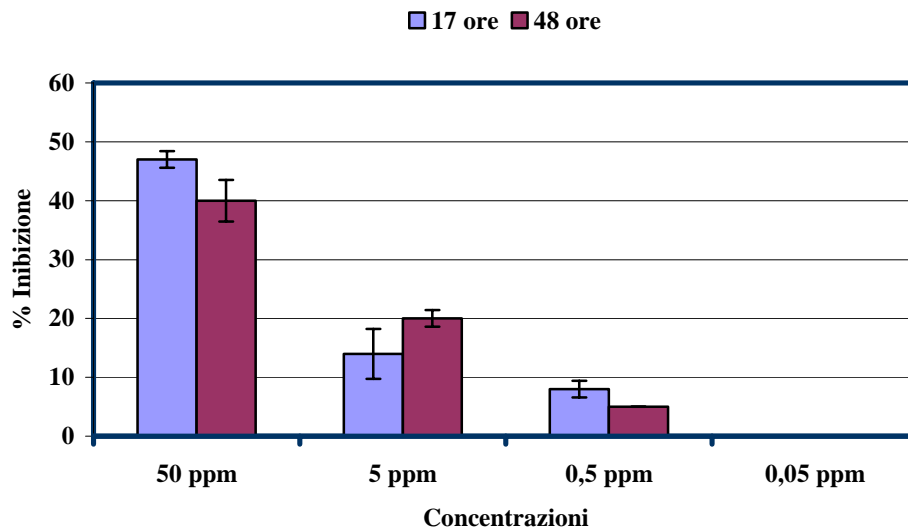


Figura 3.22: Inibizione della germinazione delle spore di *B. cinerea* da parte della anidrosepedonina.

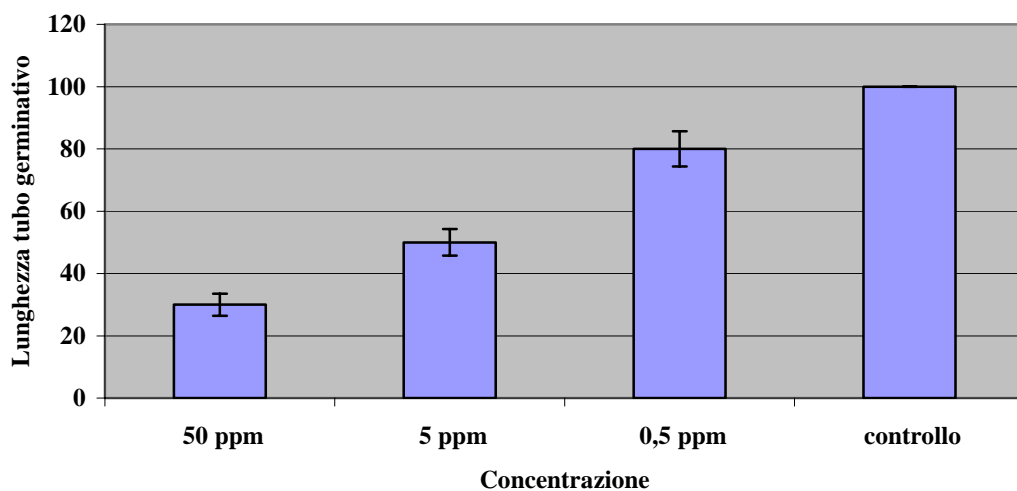


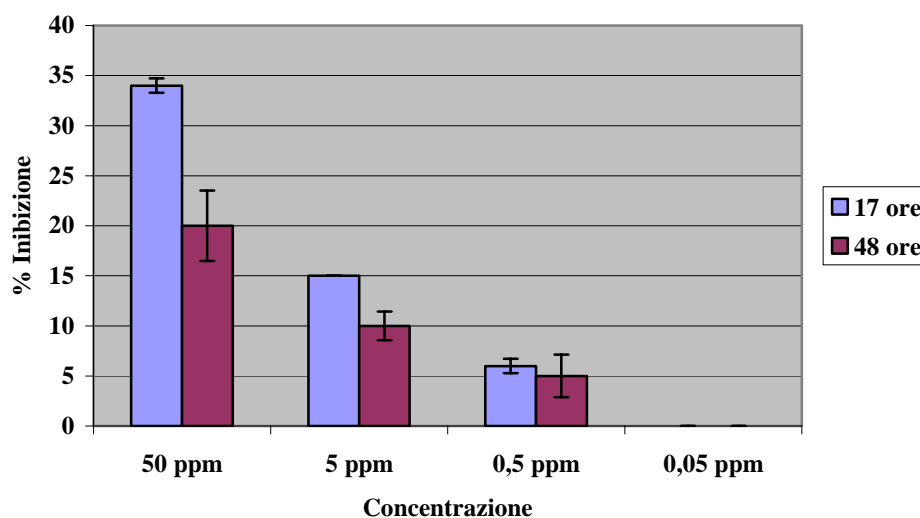
Figura 3.23: Inibizione sull'allungamento del tubo germinativo delle spore di *B. cinerea* da parte della anidrosepedonina dopo 48 ore (il controllo contiene la miscela del solvente impiegata per il test la cui composizione non varia in funzione della diluizione considerata).

3.3.4 Isolamento e caratterizzazione chimica e biologica di peptaiboli

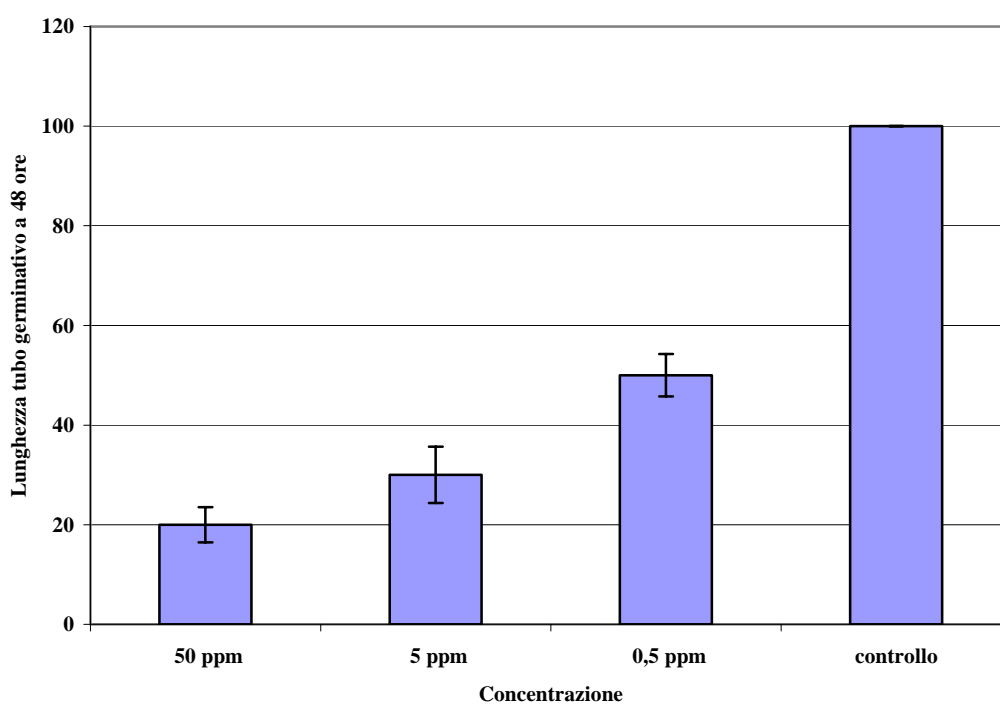
L'isolamento di peptaiboli è stato realizzato in accordo con quanto riportato in letteratura (Rebuffat *et al.* 1991), con alcune modifiche.

I filtrati colturali di *S. chrysospermum*, estratti con *n*-butanolo, sono stati successivamente trattati con esano al fine di eliminare la componente lipofila. La fase seguente ha previsto una purificazione su colonna C18 a fase inversa in modo da separare in più componenti l'estratto. La frazione metanolica, ottenuta dopo passaggio su C18, è stata sottoposta a successive indagini per determinare la composizione chimica e valutare le capacità antagonistiche della miscela.

La attività antifungina della frazione metanolica è stata monitorata mediante saggi di attività di tali composti nei confronti di *B. cinerea*, evidenziando gli effetti sulla germinazione e sull'allungamento del tubo germinativo. Dagli esperimenti effettuati si denota la buona attività antifungina dei preparati (Figura 3.24); in termini di inibizione dell'allungamento del tubo germinativo già a 0.5 ppm si assiste ad una considerevole riduzione dell'allungamento (-50 %).



(a)



(b)

Figura 3.24: a) Inibizione della germinazione delle spore di *B. cinerea* da parte dei preparati peptaibolici – b) Inibizione sull'allungamento del tubo germinativo di *B. cinerea* da parte dei preparati peptaibolici dopo 48 ore.

Vista la attività biologica delle molecole isolate, il preparato è stato sottoposto ad indagine mediante spettrometria di massa. Dalla analisi degli spettri Maldi-TOF (matrice: acido sinapinico) si evidenziano gruppi di segnali intorno a 950, 650 e 490 massa/carica, che non indicano la presenza di sostanze simili a peptaiboli (Figura 3.25).

Si è quindi ricorso all'analisi LC/MS separando la frazione metanolica mediante HPLC ed analizzando ogni picco ottenuto in spettrometria di massa electrospray. Anche in questo caso non si sono evidenziati picchi cromatografici e segnali di massa caratteristici di molecole di natura peptidica (Figura 3.26).

Data: Franc. Vinale\Peptideboli metanolo c0001.10 19 Jun 2002 12:56 Cal: FumoB1 18 Jun 2002 12:50
Kratos PCKompact Alpha V1.2.2: + Linear High, Power: 44, P.Ext. @ 3000 (bin 89)

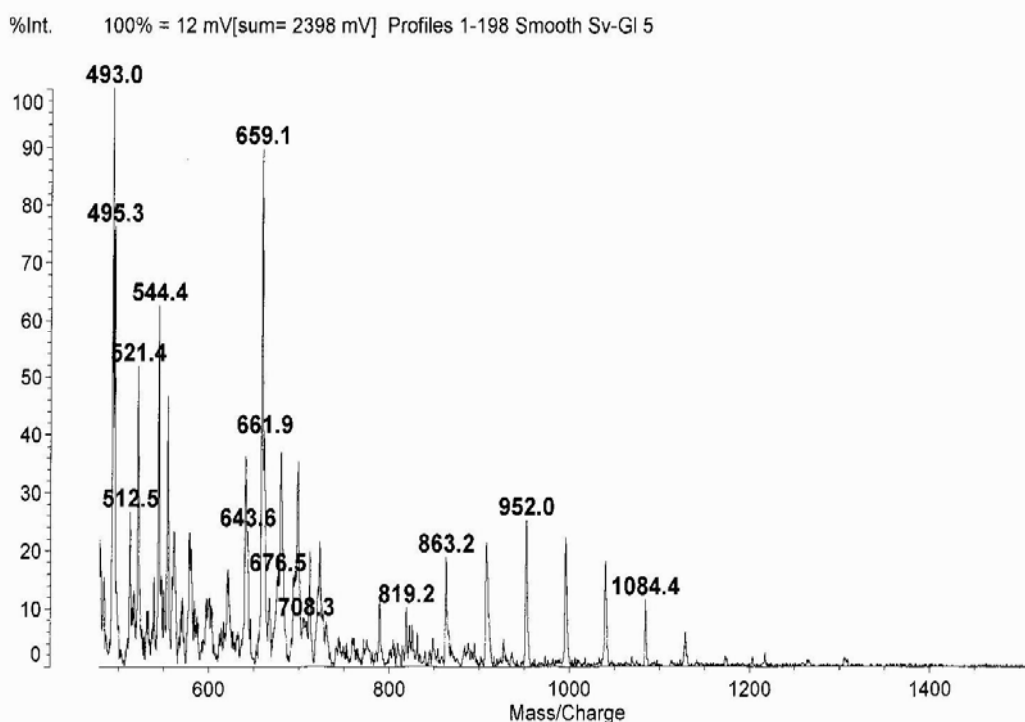
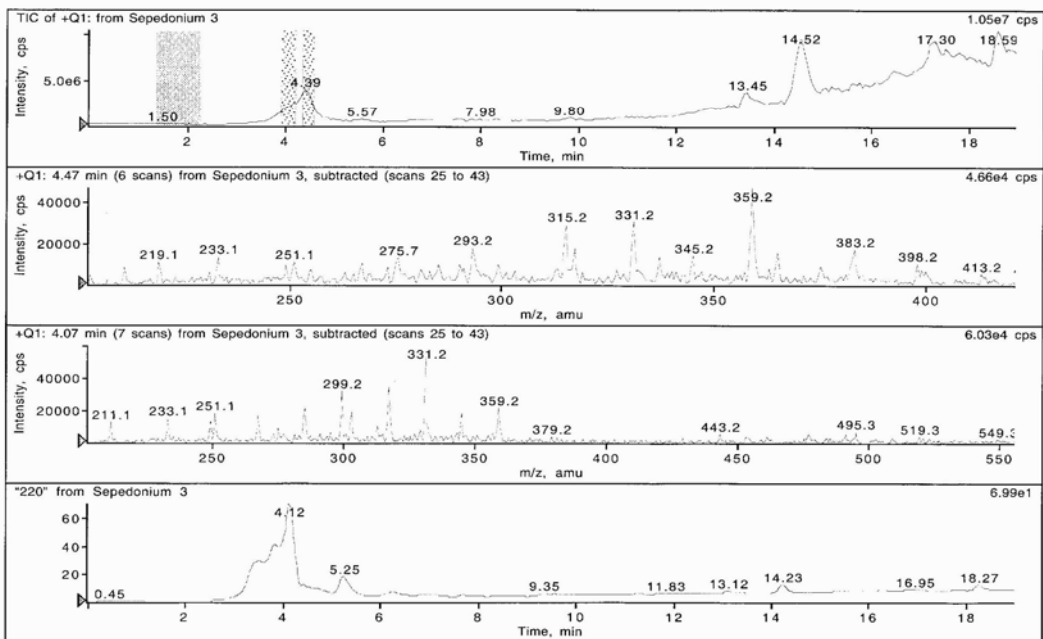


Figura 3.25 spettri Maldi-TOF (matrice acido sinapinico) della frazione metabolica.

MultiView 1.5
 Info for pane 2: Sepedonium 3
 Period 1, Expt. 1; Mass range: 200.1 to 1801.0 by 0.5 amu; Dwell: 1.0 ms; Pause: 2.0 ms
 Acq. Time: Gio, 3 ott 2002 at 11:37:46; Samp. Name: Sepedonium



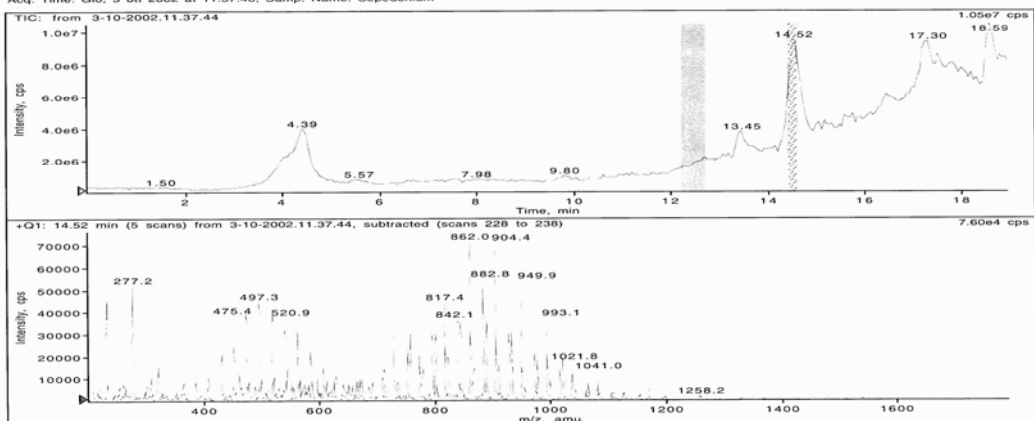
(a)

(b)

(c)

(d)

MultiView 1.5
 Info for pane 2: 3-10-2002.11.37.44
 Period 1, Expt. 1; Mass range: 200.1 to 1801.0 by 0.5 amu; Dwell: 1.0 ms; Pause: 2.0 ms
 Acq. Time: Gio, 3 ott 2002 at 11:37:46; Samp. Name: Sepedonium



(e)

Figura 3.26: analisi LC/MS effettuata separando la frazione metanolica mediante HPLC ed analizzando ogni picco ottenuto in spettrometria di massa electrospray. (a) Profilo cromatografico (rilevatore: spettrometro electrospray); (b) spettro di massa del picco a 4.1 minuti; (c); spettro di massa del picco a 4.4 minuti; (d) profilo cromatografico (rilevatore: spettrofotometrico a 220 nm); (e) spettro di massa del picco a 14.5 minuti.

Dall'analisi condotta per valutare l'attività antibiotica dei metaboliti rilasciati dal fungo implicati nei processi di biocontrollo, la frazione isolata si è dimostrata particolarmente interessante ai saggi di attività biologica nei confronti di *B. cinerea*. L'importanza dei peptaiboli è legata alle loro caratteristiche di antibiosi implicate nei processi di biocontrollo. Esistono, infatti, evidenze sperimentali che sottolineano l'attività di questi composti nei confronti di numerosi agenti fitopatogeni (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991).

I peptaiboli devono le loro proprietà alle caratteristiche chimiche che li distinguono. Si tratta infatti di peptidi idrofobici che esibiscono varie attività biologiche oltre a quella antibiotica, tra le quali l'emolisi e il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, legate ad una elevata capacità di modificare le proprietà delle membrane (Jung *et al.*, 1981). Saggiati in combinazione con gli enzimi litici tali composti hanno dimostrato di possedere una elevata azione sinergica (Schirmböck *et al.*, 1994).

Anche se i principali produttori di peptaiboli sono rappresentati dai microrganismi appartenenti al genere *Trichoderma* (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991), alcuni funghi del genere *Sepedonium* sono in grado di produrne in elevate quantità. In particolare la specie *ampullosporum* è capace di produrre ampullosporina, un peptaibolo costituito da 15 unità aminoacidiche (Ritzau *et al.*, 1997).

Ad ogni modo, con i dati finora in nostro possesso non è possibile dedurre con assoluta certezza la natura chimica dei composti contenuti nella frazione metabolica ottenuta al termine della purificazione. Non è da escludere, comunque, che, anche se non venissero riscontrate molecole peptaiboliche, i composti isolati dalla suddetta frazione svolgano un ruolo analogo a quello di questi antibiotici.

3.3.5 Isolamento di enzimi coinvolti nei meccanismi di biocontrollo.

La caratterizzazione delle capacità antimicrobiche del microrganismo in esame è proceduta con la valutazione del contributo di alcuni enzimi degradativi delle pareti cellulari fungine nei meccanismi di biocontrollo.

Nella Figura 3.27 è riportata la produzione di enzimi da *S. chrysospermum* in vari substrati di crescita.

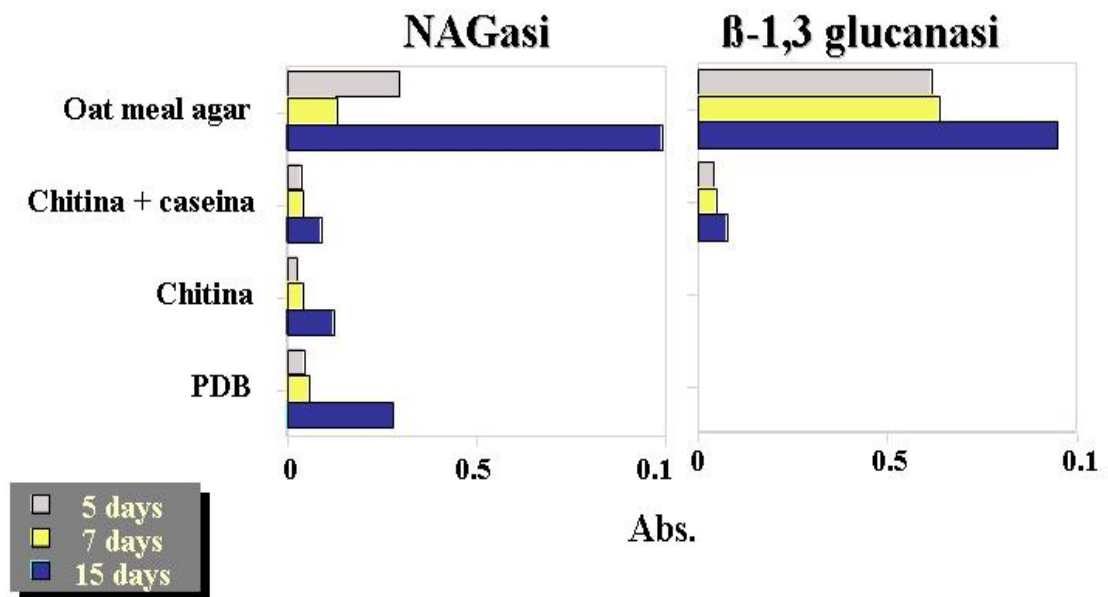


Figura 3.27: produzione di enzimi da *S. chrysospermum* in vari substrati di crescita.

La purificazione degli enzimi coinvolti nel biocontrollo è stata realizzata seguendo i passaggi di seguito riportati:

1-3-β-glucanasi	
1	Dialisi dei filtrati colturali
2	Cromatografia su gel

N-acetil-β-glucosamminidasi (NAGasi)	
1	Dialisi dei filtrati colturali
2	Cromatografia su gel
3	Rotofor

Nella figura 3.28 sono evidenziabili due picchi sovrapposti parzialmente che rappresentano l'attività esochitinasica e glucanasica delle varie frazioni ottenute in seguito alla separazione del filtrato dializzato su colonna di gel cromatografia.

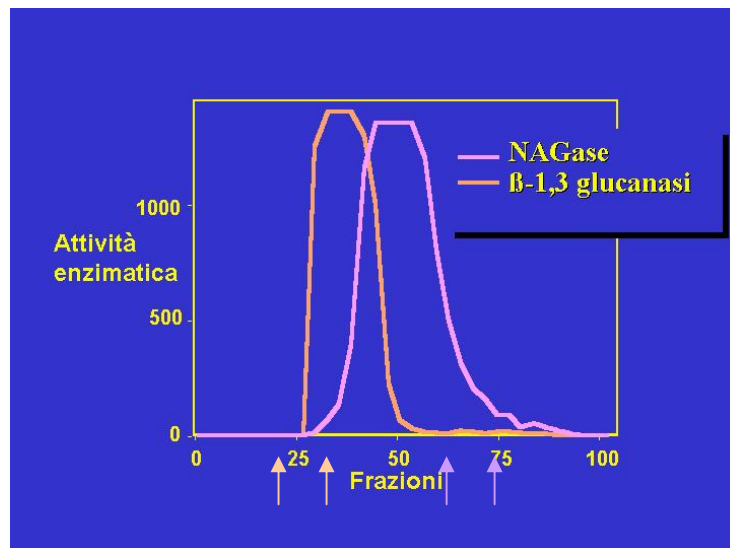


Figura 3.28: profilo cromatografico a seguito della separazione su colonna di filtrati colturali di *S. chrysospermum*. Le frecce indicano le frazioni raccolte e successivamente processate.

Nella fase successiva, le frazioni contenenti l'attività esochitinasica sono state raccolte, concentrate e sottoposte ad ulteriore separazione mediante isoelettrofocusing (Rotofor). Le frazioni con attività glucanasica, invece, sono state direttamente raccolte, concentrate e sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti per accertarne l'avvenuta purificazione (Figura 3.29). La glucanasi separata ha mostrato un buon livello di purificazione ed un peso molecolare di 60 kDa.

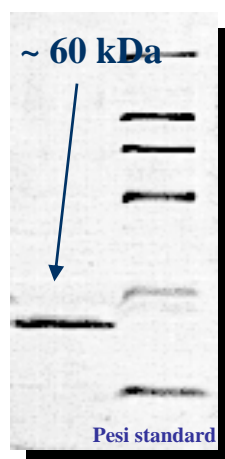


Figura 3.29: β -1,3-glucanasi estratta e purificata da filtrati colturali di *S. chrysospermum*.

Nella figura 3.30 è evidente la separazione delle attività dei due enzimi ottenuta mediante applicazione dell'isoelettrofocusing con il sistema Rotofor alle frazioni ottenute dalla purificazione su colonna gel - cromatografica.

Le frazioni contenenti l'attività esochitinasica sono state raccolte, concentrate e sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti per accertarne l'avvenuta purificazione ed il loro peso molecolare (Figura 3.31). La NAGasi (N-acetil- β -

glucosamminidasi) ottenuta ha mostrato un elevato livello di purificazione ed un peso molecolare di 38 kDa.

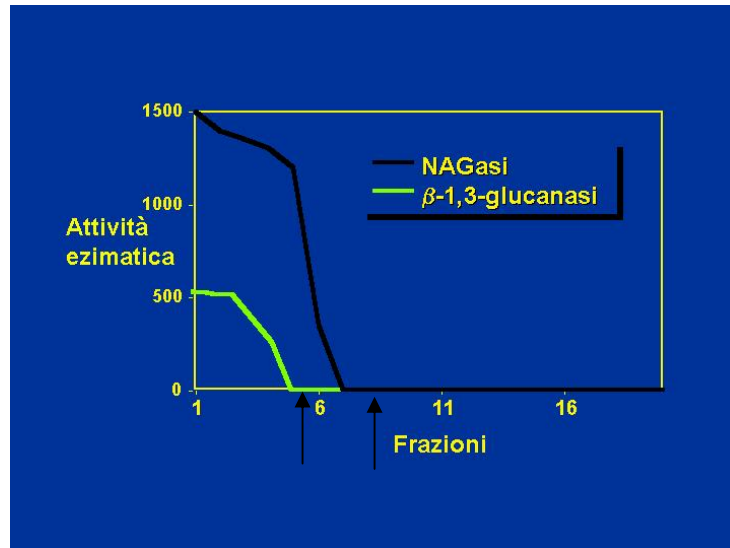


Figura 3.30: profilo cromatografico ottenuto in seguito della separazione mediante focalizzazione isoelettrica Rotofor delle frazioni con attività esochitinasica precedentemente purificate su colonna gel cromatografica. Le frecce indicano le frazioni raccolte e successivamente processate.

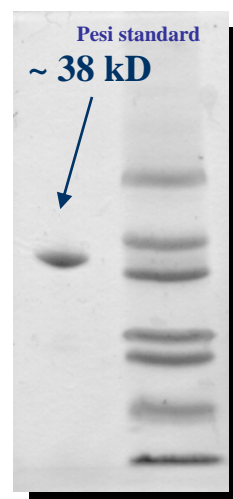


Figura 3.31: NAGasi (N-acetil- β -glucosamminidasi) estratta e purificata da filtrati colturali di *S. chrysospermum*.

In alternativa ai passaggi di purificazione realizzati secondo le

metodologie riportate sopra è possibile effettuare un unico passaggio di purificazione mediante elettroforesi preparativa su Prep Cell (Biorad). Nella figura 3.32 è riportato il profilo cromatografico dei filtrati colturali dializzati di *S. chrysospermum* ottenuto mediante elettroforesi preparativa su Prep Cell: la separazione tra l'attività della NAGasi e quella della β -1,3-glucanasi appare in questo caso ancora più evidente. Occorre sottolineare che, mediante questo tipo di procedura, è possibile purificare i filtrati ottenuti in maniera semi-automatica, dal momento che i picchi di attività per ciascuna frazione enzimatica possono essere raccolti in continuo.

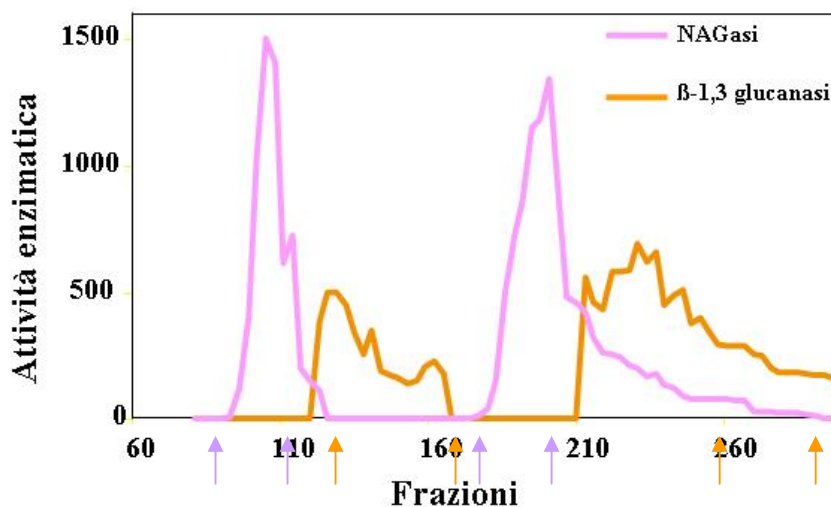


Figura 3.32: profilo cromatografico ottenuto in seguito alla separazione mediante elettroforesi preparativa Prep Cell dei filtrati colturali di *S. chrysospermum* dializzati. Le frecce indicano le frazioni raccolte e successivamente processate.

Anche in questo caso le frazioni esprimenti l'attività esochitinasica e glucanasica sono state raccolte, concentrate e sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilamide (Figure 3.29 e 3.31). La NAGasi (N-acetil- β -glucosamminidasi) e la glucanasi purificate hanno mostrato, anche in questo caso, un peso molecolare di 38 kDa e 60 kDa, rispettivamente.

Sottoposti ad indagine per valutare il ruolo nel biocontrollo, gli enzimi purificati hanno mostrato una buona capacità di inibire la germinazione delle spore e l'allungamento del tubo germinativo di *B. cinerea* (dati non presentati). Inoltre, saggiati in combinazione gli enzimi litici ed il metabolita antibiotico, la 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide, hanno mostrato un elevato sinergismo nell'inibizione della germinazione delle spore e della crescita ifale di *B. cinerea* (Figura 3.33).

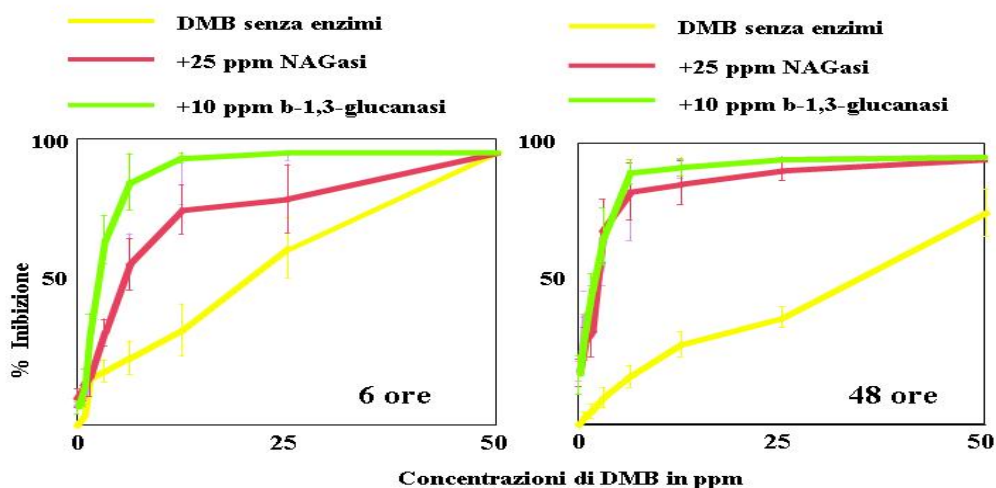


Figura 3.33: effetto sinergico tra gli enzimi litici ed il metabolita antibiotico, la 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide (DMB), nell'inibizione della germinazione delle spore e della crescita ifale di *B. cinerea*.

In conclusione si può affermare che:

- la purificazione di enzimi da *Sepedonium* può essere realizzata in uno o due passaggi;
- la produzione di enzimi coinvolti nel biocontrollo in coltura liquida è elevata (dell'ordine di grammi per litro di liquido colturale in condizioni di crescita ottimizzate);
- gli enzimi hanno mostrato una attività antifungina sinergica con i metaboliti antibiotici (nella fattispecie con la DMB).

Chitinasi, glucanasi e proteasi vengono utilizzate dai microrganismi come dalle piante per degradare le pareti cellulari dei funghi patogeni e sono ritenuti composti chiave nel meccanismo di micoparassitismo e di biocontrollo (Lorito *et al.*, 1993a, b; Lorito *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 1998).

La chitina, omopolimero della N-acetil-D-glucosamina, è il principale costituente dell'esoscheletro di molti invertebrati e della parete cellulare della maggior parte dei funghi ed è, dopo la cellulosa, il polisaccaride più abbondante in natura. La degradazione enzimatica della chitina, ottenuta attraverso l'idrolisi dei legami β -1,4 dei singoli residui, è operata da diversi microrganismi, incluso numerose specie appartenenti a generi che vengono utilizzati nel biontrollo.

Trichoderma è uno dei più studiati microrganismi impiegati nella lotta biologica alle fitopatie: la sua capacità di produrre enzimi degradativi della parete cellulare fungina (CWDEs: cell wall degrading enzymes) quali cellulasi, chitinasi, glucanasi e proteasi è ormai ben nota, ed il sistema chitinolitico di *Trichoderma spp.* è stato analizzato a fondo con la caratterizzazione e lo studio del ruolo dei suoi principali enzimi (Lorito *et al.*, 1998).

Notevoli quantità di enzimi extracellulari dotati di attività litica sono stati isolati a partire da filtrati colturali di *S. chrysospermum* (Touzé-Soulet *et al.*, 1980). Nel caso di *Sepedonium* non sono ancora stati condotti studi che chiariscano il ruolo degli enzimi degradativi della parete cellulare fungina nei meccanismi di biocontrollo. Gli enzimi isolati da tale microrganismo, inoltre, non sono stati completamente caratterizzati.

Gli enzimi chitinolitici si differenziano tra di loro a seconda della loro attività e del prodotto di reazione:

- le endochitinasi scindono la chitina ed i chitooligomeri a caso, dando prodotti solubili di differente dimensione e basso peso molecolare;
- le 1,4- β -chitobiosidasi sono esochitinasi che attaccano la chitina ed i chitooligomeri a partire dalla estremità non riducente della catena, rilasciando solo diacetilchitobiosio (GlcNAc)₂;
- le β -N-acetilesosamminidasi (N-acetil-glucosamminidasi) sono esochitinasi che scindono la chitina dall'estremità non riducente rilasciando solo monomeri di N-acetilglucosammina (GlcNAc) (Lorito *et al.*, 1994b).

Nei funghi filamentosi le chitinasi possono svolgere due funzioni:

- 1) morfogenetica, lisando la chitina endogena e favorendo l'accrescimento ifale e la differenziazione delle spore e dei corpi fruttiferi;
- 2) nutrizionale, per ottenere zuccheri semplici o per penetrare i funghi parassitizzati (Gooday *et al.*, 1985).

Le chitinasi presentano un'alta attività antimicrobica e sinergica, e inibiscono fortemente la germinazione e la crescita ifale di numerosi funghi fitopatogeni.

Incrementi notevoli dell'attività inibitoria sono stati conseguiti con combinazioni di enzimi caratterizzati da un differente meccanismo d'azione (es. chitinasi combinata con glucanasi) (de la Cruz *et al.*, 1992; Lorito *et al.*, 1993b, 1994a,b, 1996).

L'attività litica ed antifungina delle chitinasi può essere notevolmente incrementata combinando enzimi con composti naturali o di sintesi che danneggiano le membrane cellulari (MACs: Membrane-Affecting-Compounds). (Lorito *et al.*, 1994 a, 1996). Tra questi ultimi ricordiamo antibiotici prodotti da *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. (trichozianine e gliotossine) o da altri microrganismi (gramicidina e valinomicina), enzimi (fosfolipasi), PR-proteins (Pathogenesis-Related protein) come ad esempio l'osmotina. Particolarmente interessante è il sinergismo osservato tra questi enzimi ed alcuni fungicidi, in special modo con i composti inibitori della sintesi degli steroli (EBI), quali (flusilazolo e miconazolo) che sono comunemente utilizzati contro malattie fungine di piante, animali ed esseri umani. In questo caso, il meccanismo dell'interazione sinergica prevede che i CWDEs, favorendo la degradazione della parete cellulare fungina, favoriscono la penetrazione dei fungicidi che raggiungono così concentrazioni intracellulari più elevate.

L'obiettivo di dimostrare l'azione sinergica tra gli enzimi degradativi della parete cellulare fungina e gli antibiotici, prodotti entrambi da *S. chrysospermum*, è stato raggiunto come riportato nella figura 3.33; è possibile quindi ipotizzare una similitudine tra l'attività di

Sepedonium e quella di altri funghi largamente utilizzati nel biocontrollo.

Rispetto alle chitinasi, le glucanasi possiedono un maggiore spettro d'azione, essendo in grado di idrolizzare polisaccaridi (β -glucani) contenuti nelle pareti di tutti i funghi fitopatogeni. Questi composti di parete sono omopolimeri di D-glucosio, nei quali i monomeri si legano mediante legami glucosidici di tipo α o β -1,3; 1,6. Le molecole si possono presentare come polimeri lineari, se presentano un solo tipo di legame, o ramificate quando presentano più tipi di legami diversi.

Le glucanasi sono distinte in eso - ed endo - glucanasi a seconda della loro attività. Le eso- β -glucanasi idrolizzano il polimero dall'estremità non riducente, dando come prodotto finale esclusivamente monomeri e dimeri, mentre le endo- β -glucanasi attaccano la molecola in punti a caso, rilasciando oligosaccaridi solubili di varie dimensioni. Le β -glucanasi più diffuse sembrano essere le β -1,3 (Benitez *et al.*, 1998), anche se la maggior parte delle eso-glucanasi presenti in natura mostra sia attività β -1,3, che β -1,6.

Sepedonium è in grado di produrre enzimi dotati di attività β -1,3 glucanasica che non sono stati ancora caratterizzati (Touzé-Soulet *et al.*, 1980). L'isolamento di una molecola proteica dotata di tale attività risulta particolarmente interessante per favorire e comprendere l'uso potenziale e le caratteristiche di questo nuovo agente di biocontrollo.

3.4 Sintesi chimica della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide

Allo scopo di avere sufficiente materiale da potere studiare in dettaglio i meccanismi di interazione molecolare tra patogeno ed antagonista è stata effettuata la sintesi chimica del metabolita antifungino 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide (DMB). Ciò ha permesso di disporre di quantità sufficienti di composto attivo per poter completare i saggi di attività biologica. Tale sintesi è stata realizzata secondo la procedura messa a punto da Casiraghi *et al.* (1980) per le reazioni selettive tra fenoli e formaldeide che conducono alle salicilaldeidi.

La sintesi, il cui protocollo è stato applicato con alcune modifiche, è stata condotta a partire dal 2,5-dimetilresorcinolo mediante reazione a caldo con la paraformaldeide dopo trattamento con tetracloruro di stagno (IV) e tributilammina.

In Figura 3.33 è riportato lo schema del meccanismo di reazione proposto da Casiraghi *et al.* (1980) nel caso specifico della DMB. Inizialmente [equazione (a)] il fenolo (2,5-dimetilresorcinolo) reagisce con il tetracloruro di stagno (IV) portando alla formazione di un intermedio fenossidico. L'acido cloridrico prodotto dalla reazione viene intrappolato dalla tributilammina (R_3N - reazione acido/base) evitando in tal modo la condensazione incontrollata, acido catalizzata, tra fenolo e formaldeide. Il secondo passaggio [equazione (b)] prevede l'interazione tra l'intermedio fenossidico e la formaldeide che dà un complesso attivato ed orientato, il quale favorisce la reazione in posizione orto. Nella fase successiva [equazione (c) e (d)] si ha il collasso intramolecolare, via dienone, con formazione di un derivato

intermedio. Nella equazione (e) interviene un processo redox tra il fenolo e la formaldeide che permette la produzione della salicilaldeide (DMB) e del metossido di stagno (IV). L'ultimo passaggio del ciclo catalitico è rappresentato dall'alcolisi del metossido di stagno (IV) con il 2,5-dimetilresorcinolo che permette il rilascio del metanolo e della specie reattiva fenossidica indicata nella equazione (a), che chiude così il ciclo.

La molecola sintetizzata è stata caratterizzata, dopo estrazione in ambiente acquoso basico, mediante LC/MS ed ha mostrato un picco caratteristico a 166 M^+ , confermando la struttura molecolare ipotizzata.

L'attività biologica nei confronti di *B. cinerea* del composto di sintesi è risultata uguale a quella del composto purificato a partire dai filtrati colturali di *S. chrysospermum*. Ciò permetterà di disporre di una notevole quantità del composto da potere impiegare quale standard per le ulteriori caratterizzazioni biologiche e le eventuali interazioni sinergiche con altri antibiotici.

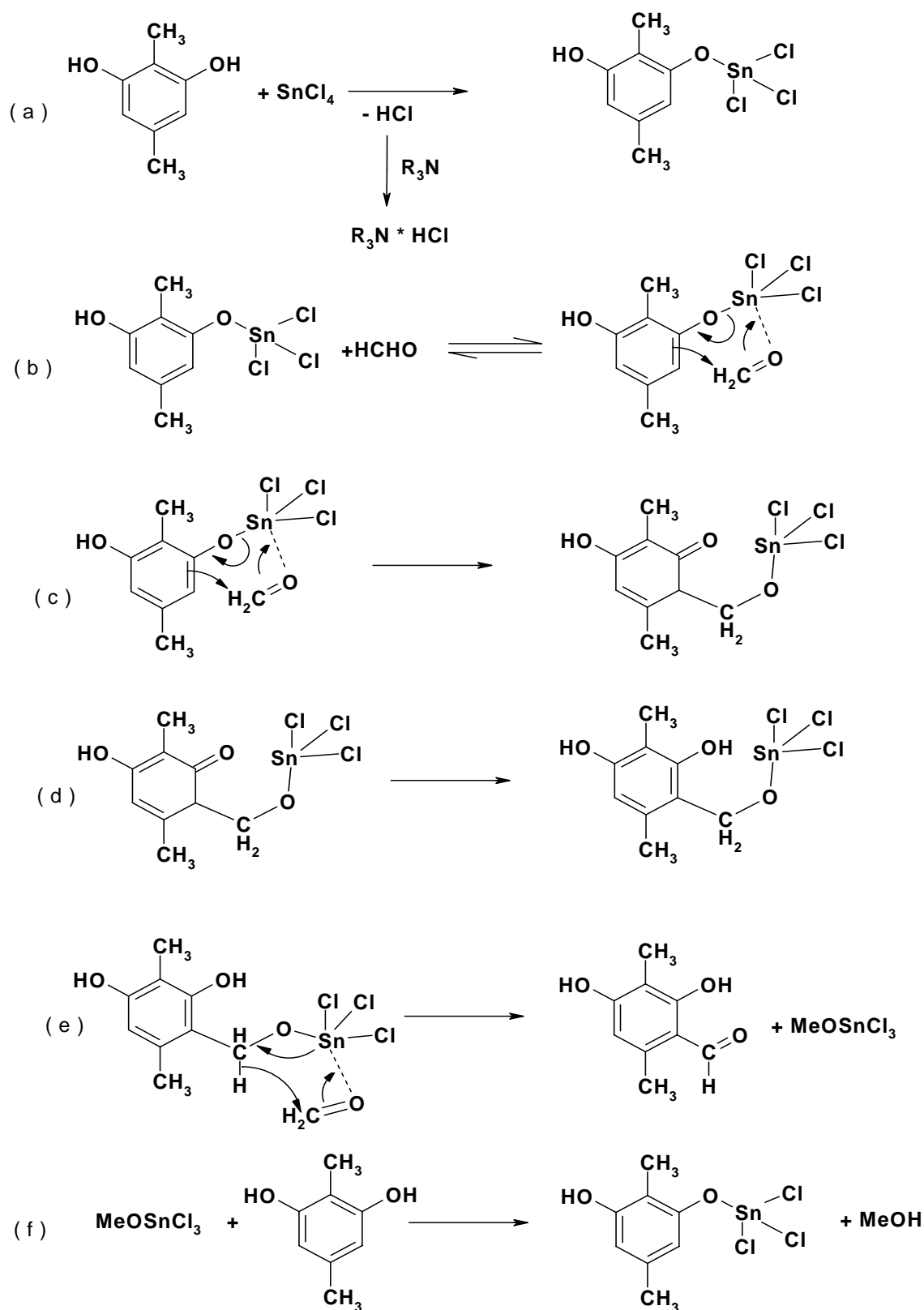


Figura 3.33: schema dei meccanismi di reazione coinvolti nella sintesi della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide.

4. CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha permesso di valutare le capacità antagoniste di *S. chrysospermum* (Bull.) Link: Fr. e ha confermato la possibilità di impiegare questo microrganismo quale agente di lotta biologica. Tali capacità sono state evidenziate mediante saggi di attività antagonistica *in vivo* nei confronti di due importati funghi fitopatogeni, *R. solani* e *B. cinerea*. Dall'analisi dei dati ottenuti è possibile affermare l'esistenza di un meccanismo di biocontrollo messo in atto da *S. chrysospermum* su piante di fagiolo inoculate con diversi patogeni.

Al fine di approfondire la conoscenza delle basi molecolari del meccanismo di azione di *S. chrysospermum*, sono stati effettuati studi sui metaboliti secreti dal fungo.

Sono stati purificati e parzialmente caratterizzati alcuni enzimi (chitinasi e glucanasi) prodotti da *S. chrysospermum* ed è stato ipotizzato un coinvolgimento di questi composti proteici nei meccanismi di biocontrollo.

Un metabolita antibiotico con la struttura chimica della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide è stato estratto, isolato e caratterizzato da filtrati colturali di *S. chrysospermum*. Il composto, finora mai isolato da filtrati colturali di *S. chrysospermum*, è stato caratterizzato dal punto di vista biologico sia per quanto concerne l'attività antibiotica che per quella fitotossica.

La 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide ha mostrato una notevole attività antifungina, soprattutto nell'inibizione dell'allungamento del tubetto germinativo di *B. cinerea*, a partire dalla concentrazione di

0.05 ppm. Infiltrata direttamente in foglie di fagiolo, essa ha dimostrato di possedere una scarsa pericolosità per le piante, poiché a concentrazioni alle quali la molecola è ancora attiva ai test di antibiosi essa risulta non fitotossica. Questa considerazione fornisce un supporto plausibile per una eventuale applicazione sia del principio attivo tal quale che del fungo antagonista.

Saggi su alcuni analoghi strutturali della 2,4-diidrossi-3,6-dimetilbenzaldeide (orcinolo, resorcinolo, 2,5-dimetilresorcinolo) hanno mostrato come la presenza del gruppo carbonilico nella struttura possa diminuire la capacità antibiotica del composto.

Saggiati in combinazione, gli enzimi litici ed il metabolita antibiotico hanno evidenziato un'interazione sinergica nell'inibizione della germinazione delle spore e della crescita ifale di *B. cinerea*.

S. chrysospermum produce notevoli quantità di sepedonina e del suo analogo strutturale, anidrosepedonina, metaboliti già noti in letteratura ed isolati da filtrati colturali del fungo. Tali composti sono probabilmente importanti nei meccanismi di biocontrollo in quanto dotati di buona attività antibiotica nei saggi di inibizione della germinazione delle spore e della crescita ifale di *B. cinerea*.

Inoltre sono stati ricercati nei filtrati colturali metaboliti di natura "peptaibolica", anch'essi coinvolti nei meccanismi di biocontrollo di altri funghi antagonisti. Tuttavia la procedura di estrazione di molecole peptidiche di natura peptaibolica non ha evidenziato la presenza di tali composti nei liquidi colturali (analizzata una singola frazione cromatografica). Ulteriori studi dovranno individuare la composizione chimica completa dei liquidi colturali che hanno fornito buoni risultati ai test di attività biologica.

Infine è stata messa a punto la sintesi chimica della 2,4-diidrossi-3,6-

dimetilbenzaldeide al fine di completare i saggi di attività biologica e valutare una possibile applicazione di tali molecole quali composti bioattivi utili nel biocontrollo.

In base ai dati raccolti in questo lavoro, è possibile dedurre le potenziali applicazioni di *S. chrysospermum* quale agente di controllo biologico e/o dei suoi metaboliti.

L'antibiosi, dimostrata dalla produzione di numerosi composti dotati di attività antimicrobica nel filtrato colturale, rappresenta uno dei possibili meccanismi di azione con il quale questo fungo è capace di ostacolare lo sviluppo di altri microrganismi patogeni. Non è da escludere tuttavia il coinvolgimento di altri fenomeni, quali il micoparassitismo, dal momento che sono state evidenziate attività di tipo chitinolitico e glucanolitico negli stessi filtrati.

Non da ultimo va considerata l'importanza della caratterizzazione e della messa a punto di idonee tecniche di estrazione dei metaboliti analizzati provenienti dagli stessi filtrati colturali di *S. chrysospermum*, dal momento che successivi studi potrebbero determinare l'applicabilità pratica di tali composti nel campo della difesa delle piante coltivate.

6. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Hafez, A.I.I., Moharram, A.M.M. and Abdel-Mallek, A.Y., 1987. Thermophilic and thermotolerant fungi associated with seeds of five members of umbelliferae from Egypt. *Cryptogam. Mycol.*, **8**, 315-320 (Abstract).

Agrios, G.N., 1998. *Plant Pathology* 4^o ed., Academic Press.

Ando, K., Kato, A., Tamura, G., Arima, K., 1969. Chemical study of fatty acids with antitumor activity isolated from fungal mycelia. *J. Antibiot.* (Tokyo), Jan.; **22** (1):23-26.

Arnold, G.R., 1971. Some species of mycophilic fungi. *Micol. Fitopatol.* **5**, 178-179.

Arnold, G.R.W. 1986. A contribution to the study of cuban microflora. *Feddes Repert.* **97**, 59-65 (Abstract).

Ashwell, G. 1957. Colorimetric analysis of sugar. In colowich, S. P., and Kaplan N. O. Eds. *Methods in enzymology*. **Vol III**. Academic Press. 73-105.

Baker, K.F., 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **25**, 67-85.

Benitez, T., Limòn, C., Delgado-Jarana, J., J. and Rey, M., 1998. Glucanolytic and other enzymes and their genes. In “Trichoderma and Gliocladium”, Kubicek, K. P. and Harman, G. E. Ed. Taylor & Francis, London, UK (2), pp. 101-127.

Benoni, H., Taraz, K., Korth, H., Pulverer, G., 1990. Characterization of 6-pentyl- α -pyrone from the soil fungus *Trichoderma koningii*. *Naturwissenschaften*, **77**, 539-540.

Betina, V., 1989. Structure-activity relationships among mycotoxins. *Chem. Biol. Interact.*, **71** (2-3),105-146.

Brewer, D., Mason, F.G., Taylor, A., 1987. The production of alamethicins by *Trichoderma* spp. *Can. J. Microbiol.* Jul, **33** (7), 619-625.

Brian, P.W. and Hemming, H.G., 1945. Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. *Annals Appl. Biol.*, **32**, 214-220.

Brian, P.W., Curtis, P.J., Hemming, H.G., McGowan, J.C., 1946. The production of viridin by pigment forming strains of *Trichoderma viride*. *Annals Appl. Biol.*, **33**, 190-200.

Brisbane, P.J., Rovira, A.D., 1988. Mechanism of inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* by fluorescent pseudomonads. *Plant Pathol.* **37**, 104-111.

Brown, L. R., 1980. In “Il 29 ° giorno”, ed. Sansoni Firenze.

Bruckner, H., König, W.A., Aydın, M., Jung, G., 1985. Trichotoxin A40. Purification by counter-current distribution and sequencing of isolated fragments. *Biochim. Biophys. Acta*, Jan 21, 827 (1), 51-62.

Camoni, I., Di Muccio, A., 1988. Aspetti tossicologici ed analitici delle impurezze dei fitofarmaci. *Atti Giorn. Fitopat.* 233-243.

Casiraghi, G., Casnati, G., Puglia, G., Sartori, G. and Tarenghi, G., 1980. Selective reactions between phenols and formaldehyde. A novel route to salicylaldehydes. *J. Chem. Soc.*, 1862-1865.

Chet, I. and Baker, R., 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia*. *Phytopathology*, **71**, 286-290.

Clavet, C., Pera, J. and Barea, J.M., 1993. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil*, **148**, 1-6.

Closse, A., Hauser, D., 1973. Isolation and constitution of chrysodine. *Helv. Chim. Acta*, **56** (8), 2694-2698.

Collins, R.P. and Halim, A.F., 1972. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 437-438.

Cook, R.J. and Baker, K.F., 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogen. *The American Phytopathology Society*, St.PAUL, MN.

Cutler, H.G., Cox, R.H., Crumley, F.G., Cole, P.D., 1986. 6-pentil- α -pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial activity. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2943-2945.

De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benítez, T., Pintor-Toro, J.A. and Llobell, A., 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*, **206**, 859-867.

De la Cruz, J., Pintor-toro, J. A., Benitez, T., Liobell, A. and Romero, C. L., 1995. A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN 13.1, involved in the micoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, **177**, 6937-6945.

Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C.K., Broadway, R.M. and Harman, G.E. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination gliotoxin. *Phytopathology*, **83**, 308-313.

Divekar, B.V., Raistrick, H., Dobson, T.A. and Vining, L.C., 1965. Studies in the biochemistry of microorganisms. Sepedonin, a tropolone metabolite of *Sepedonium chrysospermum*. *Cam. J. Chem.*, **43**, 1835.

Domsch, K.H., Gams, W., Traute-Heidi Anderson, 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, London Vol. 1, pp. 859.

Duijff, B.J., Baker, P.A.H.M., and Schippers, B., 1994. Suppression of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability. *Biocontrol Science and Technology*, **4**, 279-288.

Eparvier, A. and Alabouvette, C., 1994. Use of ELISA and GUS-trasformed strains to study competition between pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. *Biocontrol Science and Technology*, **4**, 35-47.

Foschi, S., Brunelli, A., Ponti, I., 1985. Terapia vegetale. Ed agricole Bologna, pp. 442.

Fujita, T., Wada, S., Iida, A., Nishimura, T., Kanai, M., Toyama, N. Fungal metabolites. XIII. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, trichodecenins-I and -II, from *Trichoderma viride*. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 1994 Mar., **42(3)**, 489-494.

Fukuzaki, T., Kobayashi, S., Hibi, T., Ikuma, Y., Ishihara, J., Kanoh, N., Murai, A., 2002. Studies aimed at the total synthesis of azadirachtin. A modeled connection of C-8 and C-14 in azadirachtin. *Org. Lett.*, **4** (17),2877-2880.

Gabriel, C. J. and Cook R. J., 1990. Biological control of plant pathogens. *FAO Plant Protection Bulletin*, **38**, 95-99.

Geremia, R. A., Jacobs, D., Goldman, G. H., Van Montagu, M., Herrera-Estrella, A., 1991. Induction and secretion of hydrolitic enzymes by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Biotic Inter. And Soil Borne Dis.*, **23**, 181-186.

Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K., 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.*, **23**, 1011-1020.

Godtfredsen, W. O., Vangedal, S., 1965. Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic. *Acta Chem. Scand.*, 19 (**5**), 1088-1102.

Gooday, G.W., Humphereys, M. and Mc Intosh, W.H., 1985. Roles of chitinases in fungal growth. In "Chitin in nature and technology". (Muzzerelli, R., Jeuniaux, C., and Gooday, G.W.). Plenum Press, N.Y., pp. 83-91.

Grigoriev, P., Kronen, M., Schlegel, B., Hartl, A., Grafe, U., 2002. Differences in ion-channel formation by ampullosporins B, C, D and semisynthetic desacetyltryptophanyl ampullosporin A. *Bioelectrochemistry* Sep. 57 (2), 119.

Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. and Chet, I., 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinase during mycoparasitism. *Phytopathology*, **86**, 980-985.

Harman, G. E., and Kubicek, C. P., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, London, 2.

Harman, G. E., Hayes, C. K., and Lorito, M. 1993. The genome of biocontrol fungi: modification and genetic components for plant disease management strategies. *American Chemical Society*, **6**, 684-689.

Harms, C. T., 1992. Engineering genetic disease resistance into crops: biotechnological approaches to crop protection. *Crop protection*, **11**, 291-306.

Harwig, J., Scott, P.M. 1971. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxin. *Appl. Microbiol.*, **23**, 1011-1016.

Hawksworth, D.L., 1981. A survey of the fungicolous conidial fungi. In *Biology of Conidial Fungi*. Ed. Cole, G.T. e Kendrick, B. Academic Press N.Y. **Vol. I**, pp.486.

Hong, Y., Pasternak, J. J. And Glick, B. R. 1991. Biological consequences of plasmid transformation of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*. **37**: 796-799

Itoh, Y., Kodama, K., Furuya, K., Takahashi, S., Haneishi, T., Takiguchi, Y., Arai, M., 1980. A new sesquiterpene antibiotic, heptelidic acid producing organisms, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibio.*, **33**, 468-473.

Jiao, Y., Yoshihara, T., Akimoto, M. and Ichihara, A., 1994. Two phenolic compounds from *Valsa ambiens*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58** (4), 784-785.

Jung, G., Bruckner, H., Schmitt, H., 1981. In *Structure and Activity of Natural Peptides*. Ed. by W. Voelter and G. Weitzel, Berlin, pp.75-114.

Kato, A., Ando, K., Kodama, K., Tamura, G., Arima, K., 1969. Identification and chemical properties of antitumor active monoglycerides from fungal mycelia. Studies on antiviral and antitumor antibiotics. *J. Antibiot.* (Tokyo) Feb., **22** (2), 77-82.

Klaassen, C. D., Amdur, M. O., Doull, J., 1986. Casart and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. Mac Millian Publishing Company New York, pp 337.

Kleifeld, O. and Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum* interaction with plants and effect on growth response. *Plant and soil*, **144**: 267-272.

Kloepper, J. W., Lifshitz, R., and Zablatowicz, R. M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*. **7**: 39-44.

Kitamoto Y, Kono R., Shimotori A., Mori N. and Ichikawa Y., 1987. Purification and some properties of an exo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Agriculture Biological Chemistry*, **51**, 3385-3386.

Koval, E.Z., Rozhenko, H.L. and Berehova, V.I., 1973. Distribution and ecology of mycophilous fungi in the Ukrainian-SSR USSR. *Ukr. Bot. Zh.* **30**, 60-63 (Abstract).

Koval, E., 1974. Flora of mycophilic fungi in southern primorye fareast USSR. *Nov. Sist. Nizshikh Rast.* **11**, 202-206 (Abstract).

Kuthubutheen, A.J., Pugh, G.J., 1979. Effects of fungicides on soil fungal populations. *Soil Biol. And Biochem.*, **11**, 297-304.

Lewis, J.A., Roberts, D.P. and Hollenbeck, M.D., 1991. Introduction of cytoplasmic leakage from *Rhizoctonia solani* hyphae by *Gliocladium virens* and partial characterization of a leakage factor. *Biocontrol Science and Technology*, **1**, 21-29.

Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S., 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, **85**, 1064-1068.

Lorito, M., Di Pietro, A., Hayes, C. K., Woo, S. L., and Harman, G. E., 1993a. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology*. 83: 721-728.

Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M, Tronsmo, A., Woo, S.L. and Di Pietro, A., 1993b. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, **83**, 302-307.

Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C.K. and Harman, G.E., 1994a. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, **140**, 623-629.

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

Lorito, M., Mach, R., Sposato, P., Strauss, J., Peterbauer, C.K., and Kubicek, C.P., 1996. Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the ech42 (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 14868-14872.

Lorito, M., Woo, S.L., Garcia Fernandez, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F., 1998. Geni from mycoparasitic fungi as a novel source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceeding of the National Accademy of Sciences, USA*, **95**: 7860-7865.

Lorito, M. and Scala, F., 1999. Microbial genes expressed in transgenic plants to improve disease resistance. *Journal of Plant Pathology*, **81**, 73-88.

Lorito, M., Del Sorbo, G and Scala, F., 2001. Molecular approches for increasing plant resistance to biotic and abiotic stress.(in corso di pubblicazione).

Mandeel, Q. and Baker, R., 1991. Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt on cucumber with strain of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **81**, 461-469.

Mannina, L., Segre, A. L., Ritieni, A., Fogliano, V., Vinale, F., Randazzo, G., Maddau, L., Bottalico, A., 1997. A New Fungal Growth Inhibitor from *Trichoderma viride*. *Tetrahedron*, **53**, (9), 3135-3144,.

Marquis, J. K., 1986. Contemporary issues in pesticide Toxicology and Pharmacology. Karger, Basel, pp. 289.

Matta, J.M., 1999. MRI and avascular necrosis. *J. Orthop. Trauma*, Sep-Oct., 13 (7), 524.

Moss, M.O., Jackson, R.M. and Rogers, D., 1975. The Characterization of 6-(Pent-1-enyl)- α -pyrone from *Trichoderma viride*. *Phytochemistry*, **14**, 2706-2708.

NAS - National Academy of Sciences, 1987. Report of the research briefing panel on biocontrol in managed ecosystems. Washington.

Okon, Y. 1985. *Azospirillum* is a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology*, **3**: 223-231.

Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann Rev. Phytopatol.* 23: 23-54.

Pierson, L. S., Thomashow, L.S., 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofacens*-30-84. *Mol. Plant – Microbe interact.* **5**, 330-339.

Prapula, S.G., Karanth, N.G., Engel, K.H., Tressl, R., 1992. Production of 6-Pentyl- α -pyrone by *Trichoderma viride*. *Flav. Fragr. J.*, **7**, 231-234.

Pyke, T.R., Dietz, A., 1966. U-21,963, a new antibiotic. I. Discovery and biological activity. *Appl. Microbiol.*, Jul., **14** (4), 506-510.

Rebuffat, S., Prigent, Y., Auvin-Guette, C., Bodo, B., 1991. Tricholongins BI and BII, 19-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. Solution structure from two-dimensional NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **201** (3), 661-674.

Ritieni, A., Fogliano, V., Nanno, D., Randazzo, G., Altomare, C., Perrone, G., Bottalico, A., Maddau, L., Marras, F., 1995. Paracelsin E, a new peptaibol from *Trichoderma saturnisporum*. *J. Nat. Prod.*, Nov., **58** (11), 1745-1748.

Ritzau, M., Heinze, S., Dornberger, K., Berg, A., Fleck, W., Schlegel, B., Hartl, A., Grafe, U., 1997. Ampullosporin, a new peptaibol-type antibiotic from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053 with neuroleptic activity in mice. *J. Antibiot. (Tokyo)* Sep., **50** (9), 722-728.

Sacchetti, A., 1997. L'uomo antibiologico. Ed. Feltrinelli.

Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Arisan-Atac, I., Scala, F., and Kubicek, C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied Environmental Microbiology*. **60**: 9-16.

Schneider, R.W., 1984. Effect of non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* on celery root. Infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* and a novel use of the Lineweaver Burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology*, **74**, 646-653.

Silo-Suh, L.A., Lethbridge, B.J., Raffel, S.J., He, H., Clardy, J., Handlsmann, J., 1994. Biological activities of two fungistic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW 85. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2023-2030.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C., 1981. In „Spectrometric identification of organic compounds“. Ed. Wiley & Sons, New York, pp. 95-136.

Sun, S.H., Huppert, M. and Cameron, R.E., 1978. Identification of some fungi from soil and air of Antarctica. *Antarctop. Res. Ser.* **30**, 1-26 (Abstract).

Tamura, G., Kato, A., Ando, K., Kodama, K., Suzuki, S., 1968. Antitumor-active monoglycerides produced by fungi. *J. Antibiot.* (Tokyo), Dec., 21 (**12**), 688-689.

Thomashow, I.S., Weller, D. M., 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var. Tritici*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3499-3508.

Touzé-Soulet, J.M., Dargent, R. and Rami, J., 1980. Les parois cellulaires de *Boletus edulis*: composition et dégradation enzymatique par deux mycoparasites du genre *Hypomyces*. *Phytopathology*, **98**, 246-259.

Tubaki, K., 1975. *Hypomyces* and the conidial states in Japan. *Kinjin Kenkjusho Kenkyu Hokoku*, **12**, 161-169 (Abstract).

Turoczi, G., Fekete, C., Kerenyi, Z., Nagy, R., Pomai, A., Hornok, L., 1996. Biological and molecular characterisation of potential biocontrol strains of *Trichoderma*. *J. Basic Microbiol.*, **36** (1), 63-72.

Viggiani, G., 1994. *Lotta biologica ed integrata nella difesa fitosanitaria*. Ed. Liguori, Napoli, pp 517.

Vinale, F., Fogliano, V., Schieberle, P., Hofmann, T., 1999. Development of a stable isotope dilution assay for an accurate quantification of protein-bound N(epsilon)-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-lysine using a (13)C-labeled internal standard. *J. Agric. Food Chem.*, Dec., **47** (12), 5084-5092.

Wada, S., Iida, A., Akimoto, N., Kanai, M., Toyama, N., Fujita, T., 1995. Fungal metabolites. XIX. Structural elucidation of channel-forming peptides, trichorovins-I-XIV, from the fungus *Trichoderma viride*. *Chem. Pharm. Bul.* (Tokyo) Jun, 43 (6), 910-915.

Weller, D.M., Cook, R.J., 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, **73**, 463-469.

Whipps, J.M., 1997. Development in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advance in Botanical Research*, **26**, 1-134.

William, A.A., Gökdemir, T., Miao, S. and Trifonov, L.S., 1993. Leptosphaerones A and B, new cyclohexenones from *Leptosphaeria herpotrichoides*. *J. Nat. Prod.*, **56** (9), 1647-1650.

Woo, S.L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Kubicek, C.P., Del Sorbo G. and Lorito M., 1998. Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 419-429.

Wright, J., Smith, D.J., McInnes, A.G., Vining, L.C., Westlake, D.W.S., 1969. Use of ¹³C in biosynthetic studies. Incorporation of acetate and formate into the fungal tropolone sepedonin. *Can. J. Bioche.* **47**, 945-949.

Yamano, T., Hemmi, S., Yamamoto, I., Tsubachi, K., 1970. Trichoviridin, a new antibiotic. Japanese Kokai 70 15435. Chem. Abstract., **73**, 65093.

Zoina, A., Raio, A., Lorito, M. and Noviello, C., 1990. Antagonismo *in vitro* di *Sepedonium chrysospermum* nei confronti di *Slerotinia slerotiorum* e di *Rhizoctonia solani*. Estratto dagli “Annali della Facoltà di Scienze Agrarie dell’Università di Napoli in Portici”. Serie IV, vol. XXIV, pp. 63-75.