

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE AGRARIE E AGROALIMENTARI

DOTTORATO DI RICERCA

IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

INDIRIZZO MIGLIORAMENTO GENETICO E ORTICOLTURA

- XXIII CICLO -

**STUDIO DELLA RISPOSTA DELLA PIANTA
DI POMODORO ALL'INTERAZIONE CON FUNGHI
BENEFICI DEL GENERE *TRICHODERMA***

Candidato:

Dott. LUIGI DE MASI

Relatore:

Prof. DOMENICO CARPUTO

Coordinatore:

Prof. MATTEO LORITO

Correlatore:

Dott.ssa MARINA TUCCI

Anno Accademico 2010-2011

*Ai miei piccoli, Gianluca (2008) e Giorgia (2010),
che mi hanno stimolato a dare di più anche nel lavoro e nello studio*

*A mia Moglie Concetta,
che mi ha incoraggiato e sostenuto nei momenti di bisogno*

*Ai miei Genitori, Mario e Carolina, che mi hanno trasmesso
la passione per lo studio e il desiderio di conoscere la natura delle cose*

INDICE

RIASSUNTO	IV
1. INTRODUZIONE	1
1.1. Il pomodoro come sistema sperimentale modello	2
1.2. Stress biotici nelle piante	7
1.2.1. Meccanismi di difesa delle piante	9
1.2.2. Vie di segnalazione di difesa e induzione di resistenza sistemica	11
1.2.3. Geni inducibili di difesa	16
1.2.4. Proteine PR	16
1.2.5. Lipossigenasi (LOX) e inibitori di proteinasi (PIN)	19
1.3. Obiettivi	21
2. MATERIALI E METODI	23
2.1. Materiale vegetale e condizioni di crescita	23
2.1.1. Coltura in terreno	24
2.1.2. Coltura idroponica	25
2.2. Condizioni di crescita degli antagonisti e trattamento delle piante	27
2.3. Condizioni di crescita del fitopatogeno e inoculazione delle piante	29
2.4. Rilievi biometrici sulle piante di pomodoro	31
2.5. Determinazione dell'attività auxino-simile di <i>Trichoderma</i>	32
2.6. Analisi molecolari di espressione genica relativa	32
2.6.1. Estrazione e purificazione di RNA da foglia	32
2.6.2. Retrotrascrizione per la sintesi di cDNA	35
2.6.3. Sequenze geniche di interesse, disegno dei primer e validazione	36

2.6.4. Analisi semiquantitativa dell'espressione genica mediante RT-PCR	40
2.6.5. Condizioni di amplificazione in Real Time qRT-PCR	41
2.6.6. Analisi quantitativa dell'espressione genica mediante Real Time qRT-PCR	43
3. RISULTATI	45
3.1. Effetti dell'interazione <i>in vivo</i> pianta- <i>Trichoderma</i>	45
3.1.1. Effetto biofertilizzante	45
3.1.1.1. Analisi biometriche delle colture in terreno	46
3.1.1.2. Analisi biometriche delle colture in idroponica	52
3.1.1.3. Azione biofertilizzante e attività auxino-simile di <i>Trichoderma</i>	56
3.1.2. Espressione di geni di difesa della pianta nell'interazione con <i>Trichoderma</i>	57
3.2. Effetti dell'interazione <i>in vivo</i> pianta- <i>Trichoderma</i> -patogeno	62
3.2.1. Induzione di resistenza sistemica al patogeno: analisi delle lesioni necrotiche	62
3.2.2. Espressione di geni di difesa nell'interazione pianta- <i>Trichoderma</i> -patogeno	65
4. DISCUSSIONE	70
4.1. Effetto biofertilizzante in terreno e idroponica	70
4.2. Induzione di resistenza sistemica al patogeno	77
4.3. Espressione di geni di difesa	80
5. CONCLUSIONI	89
6. PRODOTTI DELL'ATTIVITÀ DI DOTTORATO	91
7. BIBLIOGRAFIA	93

Such is the condition of organic nature!
whose first law might be expressed in the
words “Eat or be eaten!” and which would
seem to be one great slaughter-house, one
universal scene of rapacity and injustice!

Erasmus Darwin (1731-1802)

Phytologia, p.556 (1800).

RIASSUNTO

Gli organismi vegetali, nel loro ambiente naturale, interagiscono con numerosi microrganismi, alcuni dei quali potenzialmente dannosi perché patogeni, altri invece benefici poiché possono promuovere la crescita e attivare risposte naturali di difesa delle piante. I funghi rizosfera-competenti del genere *Trichoderma*, da tempo noti per il biocontrollo dei fitopatogeni, sono di particolare interesse per la loro capacità di stabilire interazioni simbiotiche a livello dell'apparato radicale e di esercitare, quindi, un effetto di promozione della crescita (biofertilizzante) e di attivazione delle difese naturali delle piante nei confronti di stress biotici (biopesticida). Nonostante il loro notevole interesse per l'agricoltura biologica e a basso *input*, restano ancora da indagare i meccanismi attivati da *Trichoderma* e il ruolo del genotipo della pianta ospite nell'interazione con il fungo benefico. Durante la presente attività di ricerca è stata studiata la risposta di diversi genotipi di pomodoro, coltivato e selvatico, all'interazione con funghi benefici del genere *Trichoderma*, in termini sia di promozione della crescita sia di attivazione delle risposte sistemiche di difesa al patogeno *Botrytis cinerea*. È stata dimostrata, per la prima volta, l'esistenza di variabilità in pomodoro per la capacità di interazione con le due specie di biocontrollo *T. harzianum* e *T. atroviride*, che ne modula l'esito. Infatti, mentre la maggior parte delle linee testate hanno mostrato una risposta benefica, come incremento della crescita e resistenza sistemica indotta (ISR) contro il patogeno *B. cinerea*, altre hanno evidenziato una risposta nulla o addirittura negativa. Tali risultati suggeriscono la possibilità di utilizzare il miglioramento genetico per ottenere nuove linee di pomodoro con un'ottimizzata capacità a interagire con questi microrganismi benefici e, quindi, più indicate per condizioni di coltivazione biologica o a basso *input*. I risultati ottenuti sull'attività trascrizionale di geni marcatori delle principali vie di segnalazione di difesa (*PR1b1*, *PR-P2*, *PIN1*, *PIN2*, *LoxA*, *LoxC* e *LoxD*) hanno evidenziato che il fungo benefico

è capace di indurre una risposta di lungo periodo, che si manifesta sotto forma di un'attivazione stabile della via di difesa mediata dall'acido salicilico, senza l'intervento di un patogeno. In seguito all'infezione con *B. cinerea* delle piante trattate con *Trichoderma*, è stato osservato un potenziamento dell'espressione di geni della via di difesa mediata dall'acido jasmonico, che hanno risposto più intensamente al patogeno (*priming*), in maniera dipendente dal genotipo della pianta. Questi risultati indicano che il meccanismo dell'induzione della resistenza sistemica attivato da *Trichoderma* in pomodoro è molto complesso. L'identificazione di differenze chiave tra i genotipi di pomodoro nella capacità di beneficiare di questa interazione simbiotica potrà contribuire all'individuazione di determinanti genetici della pianta coinvolti nell'interazione con il fungo benefico.

Parole chiave: resistenza sistemica indotta (ISR), biofertilizzazione, variabilità genetica.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

I sette miliardi di individui che oggi abitano il nostro pianeta, secondo le previsioni dell'ONU sulla crescita della popolazione, raggiungeranno la soglia dei nove miliardi nel 2040. I relativamente recenti sviluppi scientifici e tecnologici raggiunti dall'agricoltura moderna (*green e gene revolution*) dovrebbero consentire di soddisfare il conseguente aumento dei fabbisogni alimentari, migliorando la produttività agricola, garantire salute attraverso prodotti di qualità nutrizionale elevata, nel rispetto degli standard di sicurezza, e fornire reddito agli addetti. La capacità di espandere la produzione agricola è, tuttavia, notevolmente limitata dal progressivo depauperamento delle risorse ambientali, dovuto principalmente all'eccessivo sfruttamento, ai problemi ambientali, all'erosione della biodiversità, a una pratica agricola intensiva e agli effetti dei cambiamenti climatici, conseguenti al surriscaldamento globale di origine antropica iniziato, secondo un'ipotesi più recente, proprio in seguito all'introduzione dell'agricoltura (Ruddiman, 2003). L'ambiente dovrebbe essere inteso come patrimonio di tutti e importante risorsa per il futuro. Per garantire la conservazione di questa ricchezza naturale e, allo stesso tempo, una vita sana e di qualità alla nostra e alle future generazioni abbiamo il dovere di contribuire a sviluppare un'agricoltura eco-compatibile; intesa come un sistema integrato di pratiche per la produzione di piante e animali, rivolte a soddisfare le necessità dell'uomo nel lungo termine, preservando la natura attraverso l'uso di risorse rinnovabili e riducendo l'impatto ambientale dovuto all'uso di sostanze chimiche di sintesi (Budnik e Baur, 2009; Debenest *et al.*, 2010). Le preoccupazioni legate alla presenza di residui di tali composti nell'ambiente e nei prodotti agroalimentari hanno stimolato la ricerca di metodi alternativi per la fertilizzazione e il controllo delle malattie delle piante. Numerosi studi sono in corso a tal proposito, volti alla messa a punto di strategie di controllo integrato o biologico delle

malattie (biocontrollo) e al progressivo miglioramento dei fertilizzanti chimici, meno tossici e persistenti, integrati o sostituiti dall'uso di materia organica e/o da organismi che promuovono la crescita delle piante (biofertilizzanti). Un interessante contributo alla soluzione del problema può essere rappresentato dall'utilizzo di microrganismi antagonisti dei patogeni, in grado di esercitare spesso, oltre ad un'azione biopesticida, anche un'azione biofertilizzante nei confronti delle piante con cui interagiscono, promuovendone lo sviluppo e la crescita.

1.1. Il pomodoro come sistema sperimentale modello

Il pomodoro coltivato, *Solanum lycopersicum* L. (ex *Lycopersicon esculentum* Mill.) della famiglia delle *Solanaceae*, è una pianta erbacea dicotiledone originaria dell'America meridionale, il cui centro di origine è localizzato nella zona delle Ande compresa tra il Cile e l'Ecuador (Spooner *et al.*, 2005). In questo areale, sono presenti ancora oggi specie selvatiche di pomodoro con frutti gialli o verdi a pezzatura piccola, che rappresentano un'importante fonte di variabilità genetica e di resistenza ai patogeni. Qui venne coltivato, consumato e selezionato dalle popolazioni incaiche ed azteche che lo chiamarono "tomatel". Dalla scoperta dell'America, la sua coltivazione si diffuse in tutto il mondo. Attualmente, il pomodoro coltivato rappresenta, dopo la patata, la più importante coltura di tipo non cereale a livello mondiale e senza dubbio il più popolare raccolto dell'orto domestico. I principali produttori sono rappresentati, in ordine decrescente, da Cina, USA, India, Turchia, Egitto e Italia (dati FAO 2009, <http://faostat.fao.org>); quest'ultima inoltre occupa un posto preminente anche tra i maggiori consumatori. Il nostro Paese, con una produzione in continua crescita di quasi 7 milioni di tonnellate nel 2009, tra prodotto fresco e destinato alla trasformazione, è interessato soprattutto a portare sul mercato un prodotto di elevata qualità, particolarmente ricercato dai consumatori. Infatti, la bacca di

pomodoro riveste una particolare rilevanza in numerose diete alimentari, tra cui la tradizionale dieta Mediterranea, per le sue pregevoli caratteristiche organolettiche e proprietà salutistiche, in quanto particolarmente ricca di fibre, sali minerali, vitamine C ed E, metaboliti secondari quali carotenoidi (licopene e β -carotene) e composti fenolici (flavonoidi), tutti antiossidanti con dimostrata azione benefica nei confronti di malattie cardiovascolari, crescita tumorale e patologie dell'invecchiamento (Frusciante *et al.*, 2007). La coltivazione integrata o biologica di varietà adeguate rappresenta un'opportunità per ottenere sufficiente reddito da questa coltura di qualità. Da questo punto di vista, quindi, rivestono particolare importanza la nutrizione e la difesa delle piante, in pieno campo e in serra, che devono poter coniugare la produttività con il rispetto dell'ambiente.

Le *Solanaceae* rivestono una notevole rilevanza economica poiché annoverano, tra le oltre 3000 specie componenti, importanti piante da reddito: melanzana, patata, peperone e tabacco. Nell'ambito di questa famiglia, il pomodoro ha assunto un ruolo importante in studi di genetica e genomica, non soltanto per il suo interesse economico, ma soprattutto grazie ad alcune importanti caratteristiche intrinseche e applicative. In particolare, contribuiscono a farne un valido organismo modello per la famiglia delle *Solanaceae* e, in generale, per altre importanti specie vegetali: la presenza di un genoma diploide ($2n = 24$) di dimensioni relativamente modeste (950 Mbp) con circa 35.000 geni, la disponibilità di risorse genetiche naturali, la tolleranza all'inincrocio, la non refrattarietà alle colture *in vitro* e alla trasformazione genetica, la sequenza dell'intero genoma in corso di completamento, la disponibilità di piattaforme tecnologiche basate sulla combinazione delle analisi "omiche" ad alta processività e delle risorse genetiche (Acciarri *et al.*, 2010; Barone *et al.*, 2009; Tucci *et al.*, 2010). Infatti, il pomodoro coltivato rappresenta un importante sistema sperimentale per condurre studi sulla fisiologia, lo sviluppo del frutto,

la genetica quantitativa, il miglioramento genetico, la risposta a stress biotici e abiotici (Acciarri *et al.*, 2010).

La pianta di pomodoro può essere soggetta all'attacco di più di 100 differenti patogeni, che hanno come bersaglio specifiche parti della pianta e producono sintomi caratteristici di malattia (**Fig. 1**) (Jones *et al.*, 1991). Per la difesa di tali patogeni, si dovrà sempre più tendere in futuro al ricorso a strategie di difesa integrata e all'impiego di varietà specificamente selezionate, in grado di resistere ad un ampio spettro di specie patogene e/o di avvantaggiarsi al meglio di strategie di lotta alternative ai pesticidi di sintesi. Pertanto, riveste notevole interesse il miglioramento genetico di questa specie, che è tuttavia limitato dal basso livello di variabilità genetica presente nelle cultivar oggi disponibili, come dimostrato attraverso studi condotti a livello del DNA mediante l'uso di marcatori molecolari (Monforte e Tanksley, 2000).

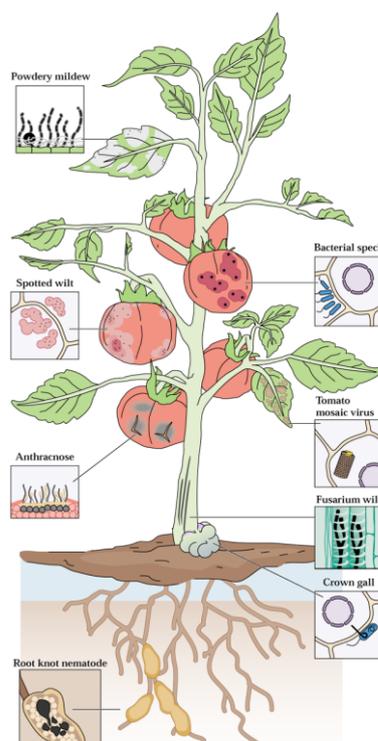


Figura 1. La pianta di pomodoro può essere sottoposta all'attacco di differenti patogeni, che colpiscono specifici tessuti bersaglio con la produzione di sintomi caratteristici della malattia. Tratto da: Buchanan, B.B., Gruissem, W. e Jones, R. eds. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p. 1104.

Tuttavia, numerose sono le corrispondenti specie selvatiche sessualmente compatibili o comunque utilizzabili per il miglioramento genetico del pomodoro coltivato, che rappresentano un'immensa risorsa di germoplasma con caratteristiche utili per resistenza a malattie, tolleranze ambientali e tratti d'interesse agronomico (Spooner *et al.*, 2005). Al fine di facilitare l'utilizzazione del patrimonio rappresentato dalle specie selvatiche, sono state sviluppate con successo diverse popolazioni di linee di introgressione (*introgression lines*, IL). Una popolazione di IL è composta da un insieme di linee quasi isogeniche (*nearly isogenic lines*, NIL), ottenute per reincrocio, ciascuna con una singolo segmento cromosomico della specie selvatica allo stato omozigote nel *background* genomico della specie coltivata. La prima popolazione di IL di pomodoro è stata ottenuta a partire dall'incrocio *S. pennellii* LA0716 x *S. lycopersicum* M82 (Rick, 1969; Eshed e Zamir, 1995) Successivamente ne è stata sviluppata un'altra da *S. habrochaites* LA1777 x *S. lycopersicum* TA209 (Monforte e Tanksley, 2000). Le IL sono identiche per l'intero genoma eccetto che per il segmento cromosomico introdotto, quindi una variazione fenotipica osservata in queste linee può essere associata specificamente con la regione introgressa corrispondente. Queste popolazioni risultano particolarmente vantaggiose per l'identificazione di nuovi geni, di alleli utili e *loci* associati a caratteri quantitativi (*quantitative trait loci*, QTL), come resistenza a stress biotici e abiotici, miglioramento della qualità del frutto o della resa ecc., che possono quindi essere trasferiti attraverso incroci convenzionali o transgenesi nella specie coltivata per l'ottenimento di nuove varietà. Considerati gli strumenti genetici e genomici disponibili per questa specie, il pomodoro è stato scelto come sistema sperimentale per la presente Tesi. In particolare, sono state utilizzate le quattro linee di pomodoro Corbarino, M82, SM36 e TA209 appartenenti alla specie coltivata *Solanum lycopersicum* e le due accessioni di pomodoro selvatico *S. habrochaites* LA1777 e *S. pennellii* LA0716. La cultivar campana Corbarino

presenta crescita indeterminata e bacche a tipo ciliegina (*cherry-like*), è tollerante a stress abiotici (principalmente siccità) ed è usata per la trasformazione industriale, per il consumo fresco e per il serbo. Le due linee *inbred* M82 e TA209, da tempo utilizzate per il miglioramento genetico, sono destinate principalmente alla trasformazione industriale, portano i geni di resistenza *I* (immunità a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) e *Ve* (resistenza a *Verticillium*). Entrambe mostrano un *habitus* di crescita determinato, bacche di medie dimensioni, rispettivamente cilindriche e subcilindriche. La linea SM36, ad avanzato stadio di *breeding* e tollerante temperature relativamente basse ed elevate, con un *habitus* di crescita semi-determinato e bacche cilindriche, porta i geni di resistenza *I* e *Ve* e deriva da un incrocio interspecifico tra *S. pimpinellifolium* e la cultivar tradizionale di pomodoro campano San Marzano. L'accessione peruviana LA0716 della specie selvatica allogama *S. pennellii* presenta un *habitus* di crescita indeterminato, bacche piccole e verdi, tolleranza nei confronti della siccità e pubescenza intermedia con tricomi ghiandolari sulle parti aeree della pianta che conferisce resistenza agli insetti (Spooner *et al.*, 2005). L'accessione peruviana LA1777 della specie selvatica allogama *S. habrochaites* è caratterizzata da un *habitus* di crescita indeterminato, piccole bacche verdi striate, resistenza al freddo, al gelo e alla peronospora (*Phytophthora infestans*), densa pubescenza con tricomi ghiandolari su tutte le parti aeree della pianta che conferisce resistenza agli insetti (Spooner *et al.*, 2005). I genotipi parentali, coltivati e selvatici, delle IL sono stati oggetto del presente studio anche con l'obiettivo di poter trasferire i risultati conseguiti alle popolazioni di IL attualmente disponibili, nell'ambito di una successiva attività di ricerca, per l'esplorazione della variabilità genetica presente nelle corrispondenti specie selvatiche parentali.

1.2. Stress biotici nelle piante

Le piante sono costantemente esposte, nel loro *habitat*, all'azione di molteplici avversità, che possono influenzarne negativamente lo sviluppo, la crescita e la riproduzione, fino a causarne, in caso estremo, la morte. Nelle varietà d'interesse agrario esse possono determinare anche notevoli cali nella produttività e/o nella qualità dei prodotti, con conseguente deprezzamento e danno economico. Le malattie che colpiscono le piante si distinguono, da una parte, in fitopatie, determinate dall'azione competitiva di altri organismi viventi quali insetti erbivori, nematodi, virus, batteri, funghi patogeni ecc. (stress biotici) e, dall'altra, in fisiopatie, causate dall'avversità di fattori ambientali di tipo fisico-chimico, quali ridotta disponibilità idrica, carenza di nutrienti, eccesso di sali, temperature estreme ecc. (stress abiotici). I patogeni, in particolare, agiscono attraverso meccanismi che favoriscono la propria proliferazione e inducono nella pianta modificazioni che influenzano le attività fisiologiche e i processi metabolici di base, determinando, ad esempio, ridotta capacità di fotosintesi e una crescita sbilanciata, col risultato di ridurre la produzione sia sotto gli aspetti quantitativi che qualitativi. I fitopatogeni sono classificati, sulla base delle loro particolari modalità di azione nei confronti dell'ospite, in necrotrofi, che uccidono le cellule per mezzo di molecole tossiche e decompongono i tessuti vegetali attraverso enzimi litici prima di nutrirsi per la loro crescita, e in biotrofi che, al contrario, traggono nutrimento da cellule ancora vitali (**Fig. 2**) (Glazebrook, 2005). In aggiunta a queste, esiste un'altra classe di patogeni delle piante, denominati emibiotrofi, che presenta entrambi i comportamenti precedenti in base al particolare stadio del ciclo biologico (**Fig. 2**). Un tipico esempio di patogeno necrotrofo è il fungo ascomicete *Botrytis cinerea* (muffa grigia), considerato un importante organismo modello ad ampio spettro d'ospite (polifago) per studi di patogenesi vegetale e per il quale è attualmente disponibile l'intera sequenza del genoma (Van Kan, 2006).

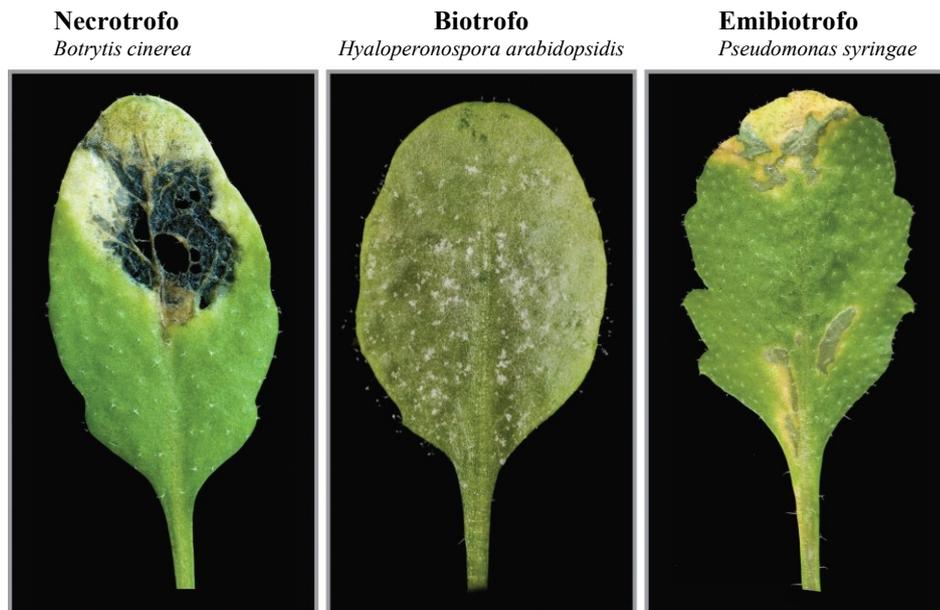


Figura 2. Foglie di *Arabidopsis thaliana* con sintomi di malattie causate da un fungo necrotrofo (*Botrytis cinerea*), un oomicete biotrofo (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) e un batterio emibiotrofo (*Pseudomonas syringae*). Tratto da: Pieterse *et al.* (2009).

In pomodoro, questo patogeno può attaccare tutti gli organi epigei della pianta, in tutti gli stadi di sviluppo vegetativo, risultando particolarmente dannoso per le colture in serra (Siviero e Bergamini, 2001). Le necrosi prodotte da questo patogeno assumono in genere l'aspetto di marciumi molli, con perdita di consistenza dei tessuti colpiti, mentre si verifica il proliferare della caratteristica muffa grigia, costituita da micelio e rametti conidiofori. Per la germinazione e lo sviluppo, *B. cinerea* necessita di umidità prossima alla saturazione, di persistente bagnatura dei tessuti vegetali e di temperature ottimali comprese tra 18 e 25°C. I conidi fungini del patogeno si conservano nei residui vegetali presenti nel suolo, anche per periodi piuttosto lunghi, mentre la trasmissione è operata dall'acqua e attraverso ferite.

1.2.1. Meccanismi di difesa delle piante

Nel corso della loro lotta senza fine per la sopravvivenza contro i patogeni, le piante superiori hanno evoluto sofisticati meccanismi di difesa, specifici o ad ampio spettro, che consentono di riconoscere a livello molecolare il patogeno e controllare lo sviluppo dell'infezione. Nella norma lo sviluppo della malattia è un evento raro, che si verifica allorché la pianta è infettata da un patogeno virulento, che non attiva o reprime le reazioni di resistenza della pianta o, ancora, riesce a eludere le difese attivate, che quindi falliscono nella loro missione. Di conseguenza, lo sviluppo di una particolare patologia dipende dal risultato dell'interazione di tre fattori chiave (triangolo della malattia): suscettibilità del particolare genotipo della pianta ospite, virulenza del particolare genotipo del patogeno, condizioni ambientali. In ultima analisi, il risultato dello scontro (resistenza o suscettibilità) dipende da un bilancio tra la capacità e la rapidità del patogeno nel sopprimere il "sistema immunitario" della pianta e la rapidità di quest'ultima nel percepire il patogeno e tradurre efficacemente questa percezione nell'attivazione delle risposte di difesa.

Le piante posseggono due tipi principali di barriere nei confronti dei patogeni: difese costitutive di tipo passivo (ad es. cuticola fogliare, parete cellulare e metaboliti secondari) e difese inducibili di tipo attivo (ad es. rafforzamento delle pareti cellulari, fitoalessine). La seconda categoria di risposte comprende la massiccia attivazione di meccanismi di difesa a livello locale e sistemico. In particolare, secondo le attuali conoscenze a riguardo, la pianta mette in atto una risposta all'infezione, prima a livello locale e poi sistemico, mediante i seguenti meccanismi principali, non necessariamente secondo l'ordine elencato (**Fig. 3**): (1) generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), (2) risposta ipersensibile (*hypersensitive response*, HR) attraverso la morte programmata delle cellule vegetali (apoptosi) per contenere l'invasione, (3) attivazione di enzimi di difesa precostituiti, (4)

produzione di metaboliti secondari antimicrobici (5) espressione di geni correlati alla patogenesi (*pathogenesis-related, PR*) e alla difesa, (6) rafforzamento delle pareti cellulari attraverso la sintesi di callosio e lignina, (7) produzione di molecole segnale che inducono una risposta sistemica spostandosi o mediando la risposta a distanza.

Tipicamente, la HR è efficace contro i patogeni biotrofi, mentre potrebbe favorire la crescita dei necrotrofi, la cui virulenza si basa sulla capacità di uccidere le cellule dell'ospite (Hammerschmidt, 2011; Pieterse *et al.*, 2009). Più efficaci contro quest'ultimo genere di patogeni sono le risposte specifiche a tossine e a molecole associate alla degradazione della parete della cellula vegetale operata da enzimi (*cell wall-degrading enzymes, CWDE*).

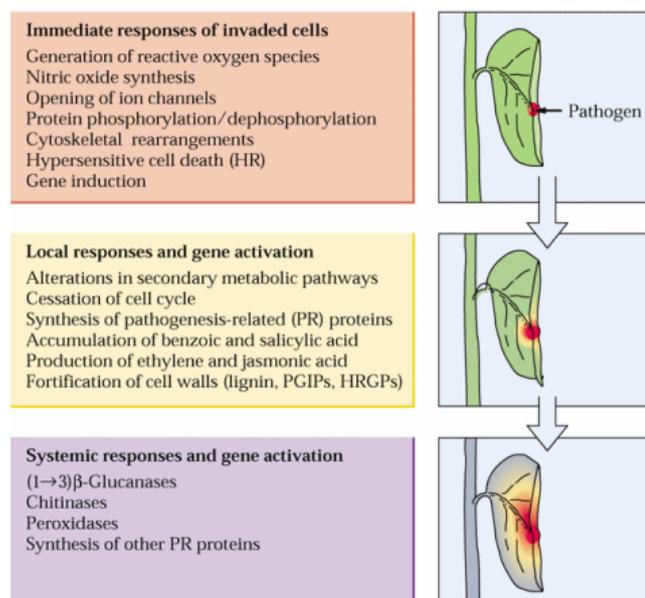


Figura 3. Principali risposte di difesa locali e sistemiche della pianta in seguito all'infezione da parte di un patogeno generico. Tratto da: Buchanan, B.B., Gruissem, W. e Jones, R. eds. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p. 1104.

1.2.2. Vie di segnalazione di difesa e induzione di resistenza sistemica

Le piante superiori producono numerosi e diversi tipi di molecole ad attività ormonale, alcune delle quali possono essere di particolare importanza nelle reazioni di difesa allo stress biotico: acido salicilico (SA), acido jasmonico (JA) ed etilene (Et) (Pieterse *et al.*, 2009). Recenti studi hanno fornito evidenze che in queste risposte di protezione siano implicati anche altri ormoni, già conosciuti per svolgere importanti funzioni nello sviluppo e nella crescita della pianta (Bari e Jones, 2009; Pieterse *et al.*, 2009): auxine, acido abscissico (ABA), gibberelline (GA), citochinine (CK) e brassinosteroidi (BR) (**Fig. 4**).

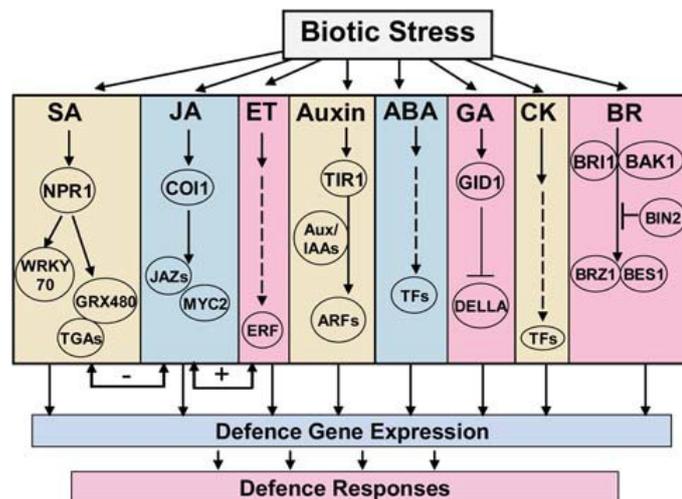


Figura 4. Principali vie di segnalazione di difesa e fitormoni coinvolti in risposta ad uno stress biotico nelle piante superiori. Tratto da: Bari e Jones (2009).

Le variazioni positive dall'omeostasi dei livelli ormonali attivano nelle piante almeno due diverse risposte sistemiche adattative di difesa per fronteggiare il pericolo: (1) la resistenza sistemica acquisita (*systemic acquired resistance*, SAR), attivata come risposta a uno stress biotico, mediata da SA e associata alla produzione di proteine PR; (2) la resistenza sistemica indotta (*induced systemic resistance*, ISR), mediata da JA/Et, in seguito all'interazione dell'apparato radicale con batteri benefici del suolo rizosfera-competenti, conosciuti anche come rizobatteri che promuovono la crescita delle piante

(*plant growth-promoting rhizobacteria*, PGPR), appartenenti ad esempio a specie non patogene dei generi *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*.

La SAR è una sorta d'immunità, simile negli effetti a quella degli animali, dovuta all'attivazione di meccanismi di protezione dormienti in seguito a un iniziale evento infettivo di bassa entità, si manifesta in una successiva occasione d'incontro con lo stesso o altri patogeni ed è associata in particolar modo con lo sviluppo della HR (Ryals *et al.*, 1996). Questa resistenza è di tipo sistemico, poiché la capacità difensiva non aumenta soltanto nel sito primario dell'infezione, ma anche in tessuti sani spazialmente separati (Fig. 5). Si verifica, quindi, una forma di "immunizzazione", paragonabile per gli effetti alla vaccinazione.

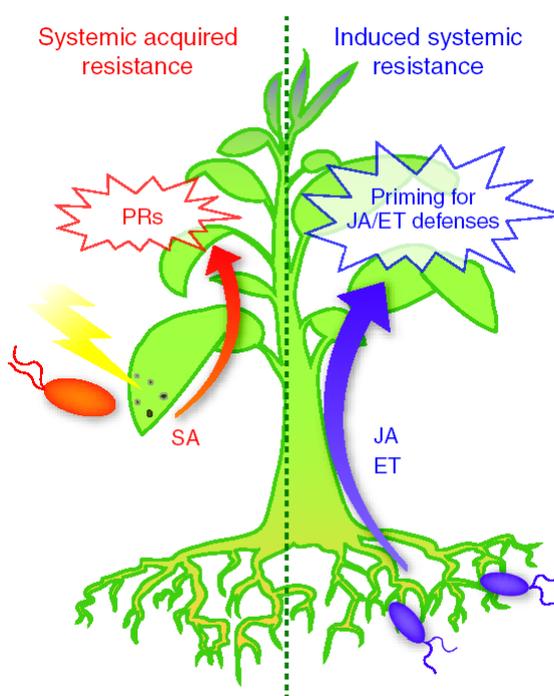


Figura 5. Le principali risposte di resistenza della pianta indotte a livello sistemico. La SAR è attivata in tessuti sani, distanti dal sito d'infezione, ed è mediata da SA. L'ISR è attivata nell'intera pianta in seguito all'instaurarsi di una simbiosi con microrganismi benefici a livello della rizosfera ed è mediata da JA/ET.

Tratto da: Pieterse *et al.* (2009).

L'attivazione di tale risposta è caratterizzata dall'accumulo locale e sistemico di SA e dall'induzione di specifici geni *PR* con attività antimicrobica (**Fig. 5**), che si correlano con una resistenza sistemica ad ampio spettro, particolarmente utile nel lungo periodo contro infezioni successive da parte di patogeni biotrofi ed emibiotrofi (Harman *et al.*, 2004a; Pieterse *et al.*, 2009).

Al contrario, la via di segnalazione di difesa mediata da JA/Et è in genere associata con la protezione contro patogeni necrotrofi e con la risposta a ferita, efficace contro insetti erbivori (Pieterse *et al.*, 2009). Inoltre, l'attivazione sistemica della via di segnalazione mediata da JA/Et, da parte di microrganismi benefici come i PGPR che instaurano una simbiosi a livello radicale, può conferire alla pianta una protezione ad ampio spettro nei confronti di stress biotici attraverso il meccanismo noto come ISR, che non richiede l'attivazione dei geni *PR* (**Fig. 5**) (Harman *et al.*, 2004a; Pieterse *et al.*, 1996; Pieterse e van Loon, 1999; Van der Ent *et al.*, 2009).

Alcuni funghi benefici del genere *Trichoderma* sono noti da tempo per promuovere la crescita delle piante (*plant growth-promoting fungi*, PGPF), in seguito all'instaurarsi di un'associazione mutualistica simile alla micorrizia. Tra i meccanismi proposti per spiegare tale fenomeno vi sono l'incremento della biodisponibilità dei nutrienti attraverso la solubilizzazione dei minerali (Yedidia *et al.*, 2001; Rudresh *et al.*, 2005) e la produzione di metaboliti ormono-simili ad azione fitostimolante da parte del fungo benefico (Benitez *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010). Studi relativamente recenti hanno mostrato che *Trichoderma* può anche indurre una resistenza di tipo sistemico nei confronti di molti patogeni, simile nel meccanismo di attivazione e negli effetti a quella indotta da PGPR (Hanson e Howell, 2004; Harman *et al.*, 2004a; Mandal e Mitra, 2007; Segarra *et al.*, 2007, 2009). *Trichoderma* rappresenta un genere di funghi saprofiti, cosmopoliti nel suolo e comuni nell'ecosistema della rizosfera. Questo fungo è noto da tempo per essere un valido

agente di biocontrollo di fitopatogeni fungini economicamente importanti (Benitez *et al.*, 2004; Elad, 2000; Verma *et al.*, 2007), attraverso un'efficiente competizione per lo spazio e i nutrienti (antagonismo) e la biosintesi di prodotti antibiotici (antibiosi) ed enzimi idrolitici (micoparassitismo) (Harman *et al.*, 2004a; Howell, 2003; Vinale *et al.*, 2008b). Nel 1997, Bigirimana *et al.* dimostrarono, per la prima volta, che *T. harzianum* era in grado di indurre resistenza sistemica a malattia in fagiolo. Il lavoro successivo di De Meyer *et al.* (1998) dimostrava l'esistenza di ISR contro *B. cinerea* in alcune specie ortive, incluso il pomodoro. A tutt'oggi, sono stati effettuati numerosi studi su diverse piante monocotiledoni e dicotiledoni, trattate con differenti specie e isolati di *Trichoderma*, che hanno confermato i primi risultati e ampliato le nostre conoscenze a riguardo (Lorito *et al.*, 2010). Queste indicano che *Trichoderma*, in seguito alla colonizzazione delle radici, attiva un meccanismo di induzione dei sistemi di difesa della pianta che, a sua volta, riesce a ridimensionare l'infezione in tessuti distanti (Harman *et al.*, 2004a, 2004b; Harman, 2006; Yedidia *et al.*, 1999, 2003). Nella zona d'interazione con la radice, il fungo rilascia molecole bioattive, tra cui elicitatori di resistenza (peptaiboli) e CWDE (Schirmbock *et al.*, 1994; Vinale *et al.*, 2008b). La pianta a sua volta risponde attivando alcuni geni codificanti proteine di difesa, che includono sia enzimi antifungini quali chitinasi e glucanasi (Yedidia *et al.*, 2000) sia enzimi ossidativi come perossidasi e lipossigenasi (Vinale *et al.*, 2008b), come anche producendo composti antimicrobici, quali fitoalessine, glucosidi fenolici, terpenoidi (Howell *et al.*, 2000) e capsidiolo (Sid Ahmed *et al.*, 2000). Di conseguenza, la pianta viene a trovarsi in uno stato di pre-allerta che le consente di rispondere più efficacemente ad un eventuale attacco di un patogeno (Conrath *et al.*, 2002; Gailite *et al.*, 2005).

Tuttavia, nonostante l'importanza dell'argomento, le conoscenze dei meccanismi di difesa che sono attivati in pianta in seguito all'interazione con *Trichoderma* sono ancora

scarse e ciò limita notevolmente una sua più ampia utilizzazione. Poche e contrastanti sono, a tutt'oggi, le evidenze scientifiche riguardo alle vie di segnalazione di difesa attivate in pianta in seguito all'interazione con *Trichoderma*. Alcuni Autori hanno evidenziato in melone un'attivazione differenziale della via mediata da SA e di quella mediata da JA/Et in seguito all'interazione con *T. longibrachiatum* (Martinez *et al.*, 2001), altri invece indicano come possibile via di segnalazione quella mediata da JA/Et in risposta a *T. asperellum* in cetriolo (Shoresh *et al.*, 2005), così come dimostrato per alcuni rizobatteri in *Arabidopsis thaliana* (Ahn *et al.*, 2007).

Nonostante sia stato osservato che le due diverse vie di segnalazione di difesa del SA e del JA/Et, di solito, siano mutualmente antagoniste (**Fig. 4**), di recente è stata riportata in tabacco e *Arabidopsis* una loro possibile sinergia reciproca, dimostrando che l'interazione SA-JA è dipendente dalla concentrazione relativa di ciascun ormone (Mur *et al.*, 2006). Inoltre, lo spostamento verso un'interazione di tipo antagonistico o sinergico delle due vie metaboliche (*pathway*) di segnalazione può rappresentare un nuovo meccanismo per modulare finemente la risposta di difesa della pianta, che nel suo ambiente naturale è esposta, simultaneamente e/o in successione, a molteplici avversità biotiche e abiotiche, oltre che a interazioni di tipo benefico con PGPR e PGPF (Mur *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2009). Infine, le due differenti vie di segnalazione hanno mostrato un importante aspetto in comune. Infatti, piante in cui è stata prima attivata una delle risposte di resistenza sistemica (SAR o ISR) manifestano un'espressione più anticipata e più intensa di alcuni geni di difesa in seguito all'infezione da parte di un patogeno, attraverso un fenomeno di potenziamento dell'immunità acquisita noto come *priming* (**Fig. 5**) (Conrath *et al.*, 2001, 2002, 2006; Harman *et al.*, 2004a; Pieterse *et al.*, 2009).

Una conoscenza più approfondita dei meccanismi di azione che sono attivati nelle piante come risposta a *Trichoderma* spp. appare indispensabile per consentire un impiego

più diffuso di questo fungo, come agente biofertilizzante e di biocontrollo indiretto dei patogeni, e potrà contribuire alla selezione di isolati e formulazioni adatti per ciascun sistema colturale.

1.2.3. Geni inducibili di difesa

Negli ultimi anni sono stati identificati e caratterizzati numerosi geni coinvolti nelle risposte di difesa delle piante a stress biotici. In risposta a un patogeno, la cellula vegetale attiva una panoplia di geni, codificanti per proteine o enzimi con importanti ruoli di protezione, che partecipano all'attivazione concertata delle risposte di difesa seguendo due principali *pathway* di segnalazione (Fiocchetti *et al.*, 2006): (1) geni codificanti per proteine PR, principalmente nella via di segnalazione SA-mediata; (2) geni codificanti per enzimi del metabolismo lipidico (ad es. lipossigenasi) e per inibitori di proteinasi, nella via di segnalazione JA/Et-mediata. Queste conoscenze rappresentano un importante punto di partenza per il miglioramento della produttività di piante d'interesse agrario mediante il potenziamento delle loro risposte di difesa, che potrebbe essere conseguito attraverso il miglioramento genetico. L'attuale disponibilità delle sequenze di alcuni di questi geni anche per la specie modello pomodoro ha consentito di programmare gli studi di analisi d'espressione genica della presente attività di ricerca relativi all'attivazione delle risposte di difesa in seguito all'interazione con *Trichoderma*.

1.2.4. Proteine PR

Le proteine PR sono codificate da geni della pianta ospite (geni *PR*) e sintetizzate *de novo* in seguito all'induzione da parte di vari tipi di patogeni o in situazioni correlate. Queste proteine agiscono collettivamente per inibire la crescita, la moltiplicazione e la diffusione del patogeno. Le proteine PR sono state isolate per la prima volta in tabacco infettato con TMV (Van Loon e van Kammen, 1970). Studi successivi hanno consentito di

identificarne numerose altre, che sono state raggruppate in 17 famiglie principali, in base a similarità strutturali e/o funzionali (**Tab. 1**) (Van Loon *et al.*, 2006). Nell'ambito di ciascuna famiglia di proteine PR esistono, inoltre, isoforme acide, secrete nell'apoplasto, e basiche, con localizzazione vacuolare. I meccanismi molecolari che conferiscono attività antimicrobica a molte delle proteine PR rimangono ancora poco conosciuti e in molti casi sono attribuiti per omologia strutturale a proteine con funzione nota. L'esistenza di proteine simili negli animali potrebbe aiutare a chiarirne le funzioni ed è indicativo, inoltre, che l'immunità innata delle piante ha molto in comune con quella degli animali.

Tabella 1. Famiglie di proteine PR e loro proprietà.

Famiglia	Membro tipo	Proprietà
PR-1	Tabacco PR-1a	Sconosciuta
PR-2	Tabacco PR-2	β -1,3-glucanasi
PR-3	Tabacco P, Q	Chitinasi tipo I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tabacco 'R'	Chitinasi tipo I, II
PR-5	Tabacco S	Taumatina-simile
PR-6	Pomodoro Inibitore I	Inibitore di proteinasi
PR-7	Pomodoro P ₆₉	Endoproteinasi
PR-8	Cetriolo chitinasi	Chitinasi tipo III
PR-9	Tabacco "lignin-forming peroxidase"	Perossidasi
PR-10	Prezzemolo "PR1"	Ribonucleasi-simile
PR-11	Tabacco chitinasi "classe V"	Chitinasi tipo I
PR-12	Rafano Rs-AFP3	Defensina
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Tionina
PR-14	Orzo LTP4	Proteina trasf. lipidi
PR-15	Orzo OxOa (germina)	Ossalato ossidasi
PR-16	Orzo OxOLP	Ossalato ossidasi-simile
PR-17	Tabacco PRp27	Sconosciuta

Fonte: Van Loon *et al.* (2006).

Di seguito si descrivono in dettaglio le caratteristiche di alcune tra le più rappresentative classi di proteine PR di interesse per il presente studio come marcatori dell'attivazione della via di segnalazione mediata da SA. In particolare, le proteine della famiglia PR1 sono sintetizzate abbondantemente in seguito ad un'infezione e si accumulano raggiungendo anche il 2% delle proteine totali delle foglie. Per tale ragione, i geni *PR1* sono frequentemente utilizzati come marcatori della presenza della SAR. Tuttavia, il meccanismo alla base della loro attività antifungina, sebbene esse siano state ben caratterizzate, è ancora sconosciuto. Una potente azione antifungina è presente anche per le proteine della classe I appartenenti alla famiglia PR4, che possiedono un dominio N-terminale ricco di cisteina, legante la chitina fungina, simile alla piccola proteina antifungina eveina presente nel lattice dell'albero della gomma, *Hevea brasiliensis* (Linthorst *et al.*, 1991; Bertini *et al.*, 2003). Il legame della proteina PR4 con la chitina della parete fungina potrebbe bloccare la biosintesi e la conseguente crescita delle ife, benché la proteina stessa non abbia attività chitinolitica (Li *et al.*, 2010). Studi recenti hanno dimostrato la presenza di attività ribonucleasica in una proteina PR4 di frumento (Caporale *et al.*, 2004). Le proteine della famiglia PR5, come l'osmotina di tabacco, sono strutturalmente simili alla taumatina, una proteina dolce estratta dall'arbusto tropicale *Taumatococcus danielli* (Fiocchetti *et al.*, 2006). Si ritiene che la loro attività antifungina sia dovuta all'inserimento nelle membrane cellulari dei patogeni e alla successiva permeabilizzazione mediante la creazione di pori transmembrana, che determinano la lisi cellulare attraverso la perdita di acqua ed elettroliti (Kononowicz *et al.*, 1992).

1.2.5. Lipossigenasi (LOX) e inibitori di proteinasi (PIN)

Le altre due classi di geni oggetto del presente studio codificano per lipossigenasi (LOX) e per inibitori di proteinasi (PIN), sono attivati nella risposta di difesa mediata da JA/Et e implicati nella protezione della pianta da alcuni stress biotici (patogeni necrotrofi, insetti erbivori) e abiotici (ferita, UV). In particolare, la biosintesi di JA segue la via metabolica degli octadecanoidi a partire da acido α -linolenico (18:3) costituente le biomembrane (Feussner e Wasternack, 2002; Wasternack *et al.*, 2006). L'acido α -linolenico è il substrato degli enzimi 13-LOX, che nel cloroplasto catalizzano l'aggiunta di ossigeno molecolare con la conseguente produzione del derivato 13-idroperossido (Porta e Rocha-Sosa, 2002). Questo composto è ulteriormente trasformato da un'allene ossido sintasi (AOS) per poi essere ciclizzato e condurre alla sintesi di JA nei perossisomi, dopo una complessa serie di reazioni enzimatiche di riduzione e β -ossidazione (Wasternack *et al.*, 2006). Tutti i geni codificanti per gli enzimi necessari alla biosintesi di JA sono anche inducibili dallo stesso fitormone mediante un *feedback* positivo (Wasternack *et al.*, 2006; Wasternack, 2007). La via di segnalazione di difesa mediata da JA porta anche all'attivazione dell'espressione di geni codificanti proteine PIN. Esse sono normalmente presenti in organi di riserva, come semi e tuberi, ma possono accumularsi in altri tessuti della pianta in seguito ad una varietà di stimoli differenti (Hermosa *et al.*, 2006). La loro induzione avviene a livello sia locale sia sistemico ed è mediata da un putativo segnale denominato "fattore che induce inibitori di proteinasi". In conseguenza di ciò, la pianta attiva una resistenza sistemica che la prepara ad affrontare una successiva situazione di stress. Infatti, le proteine PIN hanno mostrato effetti negativi sull'attività proteolitica in animali e patogeni (Graham *et al.*, 1985a, 1985b). Recenti studi hanno dimostrato che in questo tipo di risposta sistemica è indispensabile la percezione di JA, ma non necessariamente la sua biosintesi (Wasternack, 2007). Ciò può indicare che l'espressione

dei geni *Lox* per la biosintesi di JA può non essere un marcatore specifico dell'attivazione della risposta mediata da JA a livello sistemico. A questo proposito, i geni *PIN* possono risultare marcatori più indicativi dell'attivazione sistemica della via di segnalazione di difesa mediata da JA (Wasternack *et al.*, 2006).

1.3. Obiettivi

Il presente lavoro di Tesi è stato condotto presso l'Istituto di Genetica Vegetale (IGV) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Portici (NA) e il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali (DiSSPAPA) della Facoltà di Agraria di Portici dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, nell'ambito degli studi rivolti a identificare in pianta le basi genetico-molecolari della risposta indotta da organismi benefici della rizosfera in termini di promozione della crescita e di attivazione delle difese naturali nei confronti di stress biotici.

Utilizzando la specie modello pomodoro come sistema sperimentale, l'attività di ricerca è stata indirizzata ad approfondire le conoscenze sui meccanismi attivati nella pianta in risposta all'interazione con i funghi simbiotici facoltativi del genere *Trichoderma*, al fine di ottimizzare l'uso di tali microrganismi benefici per il biocontrollo delle fitopatie e la biofertilizzazione delle colture agrarie, riducendo nel contempo gli *input* in agricoltura a tutela dell'ambiente e della salute umana. A tale scopo, sono state utilizzate quattro linee di pomodoro coltivato e due accessioni di pomodoro selvatico, in seguito a trattamento dei semi con due specie di *Trichoderma* e inoculazione delle piante ottenute con il patogeno *B. cinerea*. L'effetto di promozione della crescita sulle colture e l'induzione della resistenza sistemica nei confronti del patogeno sono stati valutati per ciascun genotipo di pomodoro utilizzato.

In particolare, lo studio ha perseguito i seguenti obiettivi principali:

- (I) rilevare l'eventuale presenza di variabilità genetica in pomodoro per la capacità di interagire con due specie di funghi benefici del genere *Trichoderma*, in termini di promozione della crescita e di induzione di resistenza sistemica (ISR) nei confronti del patogeno, per valutare la possibilità di ricorrere al miglioramento genetico per l'ottenimento di nuovi genotipi con ottimizzate capacità di beneficiare dell'interazione;

- (II) accrescere le conoscenze sui meccanismi genetico-molecolari dell'ISR attraverso l'identificazione di geni di pomodoro, marcatori delle principali vie metaboliche di segnalazione di difesa, potenzialmente coinvolti nell'ISR e la caratterizzazione della loro attività trascrizionale durante le interazioni complesse *Trichoderma*-pianta e *Trichoderma*-pianta-patogeno;
- (III) identificare specifici genotipi di pomodoro con caratteristiche migliorate in termini di promozione della crescita e di ISR, da utilizzare per potenziare ulteriormente l'interazione benefica.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1. Materiale vegetale e condizioni di crescita

La presente attività di ricerca ha avuto come oggetto di studio le quattro linee Corbarino, M82, SM36 e TA209 della specie coltivata di pomodoro *Solanum lycopersicum* e le due accessioni di pomodoro selvatico *S. pennellii* LA0716 e *S. habrochaites* LA1777 (**Tab. 2**). I semi della cultivar campana Corbarino sono stati forniti da “La Semiorto Sementi”. I semi delle due accessioni selvatiche (LA0716 e LA1777) e delle due linee M82 e TA209 sono stati forniti dal “C. M. Rick Tomato Genetics Resource Center” (TGRC), Università della California, Davis, USA (<http://tgrc.ucdavis.edu>). I semi della linea SM36 sono stati gentilmente forniti dal Prof. Luigi Frusciante, DiSSPAPA, Facoltà di Agraria di Portici dell’Università degli Studi di Napoli Federico II.

Tabella 2. Specie e linee di pomodoro (*Solanum* spp.) in studio nella presente attività di ricerca.

N.	Linea	Specie	Bacca	Resistenza	Crescita	Fornitore
1	Corbarino	<i>S. lycopersicum</i>	rossa	siccità	indeterminata	La Semiorto
2	LA0716	<i>S. pennellii</i>	verde	insetti, siccità	indeterminata	TGRC
3	LA1777	<i>S. habrochaites</i>	verde	freddo, insetti	indeterminata	TGRC
4	M82	<i>S. lycopersicum</i>	rossa	<i>I, Ve</i>	determinata	TGRC
5	SM36	<i>S. lycopersicum</i>	rossa	<i>I, Ve</i>	semi-determinata	Prof. Frusciante
6	TA209	<i>S. lycopersicum</i>	rossa	<i>I, Ve</i>	determinata	TGRC

2.1.1. Coltura in terreno

Per la valutazione degli effetti del fungo benefico *Trichoderma* spp. in terreno, i semi di pomodoro delle linee in studio sono stati sterilizzati in superficie tramite immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio (NaClO) al 2% di cloro attivo in agitazione per 20 minuti, con l'obiettivo di migliorarne allo stesso tempo l'uniformità e il tasso di germinazione, in particolar modo per le specie selvatiche. In seguito sono stati sciacquati in acqua Milli-Q (Millipore) sterile e, prima di disseccarsi nuovamente, sono stati direttamente trattati mediante deposizione delle spore di *Trichoderma* spp. (P1 o T22) sui semi (*seed coating*), usando acqua Milli-Q sterile per i campioni non trattati con *Trichoderma* (controllo). I semi trattati e controllo sono stati asciugati all'aria per 24 ore e poi seminati in terriccio universale (Floragard Vertriebs) sterilizzato in autoclave (121°C per 20 minuti) all'interno di contenitori di polistirene con 40 alveoli. La germinazione e lo sviluppo delle piantine di *S. lycopersicum* trattate con *Trichoderma* spp. (P1 o T22) e non trattate, come controllo, (Sez. 2.2.) sono avvenuti in condizioni controllate in camera di crescita a 25°C per 16 ore di luce, 20°C per 8 ore di buio, con l'80% di umidità relativa. La germinazione dei semi di pomodoro selvatico LA0716 e LA1777 trattati con *Trichoderma* spp. (P1 o T22) e non trattati come controllo è avvenuta al buio, nelle stesse condizioni controllate, all'interno di capsule Petri su carta bibula imbibita di acqua distillata sterile. Dopo circa 3 giorni dalla semina, al momento della comparsa della radichetta, i semi germinati sono stati trasferiti in contenitori alveolari con terriccio universale sterilizzato in autoclave e tenuti nelle stesse condizioni di crescita. Dopo 3 settimane dalla semina, le piantine di pomodoro coltivato e selvatico sono state trasferite in vasi di plastica di 14 cm di diametro con terriccio universale sterilizzato in autoclave e cresciute per ulteriori 5 settimane nelle stesse condizioni ambientali controllate, senza apportare alcun tipo di concimazione o trattamento chimico ed effettuando un'irrigazione manuale a giorni alterni.

Le piante di pomodoro sono state cresciute in terreno nelle camere di crescita dell'Istituto per la Protezione delle Piante (IPP) del CNR di Portici. Il disegno sperimentale ha previsto la coltura di una popolazione di 9 piante per ciascuna linea in studio, suddivise in trattate con *Trichoderma* spp. (P1 o T22) e non trattate come controllo (3 piante/trattamento). Tutte le piante sono state inoculate dopo 60 gg. dalla semina con il patogeno *B. cinerea*, ripetendo l'esperimento complessivamente tre volte durante gli anni 2008, 2009 e 2010.

2.1.2. Coltura idroponica

Sulle stesse linee di pomodoro è stata valutata l'azione biofertilizzante di *Trichoderma* spp. anche in coltura idroponica. I semi di pomodoro in esame sterilizzati in superficie sono stati direttamente seminati all'interno di capsule Petri su carta bibula sterilizzata in autoclave imbibita di acqua distillata sterile e mantenuti al buio nelle condizioni controllate già riportate. A circa 3 giorni dalla semina, in occasione della comparsa della radichetta, i semi germinati sono stati alloggiati per la crescita in idroponica all'interno di supporti di polistirene costruiti *ad hoc* con 24 alveoli, galleggianti su 3 L di soluzione idroponica in una vaschetta da 5 L (18 x 30 x 10 cm). I semi germinati sono stati trattati mediante inoculazione della soluzione di idroponica con spore germinate di *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22 (Sez. 2.2.) e sono stati tenuti in camera di crescita a 25°C per 16 ore di luce, a 20°C per 8 ore di buio con umidità relativa all'80%. Lo sviluppo delle piantine è proseguito in idroponica per quattro settimane dalla semina, senza effettuare alcun trattamento chimico antiparassitario o altro tipo di fertilizzazione ed effettuando un rabbocco manuale della soluzione nutritiva con frequenza settimanale. I pomodori sono stati cresciuti in idroponica nelle camere di crescita del CNR-IGV di Portici, utilizzando in totale 12 piante per linea, suddivise nei trattamenti con *Trichoderma* spp. (P1 o T22) e non

trattate come controllo (4 piante/trattamento), ripetendo l'esperimento quattro volte durante gli anni 2010 e 2011.

Il mezzo di crescita utilizzato per la coltura di pomodoro in idroponica è costituito come riportato in **Tab. 3**. Il pH della soluzione è stato portato a 6,30 mediante l'aggiunta della quantità opportuna di una soluzione di KOH 1M. Il fertilizzante Hidromix S (Valagro Spa, Atessa, CH) è stato utilizzato quale miscela di oligoelementi in forma chelata con etilendiammino-tetracetato (EDTA) e etilendiammino-N,N'-bis(2-idrossifenil)acetato (EDDHA), espressamente studiata per l'impiego in idroponica e formulata in granuli solubili. Gli oligoelementi sono contenuti secondo specifici rapporti che tengono conto dei consumi delle principali colture orticole e floricole, secondo la seguente composizione: boro (B) solubile in acqua: 0,65%; rame (Cu) solubile in acqua: 0,27% (EDTA-Cu); ferro (Fe) solubile in acqua: 7,0% (EDDHA-Fe: 0,7%; EDTA-Fe: 6,3%); manganese (Mn) solubile in acqua: 3,3% (EDTA-Mn); molibdeno (Mo) solubile in acqua: 0,2%; zinco (Zn) solubile in acqua: 0,6% (EDTA-Zn).

Tabella 3. Composizione della soluzione nutritiva per coltura idroponica di pomodoro.

Componente	Quantità per 10 L	Concentrazione finale
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	8,13 g	812,9 mg/L
KH ₂ PO ₄	2,05 g	204,8 mg/L
KNO ₃	1,01 g	101,5 mg/L
K ₂ SO ₄	3,19 g	319,3 mg/L
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	3,84 g	384 mg/L
Hidromix S	0,14 g	14 mg/L

2.2. Condizioni di crescita degli antagonisti e trattamento delle piante

I microrganismi antagonisti del genere *Trichoderma* appartenenti alla micoteca del Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale (ArBoPaVe), Facoltà di Agraria di Portici, Università degli Studi di Napoli Federico II sono stati gentilmente forniti dalla Dott.ssa Michelina Ruocco (CNR-IPP di Portici). Nella presente ricerca sono state utilizzate le specie fungine *T. atroviride* P1 e *T. harzianum* T22. In dettaglio, *T. atroviride* P1 (*American Type Culture Collection*, ATCC 74058) è derivato dal ceppo 107 di *T. atroviride* per selezione con 500 ppm del fungicida iprodione. Il ceppo 107 è stato inizialmente isolato da legno dal Dr. C. Dennis a Norfolk (UK) e selezionato a bassa temperatura come agente di biocontrollo per i climi freddi (Tronsmo, 1991). *T. atroviride* P1 è noto per la sua capacità diretta di biocontrollo nei confronti dei funghi fitopatogeni *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp. e *B. cinerea* (Tronsmo, 1991). *T. harzianum* T22 (ATCC 20847) è stato selezionato come l'isolato più efficiente e competitivo ottenuto dalla fusione di protoplasti di altri due ceppi: *T. harzianum* T95, isolato in Colombia da un terreno soppressivo per *Rhizoctonia*, e *T. harzianum* T12, competitivo in condizioni di ferro limitante (Stasz *et al.*, 1988).

I funghi erano conservati a -80°C come sospensioni di $\approx 10^8$ spore/mL in glicerolo al 20%. Per la propagazione sono stati inoculati 20 μ L della sospensione, corrispondenti a $\approx 2 \times 10^6$ spore, in capsule Petri di 10 cm di diametro al centro del substrato di crescita PDA (*Potato Dextrose Agar*, AppliChem, Norfolk, UK) e spatolati in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare verticale (Bio48, Faster, Cornaredo, MI). La preparazione del substrato di crescita sintetico solido PDA pH 5,6 è stata effettuata come di seguito riportato: 19,5 g di polvere PDA sono stati versati in 500 mL di H₂O Milli-Q all'interno di una beuta da 1 L, la sospensione è stata autoclavata a 121°C per 15 minuti e, dopo raffreddamento a 50°C, in condizioni sterili, ne sono stati versati ca. 15 mL in capsule Petri

di 10 cm di diametro e lasciati solidificare. Le casule Petri con l'inoculo fungino sono state sigillate con parafilm e poste in incubazione in un termostato a 25°C al buio per circa una settimana sino a sporulazione. Alla comparsa della caratteristica colorazione verdastra, indicativa della presenza di spore mature sul micelio bianco, queste sono state raccolte in condizioni di sterilità dalla superficie del mezzo di crescita con 10 mL di acqua Milli-Q. La concentrazione delle spore nella sospensione così ottenuta è stata determinata mediante conta al microscopio ottico composto (Axioskop, Carl Zeiss, Göttingen, Germania) usando una camera di conteggio di Burkner (emocitometro). In particolare, 10 µL della sospensione a titolo incognito sono stati caricati su ciascuno dei due campi dell'emocitometro e le spore sono state contate in ciascun riquadro al microscopio. Per la determinazione del titolo della sospensione, la media delle spore per riquadro è stata divisa per il volume del riquadro considerato di $1/(2,5 \times 10^5)$ mL, tenuto conto della diluizione adoperata. Dalla sospensione a titolo noto ne è stata preparata una alla concentrazione di 10^6 spore/mL per essere usata nel trattamento successivo delle linee di pomodoro e conservata temporaneamente a 4°C al buio.

Per la coltura in terreno, l'interazione tra piante di pomodoro e l'antagonista *Trichoderma* spp. (P1 o T22) è avvenuta *in vivo*, prima della semina, mediante *seed coating* delle linee di pomodoro in studio con di 500 µL di una sospensione di 10^6 spore/mL di *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22, usando acqua Milli-Q sterile per i campioni non trattati con *Trichoderma* (controllo). I semi trattati e controllo sono stati asciugati all'aria per 24 ore, in seguito le linee coltivate sono state seminate direttamente in terriccio, mentre le accessioni selvatiche sono state fatte germinare in capsule Petri e trasferite in terreno dopo circa 3 giorni (Sez. 2.1.1.).

In coltura idroponica, le linee di pomodoro in esame sono state trattate con le spore germinate dei funghi *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22 attraverso introduzione diretta

nella soluzione di idroponica. Nello specifico, per la germinazione delle spore di *Trichoderma* spp., un'aliquota di 150 μL (3×10^8 spore) da uno stock di 2×10^9 spore/mL è stata posta in 100 mL di mezzo liquido 0,1X PDB (*Potato Dextrose Broth*, HiMedia Lab., Mumbai, India), tenuto in agitazione a 150 rpm a 28°C per 24 h. La preparazione del substrato di crescita liquido 0,1X PDB pH 5,1 è stata effettuata come di seguito riportato: 2,4 g di polvere PDB sono stati versati in 1 L di H₂O Milli-Q all'interno di una beuta da 2 L, la sospensione è stata sterilizzata mediante autoclave a 121°C per 15 minuti. Al termine dell'incubazione, il pellet raccolto per centrifugazione a 9.000 rpm per 10 minuti a 4°C è stato sospeso in 100 mL di soluzione idroponica (Sez. 2.1.2.). Tale sospensione è stata aggiunta a 2,9 L di soluzione idroponica per un volume finale di 3 L, in una vaschetta da 5 L in cui sono stati alloggiati i supporti alveolari con i semi germinati, per una sospensione finale di *Trichoderma* spp (P1 o T22) pari a 10^5 spore germinate/mL.

2.3. Condizioni di crescita del fitopatogeno e inoculazione delle piante

Il patogeno *Botrytis cinerea* 309, isolato da tabacco, appartenente alla micoteca del Dipartimento ArBoPaVe, è stato gentilmente fornito dalla Dott.ssa Michelina Ruocco. Il fungo è stato cresciuto in capsule Petri di 10 cm di diametro su mezzo di crescita PDA, mediante incubazione a 25°C al buio per almeno 7 giorni sino a sporulazione. Le spore sono state raccolte dalla superficie del mezzo di crescita tramite un'ansa sterile in 10 mL di acqua Milli-Q sterile. Il titolo della sospensione è stato determinato mediante conta al microscopio in una camera di Burker (Sez. 2.2.). La sospensione a titolo noto è stata portata ad una concentrazione di 10^6 spore/mL, per essere usata nell'inoculo successivo e conservata a 4°C per tempi brevi.

Piante di pomodoro di 60 gg. coltivate in terreno, trattate con *Trichoderma* (P1 o T22) e non trattate (controllo), sono state inoculate sulla terza foglia vera con 10 μL di una

sospensione di 10^6 spore/mL del patogeno *B. cinerea* 309, in corrispondenza del centro di ciascuna delle tre foglioline terminali della foglia composta. Per l'inoculazione sono state usate tre piante in replicato per ciascuno dei tre trattamenti, per un totale di 9 piante. La quarta foglia vera delle piante trattate con *Trichoderma* (P1 o T22) e non trattate (controllo) di ciascun replicato veniva raccolta come controllo non infettato immediatamente prima dell'inoculazione, subito immersa in azoto liquido (-196°C) e conservata a -80°C fino all'uso successivo nelle analisi molecolari (campione a 0 *hours post inoculation*, hpi). Le stesse piante, una volta asciugate all'aria le gocce di inoculo, sono state chiuse in buste di plastica trasparente col fine di ottenere le condizioni ottimali per la germinazione e la crescita di *B. cinerea*, rappresentate da elevati livelli di umidità relativa ($> 90\%$). Si è provveduto a portare la temperatura della camera di crescita a 18°C , una settimana prima dell'inoculo, e a mantenere una condizione di elevata umidità all'interno delle buste, soprattutto per la parte aerea delle piante, attraverso irrigazione e nebulizzazione con acqua di fonte a 24 e 48 hpi, in modo da favorire l'evolversi dell'infezione. A 24 ore dall'inoculazione è stato effettuato un primo rilievo visivo per accertare che l'inoculo avesse prodotto infezione. In conseguenza di ciò, la quinta (a 24 hpi) e la sesta (a 48 hpi) foglia vera sono state raccolte da ciascuna pianta replicato, subito immerse in azoto liquido (-196°C) e conservate a -80°C fino all'uso nelle analisi molecolari (campioni a 24 e 48 hpi). Col fine di valutare l'azione di biocontrollo esercitata dall'antagonista attraverso l'ISR, è stata misurata l'area delle lesioni necrotiche prodotte dal patogeno a diversi tempi dall'inoculazione (48, 72 e 96 hpi) (Sez. 2.4.). Gli esperimenti di inoculazione sono stati ripetuti tre volte (Sez. 2.1.1.).

2.4. Rilievi biometrici sulle piante di pomodoro

Sono stati effettuati rilievi biometrici sulle linee di pomodoro coltivate in terreno, trattate con *Trichoderma* (P1 o T22) e non trattate (controllo), per misurare l'altezza a due mesi dalla semina. Inoltre, le piante sono state fotografate per una valutazione visiva dell'habitus e del vigore. Alla fine di ciascun esperimento di inoculazione col patogeno è stata misurata la stimolazione della crescita (effetto biofertilizzante) delle piante di pomodoro, trattate e controllo, in termini di peso fresco e peso secco delle radici. Queste sono state tagliate a livello del suolo e, dopo un'accurata rimozione del terreno, sono state immediatamente pesate per determinarne il peso fresco, poi sono state fotografate per una valutazione visiva dell'architettura radicale. Infine, il peso secco delle radici è stato registrato in seguito ad essiccazione delle radici in stufa a 60°C fino a peso costante. Poiché l'inoculazione con *B. cinerea* distrugge l'apparato fogliare, la determinazione del peso fresco e secco della parte aerea è stata effettuata, in modo analogo a quello dell'apparato radicale, su di un diverso set di piante coltivate in contemporanea nelle stesse condizioni e non destinate a essere inoculate con il patogeno.

Lo sviluppo del processo infettivo è stato seguito mediante il calcolo dell'area (A) delle lesioni necrotiche a 48, 72 e 96 hpi. L'area è stata approssimata a un'ellisse applicando la formula: $A = D d \pi/4$, dove "D" e "d" sono rispettivamente il diametro maggiore e quello minore della lesione misurati con un calibro elettronico. Il grado di severità della malattia per i differenti trattamenti (controllo, *T. atroviride* P1 e *T. harzianum* T22) è stato espresso in termini di area media delle lesioni necrotiche.

I dati sulla dimensione delle lesioni procurate da *B. cinerea* e sulla crescita della pianta sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) in un disegno *split-plot* con 3 repliche, usando il genotipo della pianta e il trattamento con *Trichoderma* come fattori sperimentali. I valori medi sono stati suddivisi in base al test di Duncan.

Dopo quattro settimane dal trattamento con *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22 delle linee di pomodoro in idroponica, sono stati effettuati rilievi biometrici per determinare la stimolazione della crescita (effetto biofertilizzante) in termini di altezza delle piante, lunghezza della radice, peso fresco e peso secco del fusto e della radice. Inoltre le piante sono state fotografate *in toto* per una valutazione visiva dell'habitus e del vigore.

2.5. Determinazione dell'attività auxino-simile di *Trichoderma*

È stata valutata l'eventuale presenza di attività auxino-simile dovuta a metaboliti secondari prodotti dai funghi benefici del genere *Trichoderma*. L'attività auxino-simile presente nei filtrati dei mezzi di coltura di *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22, dopo 6 giorni di crescita in mezzo liquido PDB in agitazione a 150 rpm a 28°C, è stata valutata mediante il test dei fusticini di pisello, in termini di allontanamento reciproco delle estremità dei fusticini sezionati longitudinalmente e immersi in una diluizione (1:10) del filtrato colturale. L'effetto auxino-simile del filtrato colturale sui fusticini di pisello è stato determinato dopo 48 e 120 ore.

2.6. Analisi molecolari di espressione genica relativa

2.6.1. Estrazione e purificazione di RNA da foglia

Lo studio molecolare è iniziato con l'isolamento dell'acido ribonucleico (RNA) totale da tessuto fogliare non infettato di piante di pomodoro inoculate con *B. cinerea* in corrispondenza della 3° foglia vera, trattate precedentemente (60 gg.) con *Trichoderma* (P1 o T22) e non trattate (controllo). In particolare, la 4°, 5° e 6° foglia vera sono state prelevate dalle linee di pomodoro in esame rispettivamente a 0, 24 e 48 ore dall'infezione con *B. cinerea* (campioni a 0, 24, 48 hpi), subito immerse in azoto liquido (-196°C) e conservate a -80°C. In corrispondenza di ciascun tempo e per ciascuna linea di pomodoro è

stata raccolta una foglia per pianta, per un totale di tre campioni di foglia per il controllo e per ciascun trattamento con *Trichoderma*. L'RNA totale di pomodoro è stato estratto e purificato dalle foglie, raccolte e conservate come sopra riportato, utilizzando il kit commerciale dedicato PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Il metodo per l'estrazione dell'RNA totale è basato sull'uso di una soluzione contenente β -mercaptoetanololo e guanidina isotiocianato, come agente caotropico, la successiva purificazione è effettuata mediante adsorbimento selettivo e reversibile dell'RNA su membrane a base di silice. In dettaglio, il tessuto fogliare da processare è stato polverizzato con un pestello in un mortaio di porcellana in presenza di azoto liquido. Subito dopo, su di una bilancia analitica sono stati pesati 100-200 mg del tessuto fogliare ridotto in polvere in provette Eppendorf da 2 mL prive di ribonucleasi (RNasi-free), agendo velocemente per impedire lo scongelamento. Al campione in polvere così ottenuto è stato aggiunto il tampone di lisi nella misura di 1 mL per 100-200 mg di tessuto, che è stato quindi processato seguendo le istruzioni del kit (pag. 17, sez. 3.7, manuale Ver. C 13/10/2005). Infine, l'RNA totale è stato eluito mediante centrifugazione dalla membrana di silice delle colonnine per due volte consecutive con 30 μ L di acqua RNasi-free fornita nel kit. L'RNA ottenuto è risultato in un volume finale di 60 μ L ed è stato conservato a -80°C a lungo termine. Per inattivare le RNasi e impedire la digestione enzimatica dell'RNA, in tutte le operazioni si sono usate soluzioni preparate con H₂O Milli-Q trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) allo 0,1% e autoclavate per 30 min a 121°C .

La concentrazione dell'RNA è stata determinata mediante lettura dell'assorbanza a 260 nm (A_{260}) con uno spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA) di un'aliquota di 2 μ L della soluzione madre. Per il calcolo della quantità di RNA si considera che, se si utilizza per la misura un cammino ottico di 1 cm,

una soluzione acquosa di RNA a pH 7,0-7,5 a una concentrazione di 40 ng/μL ha $A_{260} = 1$ OD. La purezza dell'RNA è stata stimata attraverso il rapporto delle assorbanze A_{260}/A_{280} per valutare l'eventuale presenza di clorofilla e contaminanti di natura proteica, e A_{260}/A_{230} per sali e polifenoli, tutti composti che possono interferire con le reazioni successive oltre che pregiudicare la conservazione dell'RNA. I rapporti di A sopracitati sono risultati essere prossimi al valore ideale di 2,0. L'integrità dell'RNA è stata valutata attraverso visualizzazione UV, in presenza di bromuro d'etidio, di 1 μg di RNA totale dopo separazione elettroforetica in condizioni denaturanti su gel d'agarosio (1,25%) in tampone MOPS 1X (20 mM MOPS pH 7, 5 mM NaAcetato, 1 mM EDTA) (ved. Appendice Cap. 2). L'RNA totale eucariotico è considerato integro, e quindi utile per essere sottoposto ad analisi, se sono presenti due bande discrete di rRNA 28S e 18S in un rapporto d'intensità $28S:18S > 1,5$ e sono assenti tracce diffuse di degradazione (*smear*). La contaminazione da DNA è visibile nella regione a più alto peso molecolare di quella del rRNA 28S. Tuttavia nel tessuto fogliare l'abbondanza di rRNA dei cloroplasti produce un profilo elettroforetico più complesso, costituito anche dalle bande corrispondenti agli rRNA 23S e 16S plastidiali. La determinazione della concentrazione dell'RNA, dell'integrità e delle dimensioni degli rRNA sono state ulteriormente verificate a campione, analizzandone circa 50-100 ng (1 μL) con l'RNA Nano Chip dell'RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies Italia, Milano) utilizzando lo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Italia) seguendo le istruzioni del produttore. Il chip utilizzato ha un intervallo di misura quantitativa per l'RNA totale nell'intervallo compreso tra 25-500 ng/μL e consente la determinazione delle dimensioni degli rRNA nell'intervallo 25-4000 nt.

Il DNA genomico (gDNA) eventualmente co-estratto con l'RNA può fungere da stampo nella PCR ed essere amplificato assieme al DNA complementare (cDNA), portando a una sovrastima della reale abbondanza dell'mRNA in studio. A tal proposito, le tracce di

gDNA eventualmente residue sono state eliminate attraverso una digestione con desossiribonucleasi I (DNasi I) RNasi-free Amplification Grade purificata da pancreas bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). In breve, la reazione è stata assemblata in ghiaccio e i campioni, preparati in doppio insieme a un controllo negativo da usare per la retrotrascrizione, sono stati incubati a temperatura ambiente per esattamente 15 minuti in un volume finale di 10 μ L contenente: 1 μ L di 10X DNase I Reaction Buffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 20 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl), 0,2 μ L di DNasi I (1 U/ μ L) corrispondenti a 0,2 Unità in Storage Buffer (20 mM NaAcetato pH 6,5, 5 mM $CaCl_2$, 0,1 mM PMSF e 50% glicerolo), il volume corrispondente a 1 μ g di RNA totale, q.b. per 10 μ L di H_2O Milli-Q sterile trattata con DEPC allo 0,1%. Alla fine della digestione, la DNasi I è stata inattivata termicamente mediante incubazione dei campioni a 65°C per 10 minuti, dopo l'aggiunta di 1,2 μ L di EDTA 25 mM (pH 8,0). L'aliquota di RNA totale (1 μ g) è risultata purificata dal gDNA in un volume di soluzione corrispondente a 11,2 μ L, pronta per l'uso nelle reazioni successive.

2.6.2. Retrotrascrizione per la sintesi di cDNA

L'RNA è stato sottoposto alla reazione di retrotrascrizione (RT) per la sintesi del cDNA, col fine di valutare i livelli di espressione dei geni in studio mediante analisi in RT-PCR convenzionale e in RT-PCR quantitativa in tempo reale (Real Time qRT-PCR). Un'aliquota corrispondente a 1 μ g di RNA totale, trattato precedentemente con DNasi I, è stata combinata con 500 ng di primer oligo-(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) e le molecole sono state denaturate mediante incubazione a 70°C per 10 minuti (**Tab. 4**). In seguito a 5 min d'incubazione in ghiaccio, sullo stesso campione è stata effettuata la reazione di RT per la sintesi del primo filamento di cDNA a 42°C per 60 minuti in un volume finale di 20 μ L in presenza di First-Strand Buffer 1X (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$),

500 μM di ciascun dNTP, 10 mM ditioneitolato (DTT) e 160 Unità di Trascrittasi Inversa SuperScript™ II (Invitrogen) in Storage Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,01% NP40 e 50% glicerolo). Infine, la reazione di RT è stata bloccata mediante incubazione a 70°C per 10 minuti. In conclusione, è stato sintetizzato il primo filamento di cDNA da utilizzare come stampo nell'amplificazione PCR convenzionale e Real Time qPCR. Per ciascun campione di RNA è stata allestita una reazione di controllo negativo, assemblata senza Trascrittasi Inversa per verificare la presenza di contaminazione di gDNA attraverso PCR.

Tabella 4. Composizione della reazione di RT per la sintesi di cDNA.

Componente	Aliquota	Incubazione
RNA totale	11,2 μL (1 μg)	} denaturazione (70°C / 10 min)
Primer oligo-(dT) ₁₂₋₁₈ (500 ng/ μL)	1 μL (500 ng)	
5X First-Strand Buffer	4 μL (1X)	} retrotrascrizione (42°C / 60 min)
dNTP (10 mM ciascuno)	1 μL (10 nmoli)	
DTT (100 mM)	2 μL (200 nmoli)	
Trascrittasi Inversa SuperScript™ II (200 U/ μL)	0,8 μL (160 U)	
Volume finale	20 μL	stop (70°C / 10 min)

2.6.3. Sequenze geniche di interesse, disegno dei primer e validazione

I geni *PR1b1*, *PR-P2* e *PR5* (**Tab. 5**), appartenenti alla famiglia delle proteine PR di pomodoro, sono stati sottoposti ad analisi semiquantitativa dell'espressione genica mediante RT-PCR, dopo normalizzazione con la β -actina, usando i primer oligonucleotidici corrispondenti riportati in letteratura da Fiocchetti *et al.* (2006).

L'amplificazione PCR del gene per la β -actina ha consentito di verificare la sintesi del cDNA ed escludere l'eventuale contaminazione di gDNA. In pratica, le sequenze riconosciute dai due primer per la β -actina (**Tab. 5**) sono localizzate in due esoni contigui a un introne di 83 bp, in seguito alla PCR risulterà un amplicone di 748 bp se amplificato a partire da cDNA oppure un prodotto di 831 bp da gDNA.

Tabella 5. Geni bersaglio e primer gene-specifici usati nell'analisi per RT-PCR.

N.	Gene	5'-Forward primer (nt)	5'-Reverse primer (nt)	Amplicone (bp)
1	<i>β-actina</i>	cccaattgaacacggattgt (21)	ggtgatttccttgetcatagc (21)	748
2	<i>PR1b1</i>	gcactaacctaaagaaa (18)	tagttttgtgctcgggatgc (20)	198
3	<i>PR-P2</i>	gctacgaacgtagggcaac (20)	ctcaagcatctaccgcatga (20)	191
4	<i>PR5</i>	ccccacaacactagtgga (20)	accagggaagtaaatgtgc (20)	251

I seguenti sette geni bersaglio codificanti per proteine di difesa in pomodoro sono stati sottoposti ad analisi quantitativa dell'espressione genica mediante Real Time qRT-PCR: Lipossigenasi A, C e D (*LoxA*, *LoxC* e *LoxD*), Inibitore di Proteinasi 1 e 2 (*PIN1* e *PIN2*), *PR1b1* e *PR-P2*. Il gene costitutivo codificante per la β -actina in pomodoro è stato scelto, dopo opportuna validazione, come gene di riferimento per eseguire la normalizzazione dei livelli di espressione dei geni bersaglio. Infatti, il gene della β -actina è risultato mantenere un livello di espressione costante in tutti i campioni in studio, dato che né il trattamento con *Trichoderma*, né quello con il patogeno modificano la sua espressione nell'arco delle 48 h di durata dell'esperimento di inoculo. Le sequenze nucleotidiche di pomodoro dei geni in studio sono state ottenute dalla banca dati di sequenze geniche GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) e usate per progettare coppie di primer gene-specifiche, con Tm di 65°C e lunghezza dell'amplicone di ca. 100 bp, utilizzando il software on-line

Primer3 disponibile al sito <http://primer3.sourceforge.net> (Rozen e Skaletsky, 2000). Col fine di confermare la specificità dei primer di interesse ed escludere possibili amplificazioni incrociate, è stata effettuata una validazione attraverso ricerca di similarità di sequenza in GenBank mediante lo strumento di bioinformatica BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), che per comparazione reperisce le sequenze simili presenti in banca dati. L'eventuale formazione di strutture secondarie dei primer durante la PCR è stata verificata inizialmente *in silico* con il software Primer Express ver. 2.0 (Applied Biosystems), per escludere la presenza di complementarietà e prevenire l'ibridazione intra- o inter-molecolare (dimeri dei primer). Inoltre, il software Amplify ver. 1.2 è stato utilizzato per verificare la produzione dell'amplicone atteso per ciascun gene in studio.

In teoria, la PCR amplifica il DNA in maniera esponenziale, cioè il numero di molecole presenti raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione. Tuttavia, in pratica, l'efficienza della reazione è variabile e bisogna quindi porsi nelle condizioni in cui i valori dei Ct siano confrontabili tra loro. Per garantire la comparabilità tra i campioni per ciascuno degli 8 geni in studio, per prima cosa sono stati determinati i valori di efficienza PCR di ciascun singolo saggio. Le coppie di primer sono state verificate per la specificità e la presenza di artefatti a diverse concentrazioni (50, 100 e 200 nM) nelle reazioni Real Time qRT-PCR con e senza cDNA. A partire da ciascun campione di cDNA tal quale in studio è stata preparata una miscela rappresentativa e da questa quattro diluizioni seriali (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) per determinare l'efficienza di amplificazione PCR di ciascuna coppia di primer selezionata per i geni in studio (validazione). Le curve standard basate sui valori di Ct vs. log [diluizione cDNA] sono state costruite utilizzando tali diluizioni seriali. L'efficienza (E) della Real Time qRT-PCR, espressa in percentuale, è stata calcolata per ciascun gene attraverso la pendenza del modello di regressione lineare ($R^2 > 0,98$) mediante la seguente

formula: $E = (10^{(-1/p)} - 1) \times 100$, dove “p” è il valore di pendenza della curva standard (Livak e Schmittgen, 2001).

Al termine della PCR, la presenza di un unico prodotto di amplificazione della reazione è stata verificata attraverso analisi della cinetica di dissociazione (*melting*), effettuata portando la temperatura dei campioni da 60°C a 95°C a una velocità di transizione ridotta al 2% e con acquisizione continua della fluorescenza nella fase di fusione. La forma omogenea a campana della curva di *melting*, ottenuta riportando per derivazione i valori di fluorescenza vs. la temperatura ($-\Delta F/\Delta T$), e la singola temperatura di fusione (T_m) registrata hanno confermato che il prodotto atteso è stato amplificato specificamente (validazione). La determinazione delle dimensioni degli ampliconi è stata effettuata per confronto con lo standard di pesi molecolari 1 Kb Ladder plus (Invitrogen) dopo separazione elettroforetica su gel d'agarosio (2%) in tampone TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0) a 90 V per 1 h in presenza di bromuro di etidio (0,5 µg/mL), mediante visualizzazione su di un transilluminatore UV Gel Doc 2000 (Bio-Rad Italia, Milano).

I primer e le concentrazioni corrispondenti che sono risultati formare artefatti sono stati esclusi dall'analisi, quelli selezionati hanno avuto lunghezza compresa tra 19 e 25 nt, GC% tra 37,5 e 60%, $T_m = 65^\circ\text{C}$, con una lunghezza degli ampliconi attesi compresa nell'intervallo 100–177 bp (**Tab. 6**).

Tabella 6. Geni bersaglio e primer gene-specifici usati nell'analisi per Real Time qRT-PCR.

N.	Gene	Accessione	5'-Forward primer (nt)	5'-Reverse primer (nt)	Amplicone (bp)
1	<i>β-actina</i>	BT013524	caccactgctgaacgggaa (19)	ggagctgctcctggcagttt (20)	100
2	<i>LoxA</i>	U09026	tgaacatggtgggctgaaa (20)	ctgcccgaattgactgctg (20)	106
3	<i>LoxC</i>	U37839	tccggcaacaccgtttactc (20)	gtcaatggccggaaaatgtg (20)	102
4	<i>LoxD</i>	SLU37840	accctcatctggetggct (20)	atcgacgatgagtggtgtg (20)	100
5	<i>PIN1</i>	K03290	tgaaactctcatggcacgaaaag (23)	ggccacattgttttcctcg (21)	102
6	<i>PIN2</i>	K03291	ggccaaatgcttgaccttt (20)	cgtggtacatccggtgggata (21)	101
7	<i>PR1b1</i>	Y08804	gcactaaacctaaagaaaatggg (24)	aagtggcatccaagacata (21)	177
8	<i>PR-P2</i>	X58548	ggaacaggaacacaagaacagtga (25)	cccaatccattagtgtccaatcg (23)	104

2.6.4. Analisi semiquantitativa dell'espressione genica mediante RT-PCR

I campioni di cDNA sono stati sottoposti ad amplificazione PCR convenzionale per un'analisi semiquantitativa dei trascritti, secondo i cicli termici distinti per ciascun gene riportati in **Tab. 7**. I geni bersaglio, le corrispondenti coppie di primer usate e le dimensioni attese degli ampliconi sono riportati in **Tab. 5**. I geni della *β-actina* e delle proteine PR (*PR1b1*, *PR-P2* e *PR5*) sono stati amplificati in 25 μL con il PCR Express Thermal Cycler (Thermo Hybaid, Waltham, MA, USA) in presenza di PCR Buffer 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 100 μM di ciascun dNTP, 400 nM di ciascun primer forward e reverse, 1,50 U di *Taq* DNA polimerasi ricombinante (Invitrogen) in Storage Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT e 50% glicerolo) e della quantità corrispondente di cDNA, calcolata in seguito a normalizzazione con il livello d'espressione del gene costitutivo codificante per la *β-actina*. L'amplificazione di questo gene è servita anche per verificare la sintesi di cDNA nella RT ed escludere la contaminazione di gDNA. Le dimensioni degli ampliconi sono state

verificate con lo standard di pesi molecolari 1 Kb Ladder plus (Invitrogen) dopo elettroforesi su gel d'agarosio (2%) in tampone TAE 1X a 90 V per 1 h in presenza di bromuro di etidio (0,5 µg/mL). La misurazione semiquantitativa dei prodotti PCR è stata effettuata con il sistema di acquisizione Typhoon 9200 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, Uppsala, Svezia) usando il software per analisi d'immagine ImageQuant TL (Amersham Biosciences).

Tabella 7. Condizioni di amplificazione del cDNA in RT-PCR per i geni in studio.

β-ACTINA	PR1b1	PR-P2	PR5
94°C per 5 min	94°C per 3 min	94°C per 3 min	94°C per 3 min
35X { 94°C per 45 sec 53°C per 45 sec 72°C per 45 sec	30X { 94°C per 30 sec 45°C per 60 sec 72°C per 30 sec	30X { 94°C per 60 sec 55°C per 60 sec 72°C per 60 sec	30X { 94°C per 30 sec 59°C per 60 sec 72°C per 30 sec
72°C per 5 min	72°C per 10 min	72°C per 5 min	72°C per 10 min

2.6.5. Condizioni di amplificazione in Real Time qRT-PCR

L'amplificazione mediante Real Time qRT-PCR è stata ottimizzata in un volume finale di 20 µL (**Tab. 8**) contenente 1X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 200 nM ciascuno dei primer forward e reverse per i geni *β-actina*, *LoxA* e *LoxC*, in alternativa 100 nM ciascuno dei primer forward e reverse per i geni bersaglio *LoxD*, *PIN1*, *PIN2*, *PR1b1* e *PR-P2*, 4 µL dello stampo di cDNA (1:4) ottenuto da 1 µg di RNA totale in 20 µL. I geni bersaglio, le corrispondenti coppie di primer validate e le dimensioni attese degli ampliconi sono riportati in **Tab. 6**. L'amplificazione Real Time qRT-PCR del cDNA per i geni in esame è stata effettuata con il 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), presso la Piattaforma di

Genomica Vegetale del Laboratorio “GenoPOM” di Portici, nelle condizioni di ciclo standard dell’apparecchiatura indicate dal produttore e di seguito riportate:

- 95°C per 10 minuti: attivazione della *Taq* DNA polimerasi (*hot start*);
- amplificazione PCR *two step* per 40 cicli (40X):
 - 95°C per 15 secondi: denaturazione dello stampo;
 - 60°C per 1 minuto: ibridazione dei primer (*annealing*) e sintesi del DNA.

Per ciascun campione di cDNA sono state effettuate ripetizioni di reazioni identiche in triplicato e sono stati eseguiti esperimenti indipendenti di Real Time qRT-PCR in tre repliche tecniche per ciascun gene. Le repliche biologiche sono state effettuate usando, per ciascun campione, RNA proveniente da tre esperimenti di inoculazione indipendenti. I valori medi di esperimenti indipendenti sono stati sottoposti al calcolo dell’errore standard della media (SEM) e al test “T di Student” mediante il software per analisi statistica PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past>).

Tabella 8. Composizione della reazione Real Time qRT-PCR per l’analisi dell’espressione genica.

Componente	Aliquota	Concentrazione finale	
2X Power SYBR Green PCR Master Mix	10 µL	1X	} 16 µL mix
Forward primer	1 µL (0,2-0,1 pmoli)	200-100 nM	
Reverse primer	1 µL (0,2-0,1 pmoli)	200-100 nM	
H ₂ O Milli-Q sterile	4 µL		
cDNA template (1:4)	4 µL	(1:20)	
Volume finale	20 µL		

2.6.6. Analisi quantitativa dell'espressione genica mediante Real Time qRT-PCR

La Real Time qRT-PCR consente di determinare la quantità iniziale del DNA stampo attraverso la misurazione in tempo reale della quantità del prodotto PCR in corrispondenza di ciascun ciclo nella fase esponenziale. La quantificazione relativa (RQ) di un esperimento di Real Time qRT-PCR prevede che il gene d'interesse in un campione (ad es. trattato) sia comparato con lo stesso gene in un altro campione (ad es. non trattato), usato come calibratore. I risultati sono espressi come *up-* o *down-regulation* del gene di interesse nel trattato vs. il non trattato. Un gene costitutivo è usato come standard interno di riferimento nella fase di normalizzazione per annullare la variabilità sperimentale.

La RQ dell'espressione dei geni in studio durante la risposta sistemica di difesa della pianta è stata effettuata rispetto al campione non trattato con *Trichoderma* (controllo) a 0 hpi, usato come calibratore, applicando il “metodo $\Delta\Delta Ct$ ”. I dati ottenuti sono stati espressi come $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{campione}} - \Delta Ct_{\text{calibratore}} = (Ct_{\text{gene bersaglio}} - Ct_{\text{gene riferimento}})_{\text{campione}} - (Ct_{\text{gene bersaglio}} - Ct_{\text{gene riferimento}})_{\text{calibratore}}$ e Ct (*threshold cycle*) è il ciclo soglia di ciascun trascritto. Il Ct è definito come il numero di cicli in cui il segnale di fluorescenza, cioè la quantità dell'amplificato, raggiunge un determinato valore soglia di rilevamento al di sopra del rumore di fondo nella fase esponenziale della PCR ed è inversamente correlato con la quantità di DNA stampo presente nella reazione (Livak e Schmittgen, 2001). Le quantità di cDNA gene-specifiche nei differenti campioni in studio sono in relazione con i livelli di trascrizione degli stessi geni, ciò significa che è possibile determinare la quantità dei trascritti usando direttamente i valori di Ct . L'abbondanza relativa del cDNA stampo di ciascuno dei 7 geni bersaglio, e di conseguenza i livelli di trascrizione del corrispondente mRNA, è stata determinata usando il metodo della curva standard relativa e i dati sono stati sottoposti a normalizzazione, per le eventuali variazioni di quantità, attraverso il trascritto costitutivo del gene della β -actina usato come gene

endogeno di riferimento. I dati ottenuti sono stati acquisiti usando il software 7900 HT Sequence Detection System (SDS) ver. 2.3 e analizzati mediante il software SDS RQ Manager ver. 1.2 (Applied Biosystems).

APPENDICE al Capitolo 2

Tampone di corsa MOPS 10X pH 7 (1L)

- 41,86 g di acido 3-(N-morfolin)propansulfonico (MOPS)
- 25,1 mL di NaAcetato 2 M
- 20 mL di EDTA 0,5 M
- portare a pH 7,0
- qb H₂O MilliQ-DEPC e sterilizzare in autoclave a 121°C per 30 min

Loading buffer per RNA

- 150 µL di Formammide
- 45 µL di Formaldeide al 37%
- 6 µL di buffer MOPS 10X
- 12 µL RNA loading dye 2X
(20% glicerolo, 0,025% blu di bromofenolo, 0,025% xilene cianolo)
- 0,5 µL di EtBr 10 µg/µL

Gel d'agarosio 1,25% denaturante per RNA (40 mL)

- sciogliere per ebollizione 0,5 g di agarosio in 33,6 mL di H₂O-DEPC e 4 mL di MOPS 10X
- lasciare raffreddare fino a 60°C
- aggiungere 2,4 mL di formaldeide al 37% (12,3 M)
- versare nello stampo e attendere almeno 30 minuti per la solidificazione

Preparazione dei campioni di RNA

- portare 1 µg di RNA totale in un volume di 3 µL con H₂O-DEPC
- aggiungere 3 volumi di loading buffer per RNA (3:1)
- incubare i campioni a 65°C per 10 minuti
- raffreddare in ghiaccio per 2 minuti
- caricare i 12 µL nel gel ed effettuare l'elettroforesi a 60 V per 90 min

Capitolo 3

RISULTATI

La presente attività di ricerca ha riguardato lo studio della variabilità di linee di pomodoro nella risposta di promozione della crescita indotta dal fungo antagonista benefico *Trichoderma* spp. e nella relativa induzione dell'espressione di alcuni geni, marcatori delle vie di segnalazione di difesa mediate da SA e JA/Et. Nelle stesse condizioni, in seguito all'inoculazione con un patogeno, è stata studiata la variabilità nella risposta di resistenza sistemica indotta da *Trichoderma*, in termini di sviluppo delle lesioni necrotiche e di variazione nell'espressione di alcuni geni, selezionati come marcatori delle vie di segnalazione di difesa mediate da SA e JA/Et. Tutte le analisi sono state condotte sulle linee di pomodoro coltivato (*S. lycopersicum*) Corbarino, M82, SM36, TA209 e sulle specie selvatiche *S. pennellii*, accessione LA0716, e *S. habrochaites*, accessione LA1777.

3.1. Effetti dell'interazione *in vivo* pianta-*Trichoderma*

Nell'ambito dell'interazione pianta-antagonista è stata valutata la risposta delle linee di pomodoro ai funghi benefici *T. atroviride* P1 e *T. harzianum* T22 (dopo *seed coating*), in termini sia di stimolazione della crescita (effetto biofertilizzante) sia di pre-attivazione delle risposte di difesa (induzione geni di difesa).

3.1.1. Effetto biofertilizzante

È noto che il fungo benefico *Trichoderma* spp. può indurre nelle piante, attraverso l'instaurarsi di un'interazione simbiotica a livello radicale, un effetto biofertilizzante che si manifesta con la promozione della crescita. L'eventuale presenza di tale effetto nelle linee di pomodoro in studio, coltivate in terreno o in idroponica, è stata valutata visivamente e attraverso il rilevamento di parametri biometrici che hanno riguardato la parte aerea

(lunghezza e peso secco del fusto) e l'apparato radicale (lunghezza e peso secco della radice).

3.1.1.1 Analisi biometriche delle colture in terreno

Da una prima valutazione visiva, lo sviluppo della parte aerea delle piante coltivate in terreno è stato in generale, in tutte le linee esaminate, stimolato da entrambe le specie di *Trichoderma* nelle condizioni del saggio, a livelli risultati variabili in funzione del genotipo della pianta (**Fig. 6**). La linea LA0716 ha mostrato difficoltà di accrescimento in terreno, nelle condizioni del saggio, che non hanno consentito una corretta valutazione della crescita.

I rilievi biometrici effettuati sulla lunghezza del fusto (altezza della pianta) hanno dimostrato differenze tra le altre 5 linee e, nell'ambito della stessa linea, tra i trattamenti con *T. atroviride* P1 e *T. harzianum* T22 rispetto al controllo non trattato (**Fig. 7**). In particolare, il trattamento con P1 ha limitato l'accrescimento del fusto della linea LA1777 in maniera significativa. Lo stesso effetto è presente ma non è risultato significativo nelle linee Corbarino e M82. Al contrario, P1 ha stimolato significativamente la crescita della linea TA209, mentre lo stesso effetto non è risultato significativo per la linea SM36 (**Fig. 7**). Per quanto riguarda il trattamento con T22, c'è stata una stimolazione della crescita del fusto di quasi tutte le linee di pomodoro in studio, in maniera più efficace rispetto a P1: Corbarino, LA1777 e M82 hanno mostrato un andamento positivo, tuttavia con valori non significativamente diversi da quelli del controllo; SM36 e TA209 hanno mostrato una stimolazione della crescita del fusto statisticamente significativa, simile a quella ottenuta con P1 (**Fig. 7**). Nel complesso, le linee SM36 e TA209 hanno dato la migliore risposta, in termini di accrescimento del fusto, in seguito all'interazione con entrambe le specie di *Trichoderma* utilizzate.

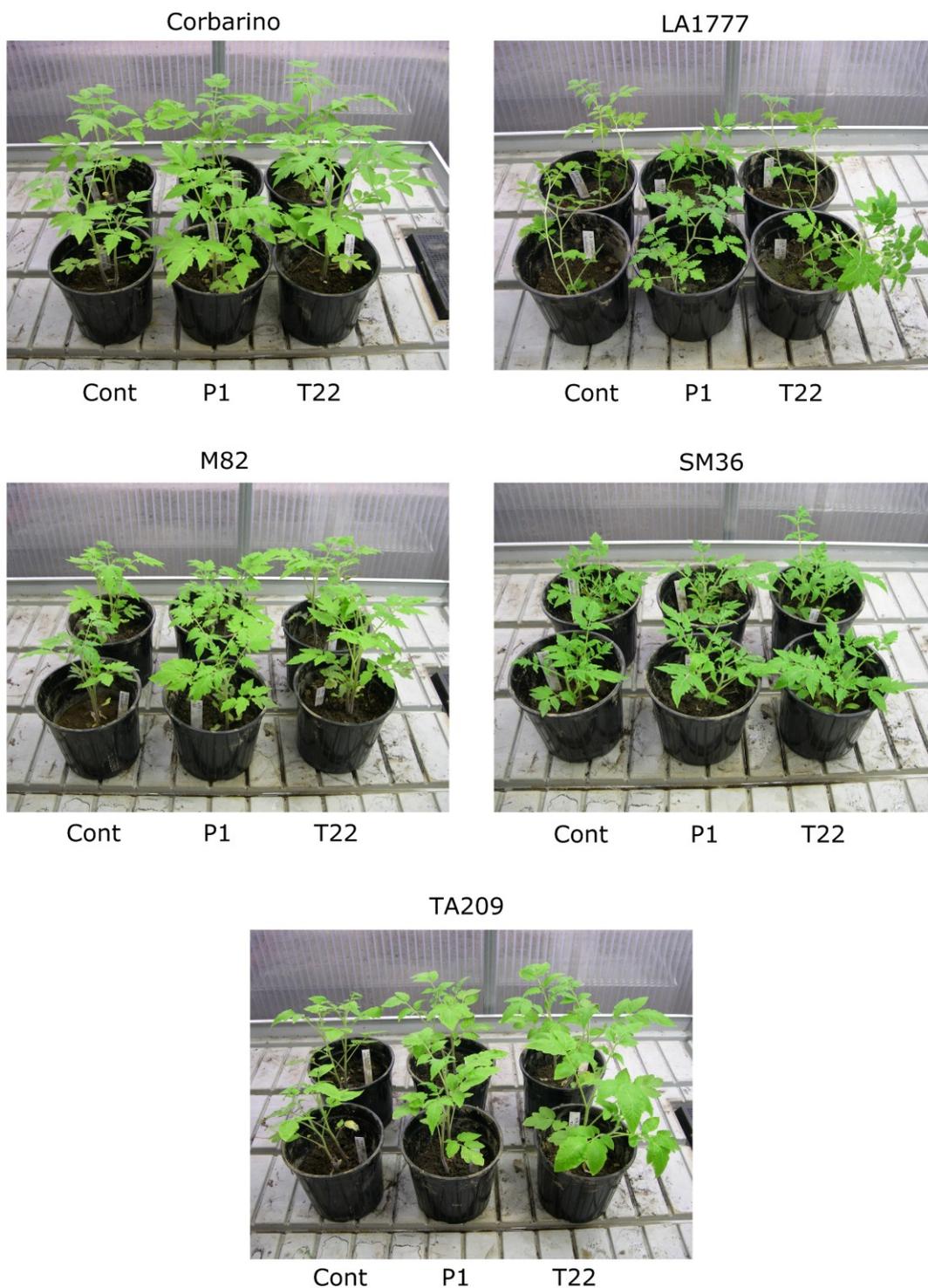


Figura 6. Effetto del trattamento con *Trichoderma* spp. sullo sviluppo della parte aerea di piante di pomodoro. È mostrato lo sviluppo della parte aerea di piante di *S. lycopersicum* (linee Corbarino, M82, SM36 e TA209) e di *S. habrochaites* (linea LA1777), sviluppate da semi trattati con *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o non trattati (Cont).

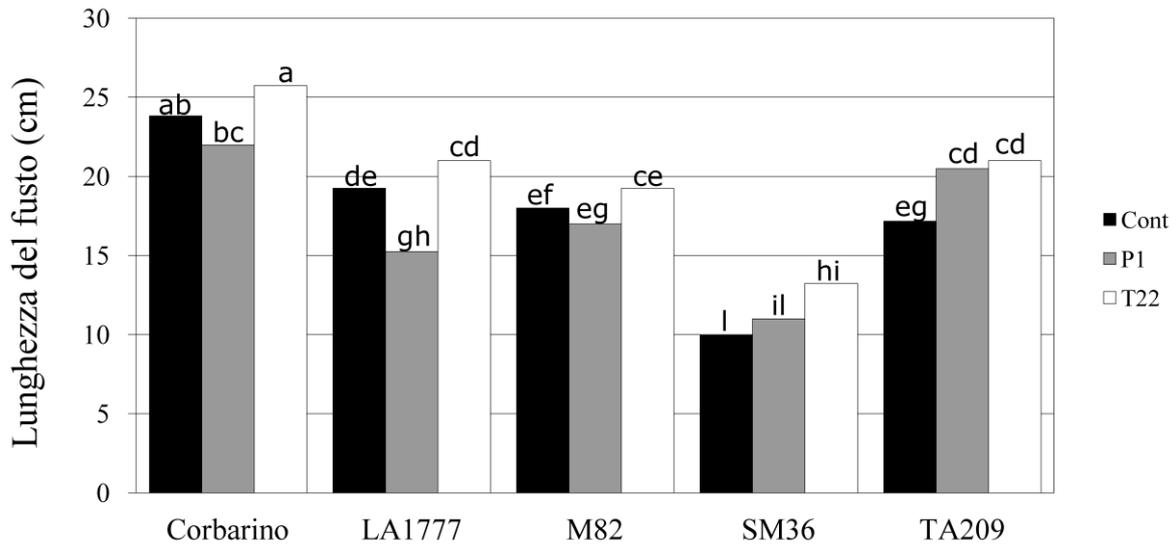


Figura 7. Effetto del trattamento con *Trichoderma* spp. sulla crescita in altezza di piante di pomodoro. Sono riportate le lunghezze del fusto di piante di *S. lycopersicum* (linee Corbarino, M82, SM36 e TA209) e di *S. habrochaites* (linea LA1777), sviluppate da semi trattati con *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o non trattati (Cont). I valori indicati dalla stessa lettera non sono significativamente differenti in base al test di Duncan ($P \leq 0,01$).

L'ulteriore misurazione dello sviluppo della parte aerea delle piante, effettuata in termini di peso secco, ha confermato un effetto stimolante dell'interazione con *Trichoderma* spp. per quasi tutte le linee, tranne LA1777 trattata con T22 e TA209 trattata con P1 (**Tab. 9**).

La valutazione visiva dello sviluppo dell'apparato radicale delle piante coltivate in terreno ha evidenziato differenze tra le linee di pomodoro nell'interazione con le specie di *Trichoderma* (**Fig. 8**). Gli apparati radicali di Corbarino, LA1777 e M82 hanno risposto in maniera positiva all'interazione con *T. atroviride* P1 in termini di sviluppo laterale e/o allungamento della radice, al contrario SM36 e TA209 sono stati limitati nello sviluppo dell'apparato radicale (**Fig. 8**). In seguito all'interazione con *T. harzianum* T22, solo SM36 ha mostrato un aumento dello sviluppo laterale della radice, mentre le altre linee non hanno mostrato importanti effetti (Corbarino e LA1777) o addirittura hanno presentato una riduzione dello sviluppo laterale (M82 e TA209), in combinazione con assenza di effetti sull'allungamento radicale (**Fig. 8**).

Tabella 9. Sviluppo della parte aerea di pomodoro, espresso in termini di peso secco, in seguito al trattamento con *Trichoderma* spp.

Linea/accessione	Peso secco della parte aerea (%)	
	P1	T22
Corbarino	130,7 ± 15,4	130,1 ± 11,3
LA1777	129,7 ± 4,6	83,2 ± 0,3
M82	112,6 ± 3,9	156,9 ± 15,2
SM36	139,5 ± 5,9	158,1 ± 11,0
TA209	75,6 ± 3,7	113,8 ± 5,5

(% del controllo non trattato ± ES)

Lo sviluppo dell'apparato radicale delle stesse linee è stato valutato anche mediante determinazione del peso fresco e del peso secco della radice. I dati del peso fresco della radice tra le varie linee in studio sono risultati corrispondenti a quelli del peso secco, per cui si riporta esclusivamente il secondo insieme di dati. Il trattamento con *Trichoderma* spp., rispetto al controllo non trattato, ha mostrato effetti peculiari sull'apparato radicale in dipendenza della linea di pomodoro e della specie di fungo benefico utilizzata (**Fig. 9**). In presenza di *T. atroviride* P1, le linee Corbarino e TA209 hanno mostrato una significativa stimolazione dello sviluppo/accrescimento dell'apparato radicale, le linee LA1777 e M82 sono risultate avere valori non significativamente superiori rispetto al controllo, mentre per SM36 si è osservata addirittura un'inibizione dello sviluppo/accrescimento radicale (**Fig. 9**). In presenza di *T. harzianum* T22, le linee in studio non hanno mostrato scostamenti significativi dal controllo, fatta eccezione per M82 e TA209, che hanno subito un notevole contenimento della crescita a livello radicale (**Fig. 9**).

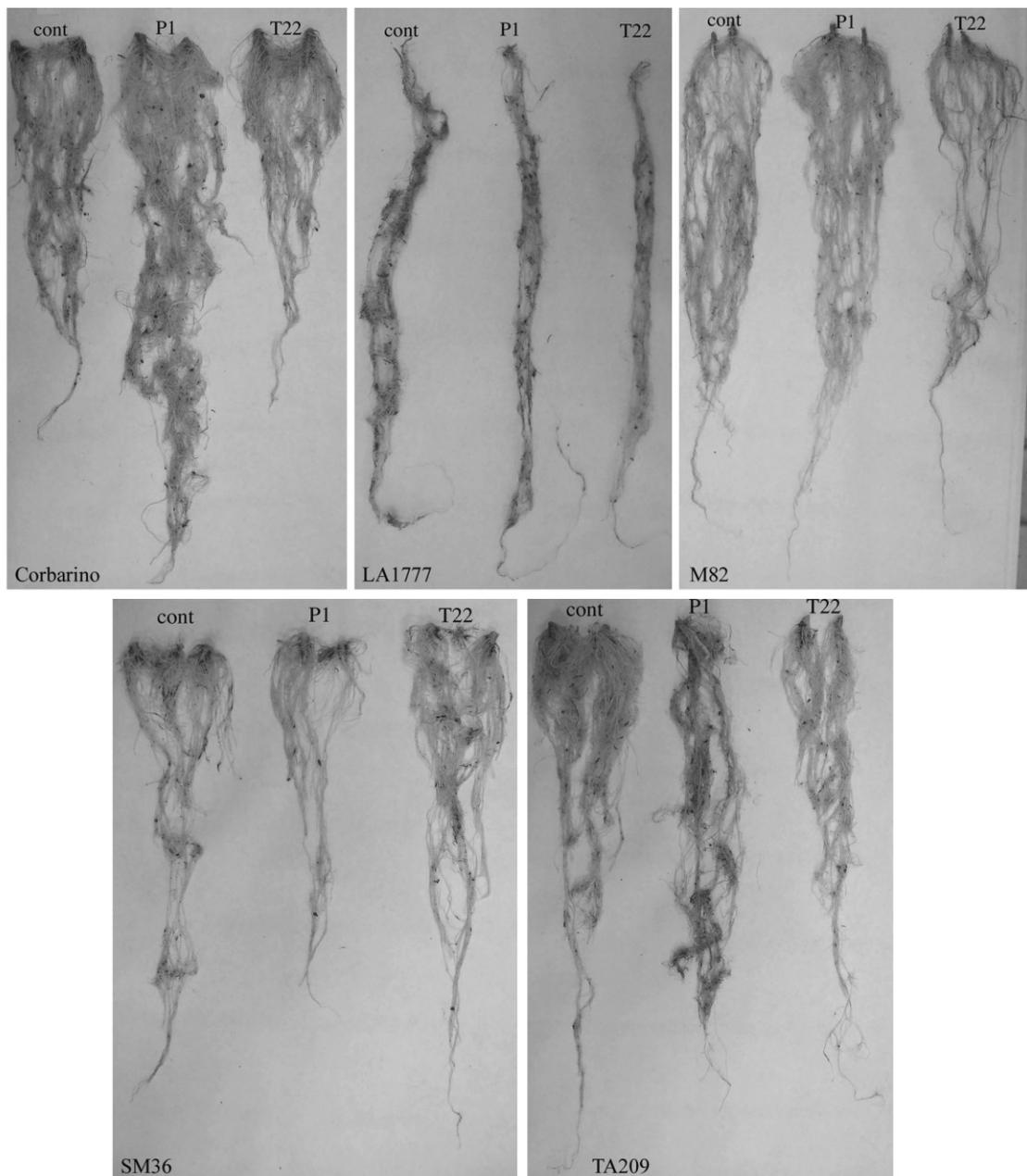


Figura 8. Effetto del trattamento con *Trichoderma* spp. sull'apparato radicale di piante di pomodoro. Sono riportate le fotografie delle radici di piante di *S. lycopersicum* (linee Corbarino, M82, SM36 e TA209) e di *S. habrochaites* (linea LA1777), sviluppate da semi trattati con *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o non trattati (cont).

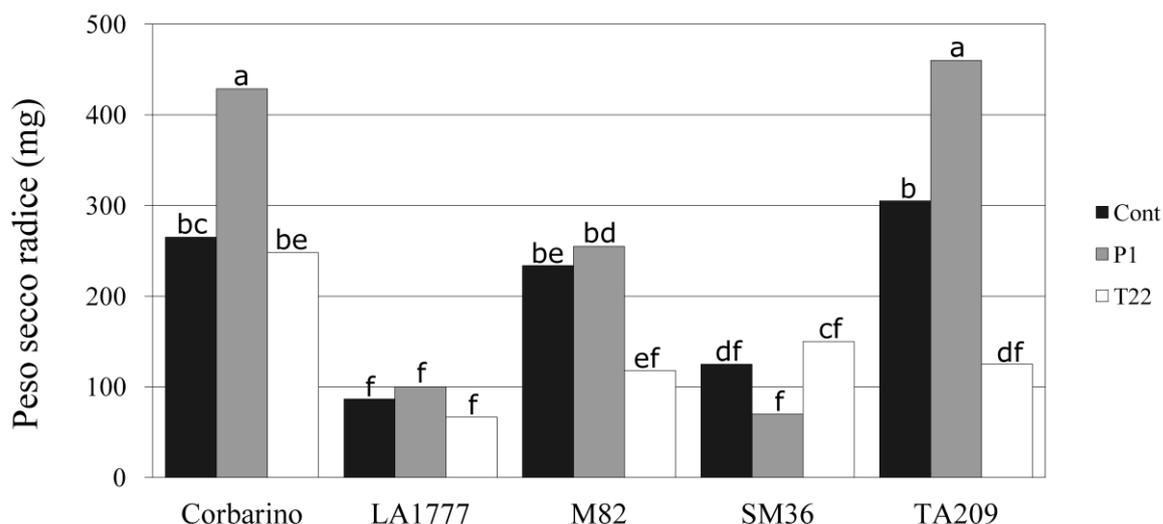


Figura 9. Effetto del trattamento con *Trichoderma* spp. sull'apparato radicale di piante di pomodoro. Sono riportati i valori del peso secco delle radici di piante di *S. lycopersicum* (linee Corbarino, M82, SM36 e TA209) e di *S. habrochaites* (linea LA1777), sviluppate da semi trattati con *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o non trattati (Cont). I valori indicati dalla stessa lettera non sono significativamente differenti in base al test di Duncan ($P \leq 0,01$).

In sintesi, i risultati ottenuti per la coltura in terreno dimostrano un effetto negativo o nullo di P1 sull'allungamento del fusto di tutte le linee trattate, ad esclusione della linea TA209 (**Fig. 7**), e un notevole effetto positivo sul peso secco delle radici esclusivamente per Corbarino e TA209 (**Fig. 9**). Al contrario, in tutte le linee trattate con T22 è presente un effetto positivo sull'allungamento del fusto (**Fig. 7**) e un effetto negativo o nullo sul peso secco delle radici (**Fig. 9**). Considerando i diversi insiemi di dati ottenuti, la linea Corbarino trattata con P1, nonostante non abbia beneficiato di un aumento di altezza (**Fig. 7**), si distingue per aver mostrato un maggiore accrescimento della parte aerea (**Tab. 9** e **Fig. 6**), associato a un notevole sviluppo dell'apparato radicale (**Figg. 8 e 9**). Allo stesso modo, considerando i diversi dati ottenuti, la linea TA209 trattata con P1 si distingue per un significativo incremento del peso secco delle radici (**Fig. 9**) e un maggiore allungamento del fusto (**Fig. 7**), non associato, tuttavia, a un incremento del peso secco della parte aerea (**Tab. 9**).

3.1.1.2. Analisi biometriche delle colture in idroponica

La valutazione della capacità di interagire con *Trichoderma* spp. delle specie di pomodoro *S. lycopersicum*, *S. habrochaites* e *S. pennellii* in termini di attività biofertilizzante è stata effettuata anche in coltura idroponica, in condizioni compatibili con la crescita di *Trichoderma* spp. e tali da consentire l'instaurarsi dell'interazione simbiotica a livello radicale, come dimostrato da esperimenti preliminari. L'utilizzo di tale tecnica colturale ha permesso di realizzare gli esperimenti in condizioni di crescita controllate e bilanciate dal punto di vista dei nutrienti e di poter valutare meglio lo sviluppo dell'apparato radicale.

Dopo quattro settimane di coltura idroponica in substrato inoculato con *Trichoderma*, i risultati ottenuti per la lunghezza e il peso secco delle parti aerea e radicale dimostrano che Corbarino trattato con P1 subisce una stimolazione dell'accrescimento della parte aerea (**Fig. 10**), ma non della radice (**Fig. 11**), che tuttavia non è statisticamente significativa rispetto al controllo non trattato. Le condizioni di coltura idroponica hanno consentito di valutare la linea selvatica LA0716, che aveva presentato problemi di crescita in terreno, per la quale il fusto e la radice hanno mostrato, in presenza di P1, una stimolazione statisticamente non significativa della crescita (**Fig. 10 e 11**). Nell'accessione di pomodoro selvatico LA1777, in seguito al trattamento con P1, lo sviluppo della parte aerea ha mostrato un incremento (**Fig. 10**), statisticamente significativo solo per la lunghezza del fusto (**Fig. 10A**), al contrario della lunghezza e del peso secco della radice (**Fig. 11A e B**). La linea M82 ha mostrato per la parte aerea una risposta positiva al trattamento con P1, rispetto al controllo (**Fig. 10**), ma non statisticamente significativa, mentre non ha presentato effetti di rilievo sull'accrescimento dell'apparato radicale (**Fig. 11**). Nella linea SM36, l'aumento della lunghezza del fusto e del peso secco della parte sia aerea sia radicale, rilevato in seguito al trattamento con P1, non è risultato statisticamente

significativo, rispetto al controllo non trattato (**Fig. 10 e 11**). La linea TA209 trattata con P1 ha mostrato un effetto negativo sull'accrescimento della parte aerea e radicale (**Fig. 10 e 11**), benché non statisticamente significativo.

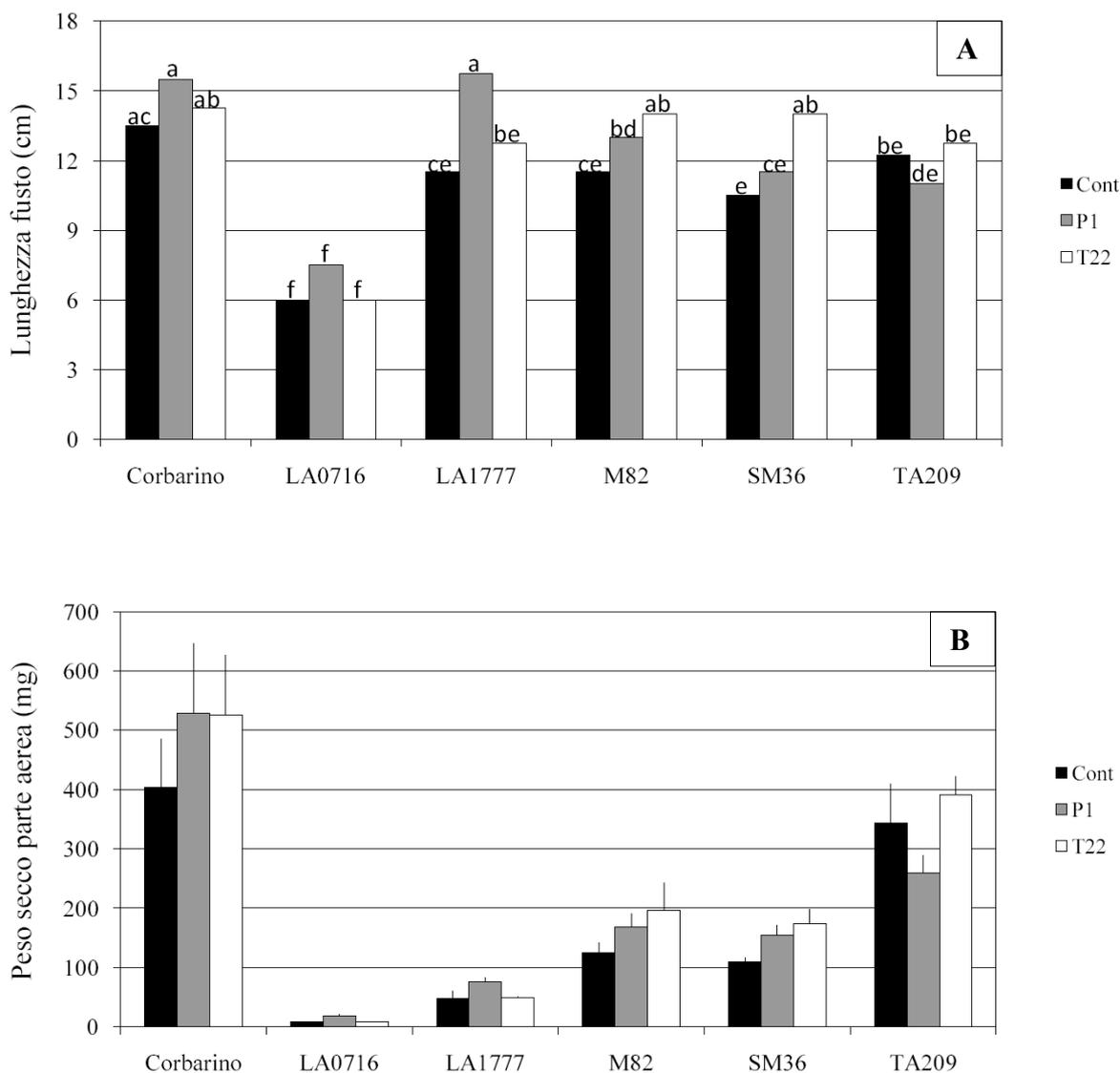


Figura 10. Effetto del trattamento con *Trichoderma* spp. di piante di pomodoro in idroponica. Sono riportati i valori della lunghezza del fusto (**A**) e del peso secco della parte aerea (**B**) di piante di *S. lycopersicum* (linee Corbarino, M82, SM36 e TA209), di *S. pennellii* (linea LA0716) e di *S. habrochaites* (linea LA1777), sviluppate da semi trattati con *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o non trattati (Cont). I valori indicati (**A**) dalla stessa lettera non sono significativamente differenti in base al test di Duncan ($P \leq 0,01$). I valori riportati (**B**) non sono risultati significativi al test di Duncan ($P \leq 0,05$).

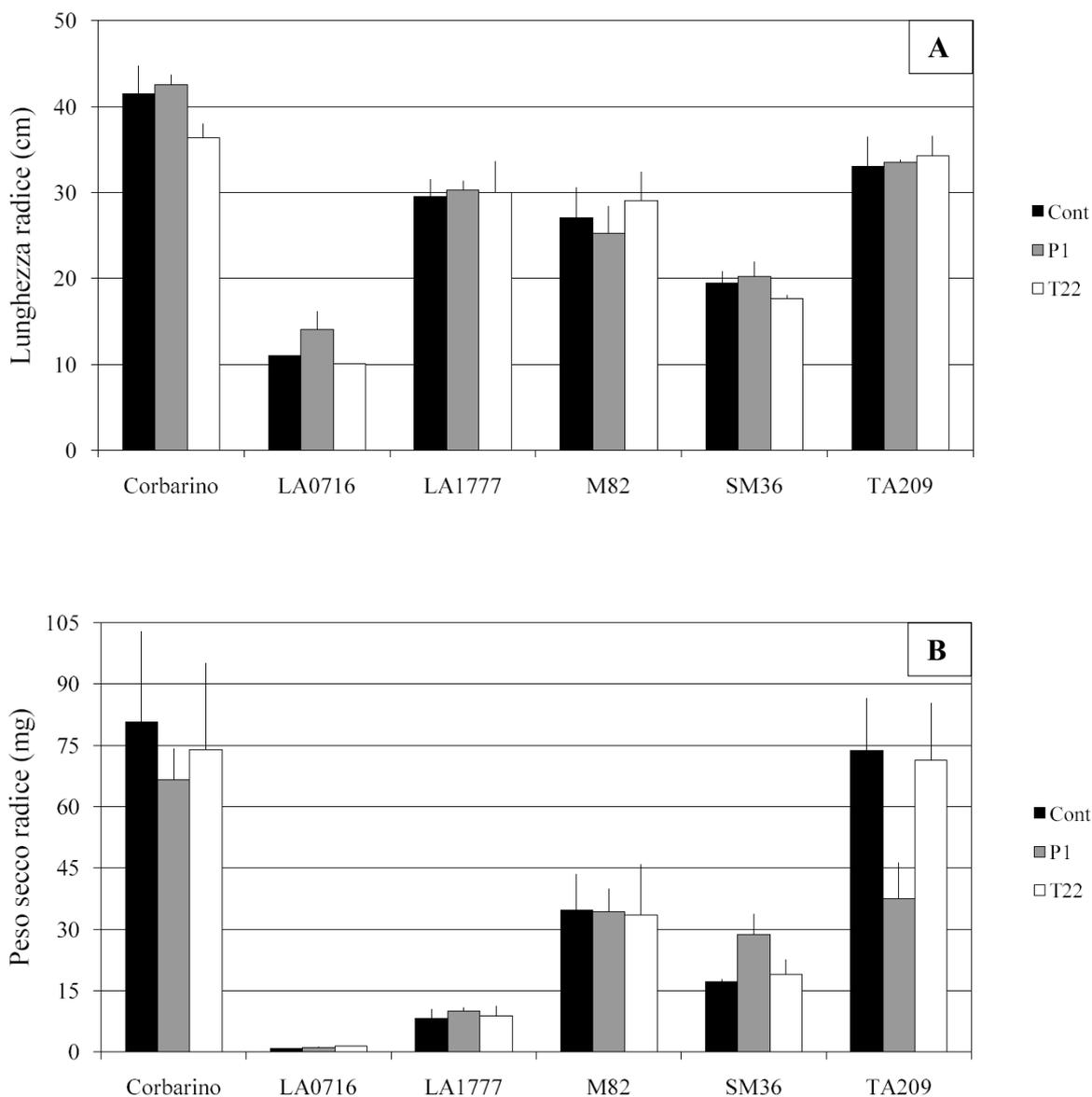


Figura 11. Effetto del trattamento con *Trichoderma* spp. di piante di pomodoro in idroponica. Sono riportati i valori della lunghezza (A) e del peso secco delle radici (B) di piante di *S. lycopersicum* (linee Corbarino, M82, SM36 e TA209), di *S. pennellii* (linea LA0716) e di *S. habrochaites* (linea LA1777), sviluppate da semi trattati con *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o non trattati (Cont). I valori riportati non sono risultati significativi al test di Duncan ($P \leq 0,05$).

Il trattamento di Corbarino con T22 mostra un effetto positivo sull'accrescimento della parte aerea (Fig. 10) e negativo sullo sviluppo radicale (Fig. 11), che tuttavia non sono statisticamente significativi. Rispetto alla linea LA0716, T22 è risultato meno efficace di P1, in quanto non ci sono state variazioni significative nella risposta delle parti aerea e radicale, rispetto al controllo non trattato (Fig. 10 e 11), ad eccezione di una stimolazione

non significativa del peso secco della radice (**Fig. 11B**). Nell'accessione selvatica LA1777, la parte aerea e la radice non hanno mostrato variazioni statisticamente significative nelle piante trattate con T22, rispetto al controllo non trattato (**Fig. 10 e 11**). La linea M82, in seguito all'interazione con T22, ha mostrato una stimolazione della crescita della parte aerea, significativa solo per l'allungamento del fusto (**Fig. 10A**), mentre non ha mostrato effetti di rilievo sulla crescita dell'apparato radicale, rispetto al controllo (**Fig. 11**). In seguito al trattamento con T22 della linea SM36, si è osservato un aumento dello sviluppo della parte aerea (**Fig. 10**), maggiore di quello osservato con P1, risultato statisticamente significativo solo per l'allungamento del fusto (**Fig. 10A**), mentre non si sono osservate variazioni di rilievo della lunghezza e del peso secco della radice, rispetto al controllo non trattato (**Fig. 11A e B**). Il trattamento della linea TA209 con T22 non ha mostrato variazioni statisticamente significative, rispetto al controllo, per entrambe le parti aerea (**Fig. 10**) e radicale (**Fig. 11**).

Pertanto, in coltura idroponica, le linee in studio hanno mostrato, in base ai dati raccolti, risposte al trattamento con P1 o T22 molto diverse rispetto a quelle ottenute nella coltivazione in terreno (**Figg. 7 e 9**). In condizioni di coltura idroponica, è possibile osservare che in pomodoro l'effetto biofertilizzante di *Trichoderma* spp. si manifesta maggiormente a carico della parte aerea (**Fig. 10**) e soprattutto della lunghezza del fusto (**Fig. 10A**), mentre è molto meno rilevante sullo sviluppo dell'apparato radicale (**Fig. 11**).

3.1.1.3. Azione biofertilizzante e attività auxino-simile di *Trichoderma*

È noto che funghi benefici del genere *Trichoderma* producono molecole ormono-simili con un effetto diretto sulla promozione della crescita delle piante. Pertanto, l'attività auxino-simile presente nel filtrato del mezzo di coltura di *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22 è stata valutata dopo 6 giorni di crescita mediante il test dei fusticini di pisello. L'allontanamento reciproco delle estremità dei fusticini sezionati longitudinalmente è stato determinato dopo 48 e 120 ore di immersione in una diluizione (1:10) del filtrato colturale. I risultati ottenuti dimostrano che a 48 ore dall'applicazione del filtrato colturale è presente una stimolazione auxino-simile, e che a 120 ore non si osservano ulteriori variazioni per P1, mentre è ancora presente attività auxino-simile con T22 (Fig. 12). La presenza di tale attività nel filtrato colturale indica che *Trichoderma* spp. producono molecole con effetto auxinico, che potrebbe spiegare l'effetto biofertilizzante osservato sulle linee di pomodoro in studio.

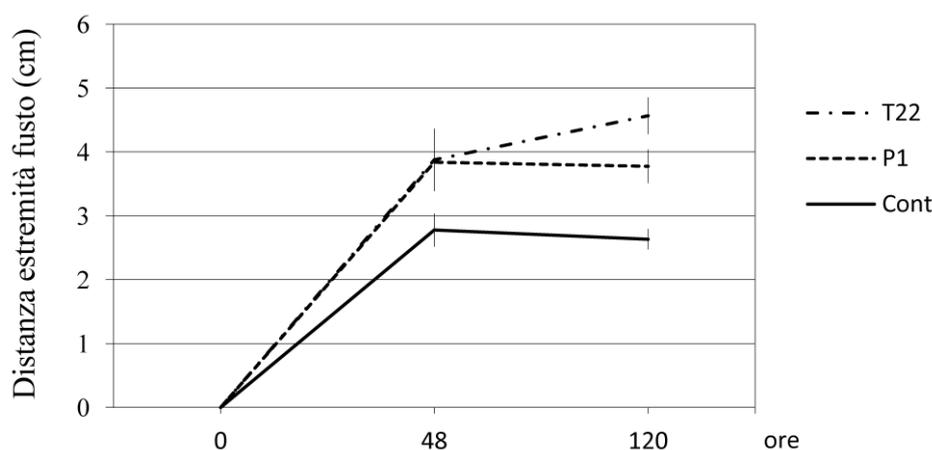


Figura 12. Effetto del trattamento con il filtrato colturale di *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o con il mezzo di coltura (Cont) nel test dei fusticini di pisello. L'allontanamento reciproco delle estremità dei fusticini sezionati longitudinalmente è stato determinato dopo 48 e 120 ore di immersione in una diluizione (1:10) del filtrato colturale.

3.1.2. Espressione di geni di difesa della pianta nell'interazione con *Trichoderma*

Allo scopo di selezionare geni di difesa la cui espressione fosse indicativa dell'attivazione di specifiche vie di trasduzione del segnale in pomodoro, è stata compiuta un'approfondita ricerca, nella letteratura disponibile e nelle banche dati di sequenze, dei principali geni di difesa di pomodoro di potenziale interesse. I risultati ottenuti hanno permesso di individuare geni, descritti successivamente in questa sezione, putativamente coinvolti nella risposta a funghi benefici del genere *Trichoderma* e utilizzabili come marcatori delle principali vie di segnalazione di difesa (**Tab. 10**). Sono stati selezionati geni nucleari rappresentativi delle risposte di difesa, marcatori delle vie metaboliche di segnalazione mediate da SA e JA/Et: *PR1b1*, un gene della famiglia *PR1* usato come marcatore dell'attivazione della SAR e delle risposte mediate da SA (Tornerio *et al.*, 1997); *PR-P2*, un gene della famiglia *PR4* principalmente indotto da SA in pomodoro (Bertini *et al.*, 2003; Fiocchetti *et al.*, 2006; Linthorst *et al.*, 1991; Van Kan *et al.*, 1995); *PIN1* e *PIN2*, geni della famiglia degli inibitori di proteinasi (*PIN*) indotti attraverso la via di segnalazione del JA (Doares *et al.*, 1995; Fidantsef *et al.*, 1999); *LoxA*, *LoxC* e *LoxD*, geni codificanti enzimi della famiglia delle lipossigenasi (*Lox*), implicati nella risposta di difesa mediata da JA (Ferrie *et al.*, 1994; Heitz *et al.*, 1997; Porta e Rocha-Sosa, 2002; Feussner e Wasternack, 2002).

La capacità di *Trichoderma* spp. di attivare risposte sistemiche di difesa in piante di pomodoro è stata analizzata, in una fase preliminare, mediante RT-PCR semiquantitativa per i geni *PR1b1*, *PR-P2* e *PR5*, appartenenti alla famiglia genica delle proteine PR. Tale analisi ha mostrato attivazione trascrizionale dei geni *PR1b1* e *PR-P2*, ma non di *PR5*, in alcune linee (SM36) trattate con *Trichoderma* spp. (P1 o T22) (dati non mostrati).

Tabella 10. Principali geni di difesa inducibili in pomodoro presenti in letteratura.

Gene	Induzione					Prodotto genico	Accessione	Riferimenti bibliografici
	ferita	JA	patogeno	SA	etilene			
<i>Proteine della patogenesi</i>								
<i>PR1a1</i>	nd	nd	+	nd	nd	proteina PR1a1	X71592	Tornero et al. (1994) Mol. Gen. Genet. 243 (1), 47-53
<i>PR1a2</i>	nd	nd	0	0	0	proteina PR1a2	Y08844	Tornero et al. (1997) Mol. Plant-Microbe Interact. 10:624-34
<i>PR1b1</i>	0	0	+	+	+	proteina PR1b1	Y08804	Tornero et al. (1997) Mol. Plant-Microbe Interact. 10:624-34
<i>P1-p14</i>	nd	nd	+	nd	+	proteina P1 (p14)	X68738	Tornero et al. (1993) Plant Physiol. 102:325
<i>PR-P4</i>	nd	0	+	+	nd	isoforma PR1 (P4)	M69247, J011520	Van Kan et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20:513-27
<i>PR-P6</i>	nd	nd	+	+	0	isoforma PR1 (P6)	M69248	Van Kan et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20:513-27
<i>PR2 type I</i>	nd	nd	+	+	+	β -1,3-glucanasi A	M80604	Van Kan et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20:513-27
<i>PR2 type II</i>	nd	nd	+	+	0	β -1,3-glucanasi B	M80608	Van Kan et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20:513-27
<i>PR3 type I</i>	nd	nd	+	-	+	chitinasi tipo I (CHI9)	Z15140	Van Kan et al. (1995) Plant Mol. Biol. 27:1205-1213; Danhash et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:1017-1029.
<i>PR3 type II</i>	nd	nd	+	+	0	chitinasi tipo II (CH3)	Z15141	Van Kan et al. (1995) Plant Mol. Biol. 27:1205-1213; Danhash et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:1017-1029.
<i>PR-P2</i>	nd	nd	+	+	+	proteina famiglia PR4	X58548	Linthorst et al. (1991) Mol. Plant-Microbe Interact. 4:586-92
<i>PR5-like</i>	nd	nd	+	+	+	proteina osmotina-like	M21346, 261893	King et al. (1988) Plant Mol. Biol. 10:401-412; Rodrigo et al. (1993) Plant Physiol. 102:939-945.
<i>PIN1</i>	+	+	nd	-	-	inibitore di proteinasi I	K03290	Graham et al. (1985a) J. Biol. Chem. 260:6555-60; Heitz et al. (1997) Plant Physiol. 114:1085-93; Doares et al. (1995) Plant Physiol. 108: 1741-46.
<i>PIN2</i>	+	+	+/0	-	+	inibitore di proteinasi II	K03291, AY129402	Graham et al. (1985b) J. Biol. Chem. 260:6561-64; Zhang et al. (2004) Plant Physiol. Biochem. 42:437-44; Doares et al. (1995) Plant Physiol. 108: 1741-46.
<i>Enzimi del metabolismo lipidico</i>								
<i>AOS</i>	+	+	nd	-	+	allene ossido sintasi	AF230371	Howe et al. (2000) Plant Physiol. 123:711-24
<i>LoxA</i>	nd	+	+	nd	nd	lipossigenasi A	U09026	Ferrie et al. (1994) Plant Physiol. 106:109-18
<i>LoxB</i>	nd	+	+	nd	nd	lipossigenasi B	U09025	Ferrie et al. (1994) Plant Physiol. 106:109-18
<i>LoxC</i>	0	0	nd	nd	nd	lipossigenasi C	U37839	Heitz et al. (1997) Plant Physiol. 114:1085-93
<i>LoxD</i>	+	+	nd	nd	nd	lipossigenasi D	U37840	Heitz et al. (1997) Plant Physiol. 114:1085-93

(JA) acido jasmonico, (SA) acido salicilico, (nd) non determinato, (+) induzione, (0) nessun effetto, (-) inibizione.

In seguito, questi studi sono stati confermati e ampliati mediante Real Time qRT-PCR per valutare in maniera quantitativa i cambiamenti relativi dei livelli di espressione dei geni di interesse. Le variazioni nella quantificazione relativa (RQ) dell'espressione di tali geni rispetto al controllo non trattato con *Trichoderma* spp., posto uguale ad 1 (calibratore), non sono state considerate significative per valori compresi tra 0,5 e 2 ($0,5 < RQ < 2$), sono invece stati considerati utili ai fini dello studio i valori di $RQ \geq 2$ per l'attivazione e di $RQ \leq 0,5$ per l'inibizione. Nel presente studio, tutte le analisi Real Time

qRT-PCR hanno mostrato valori di efficienza paragonabili tra loro e sono state selezionate soltanto coppie di primer con $E = 95\% \pm 5\%$, in modo tale da consentire una comparazione realistica dopo normalizzazione con il gene di riferimento, tenuto conto che un'efficienza di PCR del 100% corrisponde a una curva standard con $p = -3,32$. Inoltre, è stato dimostrato che i livelli di espressioni del gene costitutivo della actina, usati per la normalizzazione, sono risultati stabili nel tempo tra i vari campioni, trattati e non trattati, nelle condizioni del saggio.

Numerosi sono risultati i geni sovraespressi dopo 60 gg. dall'interazione simbiotica pianta-*Trichoderma* spp., rilevati mediante Real Time qRT-PCR, come di seguito riportato (**Fig. 13**): *PR1b1* in LA1777, SM36 e TA209 in risposta a P1 e/o T22; *PR-P2* in Corbarino, LA1777 e TA209 in risposta a P1 e T22; *PIN1* in Corbarino, LA1777 e SM36 in risposta a T22; *PIN2* esclusivamente per Corbarino in risposta a P1 e T22; *LoxA* in tutti i genotipi, eccetto SM36, in risposta a P1 e/o T22, con LA1777 rispondente a entrambi i ceppi; *LoxC* in SM36 in risposta a P1 e T22; *LoxD* non presenta attivazione nelle linee in studio. La linea di pomodoro selvatico LA1777 ha mostrato la migliore risposta al fungo benefico. In particolare, il trattamento con *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22 ha indotto l'espressione dei due geni *PR1b1* e *PR-P2*, marcatori della via di segnalazione del SA, in misura maggiore con T22 che con P1 (**Fig. 13**). I livelli di espressione del gene *LoxA* sono risultati fortemente aumentati in LA1777, sia con P1 sia con T22, rispetto al controllo non trattato, con un maggiore effetto di P1 rispetto a T22. Non sono state osservate importanti variazioni, in seguito al trattamento con *Trichoderma*, dei livelli trascrizionali dei geni *PIN1*, *LoxC* e *LoxD*, appartenenti alla via di segnalazione del JA. I livelli di espressione di *PIN2* non sono stati determinati in quanto le coppie di primer, progettate sulle sequenze di pomodoro coltivato, non hanno amplificato il cDNA della specie selvatica, per la quale non erano disponibili le corrispondenti sequenze di DNA in banca dati.

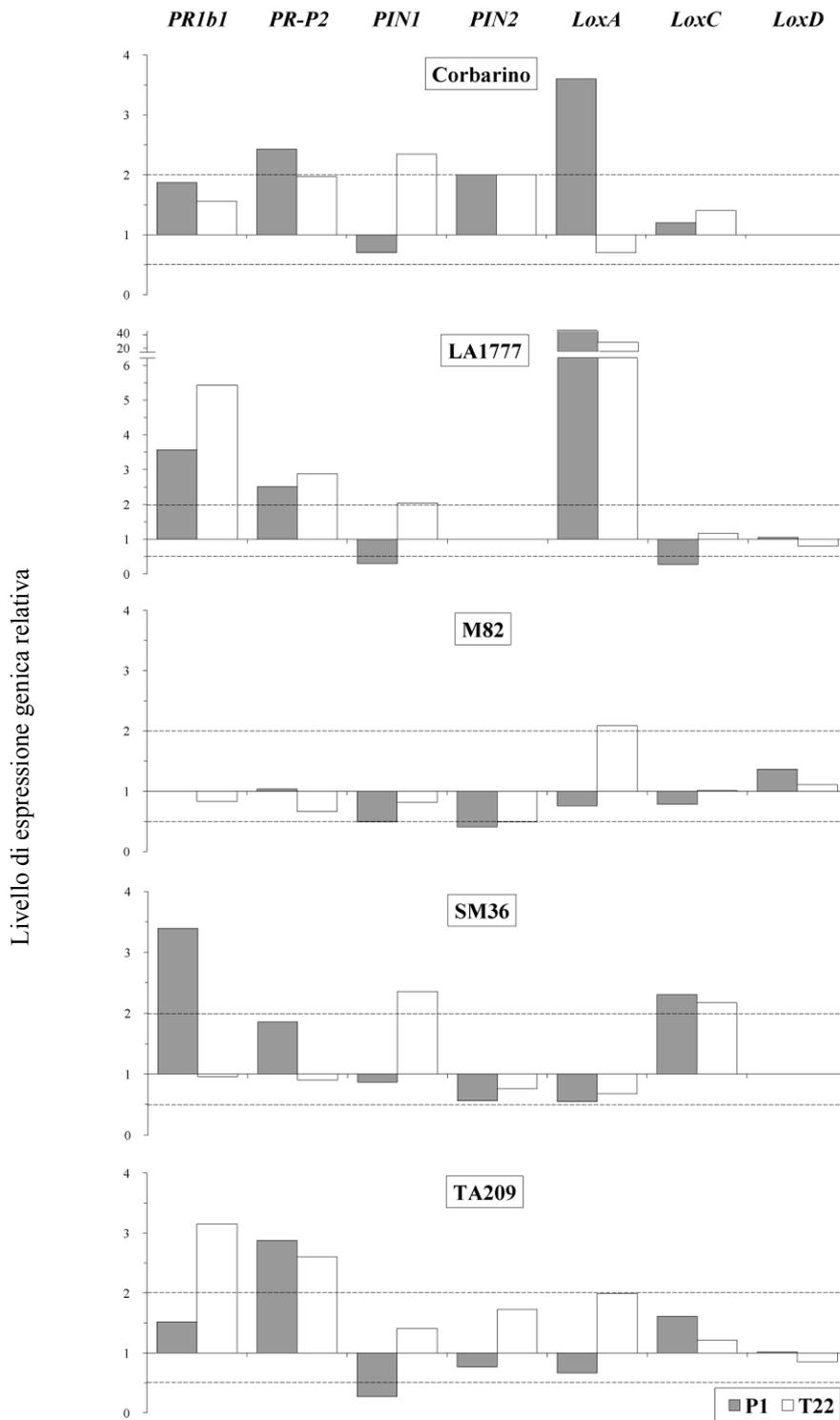


Figura 13. Effetti del trattamento con *Trichoderma* spp. sull'attivazione trascrizionale di geni correlati alla difesa. L'espressione relativa dei geni di difesa *PR1b1*, *PR-P2*, *PIN1*, *PIN2*, *LoxA*, *LoxC* e *LoxD* è stata misurata mediante Real Time qRT-PCR in foglie di piante di *S. lycopersicum* (linee Corbarino, M82, SM36 e TA209) e di *S. habrochaites* (linea LA1777), sviluppate da semi trattati con *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o non trattati. I livelli di espressione (RQ) di ciascun gene sono relativi al controllo non trattato con *Trichoderma* spp. (fold increase). I valori entro le linee orizzontali tratteggiate non sono stati considerati significativi ($0,5 < RQ < 2$). I dati di espressione di *PIN2* nella linea selvatica LA1777 sono assenti poiché non c'è stata amplificazione via PCR di questo gene con la coppia di primer in uso. I risultati mostrati sono relativi ad un esperimento rappresentativo dei tre effettuati.

In generale, le linee nelle quali c'è stata un'attivazione trascrizionale della maggior parte dei geni di difesa in esame, in seguito all'interazione con *Trichoderma* spp., sono state, in ordine decrescente, la linea selvatica LA1777 e la linea coltivata Corbarino, seguite da SM36 e TA209 (**Fig. 13**). Una particolare risposta a *Trichoderma* spp. è presente per la linea M82, in cui sono osservabili variazioni trascurabili nei livelli d'espressione di quasi tutti i geni in studio, tendenti ad una generale diminuzione dell'attività trascrizionale, con l'esclusione del gene *LoxA* in presenza di T22. In particolare, è importante notare che M82 è l'unica linea in cui c'è stata una significativa e contemporanea inibizione in presenza di P1 dei geni *PIN1* e *PIN2* (**Fig. 13**). Nella linea M82, inoltre, è stato osservato l'unico caso di inibizione in presenza di T22, relativo al gene *PIN2*, inibito come già visto anche da P1. Nelle altre linee, invece, sono stati meno numerosi i casi in cui i geni di difesa hanno mostrato, in seguito all'interazione con *Trichoderma* spp., un'inibizione dell'espressione. Precisamente, i livelli d'espressione hanno mostrato, in presenza di P1, una diminuzione per il gene *PIN1* nella linea TA209 e per i geni *PIN1* e *LoxC* in LA1777 (**Fig. 13**). I geni *PR*, *LoxA* e *LoxD* non hanno presentato casi di inibizione significativa nelle linee in studio (**Fig. 13**).

3.2. Effetti dell'interazione *in vivo* pianta-*Trichoderma*-patogeno

In seguito, nell'ambito dell'interazione pianta-antagonista-patogeno, è stata valutata l'induzione di resistenza sistemica, in termini di sviluppo di lesioni necrotiche e attivazione di geni di difesa, da parte di funghi antagonisti del genere *Trichoderma* in piante di pomodoro inoculate con il patogeno *B. cinerea*.

3.2.1. Induzione di resistenza sistemica al patogeno: analisi delle lesioni necrotiche

Piante di pomodoro appartenenti alle linee in studio, coltivate in terreno per 60 gg. dopo trattamento dei semi con *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22, sono state inoculate sulla terza foglia con il patogeno *B. cinerea* 309. L'attecchimento e il progredire dell'infezione sono stati verificati, in termini di comparsa e sviluppo delle lesioni necrotiche, a intervalli di tempo regolari (24, 48, 72 e 96 hpi), di cui si riportano i dati rappresentativi a 48 (**Fig. 14A**) e 96 hpi (**Fig. 14B-C**).

Il trattamento con *T. atroviride* P1, rispetto al controllo, ha indotto una significativa riduzione dello sviluppo delle lesioni necrotiche a 48 hpi in TA209, che si è mantenuta in parte a 96 hpi; inoltre, l'effetto a 48 hpi è risultato paragonabile a quello indotto da T22. Per quanto riguarda le altre linee, in seguito al trattamento con P1, Corbarino e SM36 non hanno mostrato variazioni significative rispetto al controllo a 48 e a 96 hpi. Al contrario, l'area delle lesioni necrotiche della linea M82 a 48 hpi è risultata maggiore nelle piante trattate con P1 rispetto al controllo, una differenza che diventa ancora più rilevante a 96 hpi, quando l'area delle lesioni risulta superiore di oltre il 100% dei valori del controllo (**Fig. 14A e B**).

Le linee di pomodoro trattate con *T. harzianum* T22 hanno mostrato un ritardo dello sviluppo delle lesioni necrotiche a 48 hpi, in maniera significativa per M82, SM36 e TA209, mentre Corbarino ha presentato valori di poco inferiori al controllo (**Fig. 14A**).

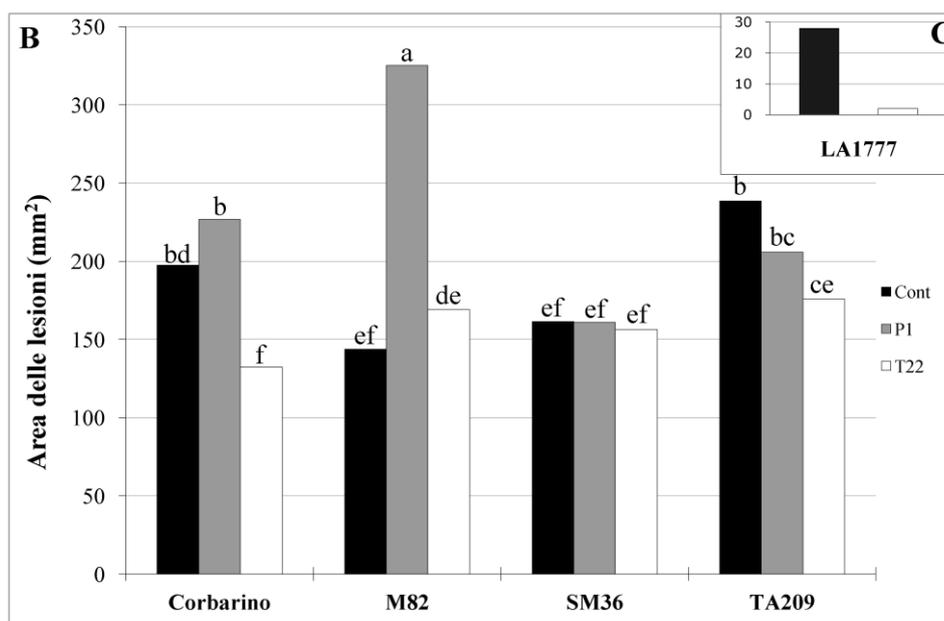
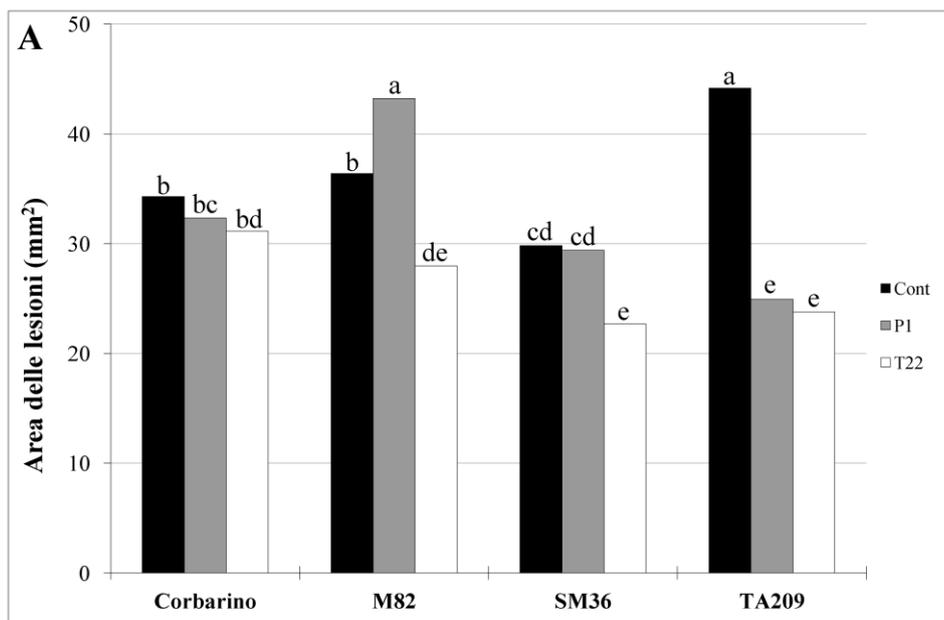


Figura 14. Effetti del trattamento con *Trichoderma* spp. sulla resistenza delle piante di pomodoro al patogeno *B. cinerea*. Piante di *S. lycopersicum* (linee Corbarino, M82, SM36 e TA209) e di *S. habrochaites* (linea LA1777), sviluppate da semi trattati con *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o non trattati (Cont), sono state inoculate sulla terza foglia vera con una sospensione di spore di *B. cinerea*, misurando le lesioni necrotiche a 48 hpi (A) e 96 hpi (B-C). I valori indicati dalla stessa lettera non sono significativamente differenti in base al test di Duncan ($P \leq 0,01$). In (C) sono riportate le aree medie delle lesioni a 96 hpi su piante controllo (Cont) e trattate con P1 o T22 dell'accessione selvatica *S. habrochaites* LA1777.

Successivamente, a 96 hpi, l'effetto positivo del trattamento con T22 diventa rilevabile anche in Corbarino e permane in TA209, mentre in M82 e SM36 lo sviluppo dell'area delle lesioni raggiunge quello del controllo (**Fig. 14B**). È importante notare che la linea TA209 ha mostrato effetti positivi nell'interazione con T22 per tutta la durata del monitoraggio (96 ore) in termini di resistenza sistemica indotta (ISR) (**Fig. 14A e B**).

In sintesi, il trattamento con P1 si è dimostrato complessivamente meno efficace di quello con T22, ad eccezione della linea TA209, sulla quale, a 48 hpi, le due specie di *Trichoderma* hanno avuto un effetto paragonabile (**Fig. 14A**).

Un comportamento particolare è stato mostrato dall'accessione selvatica LA1777. Infatti, a causa dell'elevata densità di tricomi ghiandolari presenti sulle foglie, la goccia di sospensione conidica di *B. cinerea*, depositata al momento dell'infezione, ha subito una dispersione su tutta la foglia. Pertanto, il numero di conidi per unità di superficie fogliare si è ridotto ed è risultato apparentemente insufficiente a supportare il procedere dell'infezione nelle piante trattate con *T. atroviride* P1. Nelle piante controllo e in quelle trattate con *T. harzianum* T22 soltanto il 17% degli inoculi effettuati ha dato origine a lesioni necrotiche che, a 96 hpi, hanno raggiunto una dimensione media di 2 mm² nelle piante trattate con T22 vs. 28 mm² nelle piante controllo non trattate (**Fig. 14C**).

È interessante sottolineare il comportamento della linea M82 che, in seguito al trattamento con P1, è risultata più suscettibile al patogeno, mentre il trattamento con T22 ha avuto effetti positivi sulla resistenza al patogeno solo a 48 hpi (**Fig. 14A e B**). Tali risultati appaiono correlare con la su riportata assenza di attivazione, o addirittura inibizione della trascrizione, di geni di difesa in risposta all'interazione con *Trichoderma* spp. (**Fig. 13**). In maniera speculare, nelle linee Corbarino, LA1777 e TA209, la maggiore resistenza al patogeno osservata in seguito all'interazione con *Trichoderma* correla con la pre-attivazione di geni di difesa (**Fig. 13**).

3.2.2. Espressione di geni di difesa nell'interazione pianta-*Trichoderma*-patogeno

Le stesse piante di pomodoro, inoculate sulla terza foglia vera con il patogeno *B. cinerea* 309 dopo 60 gg. dal trattamento con funghi antagonisti del genere *Trichoderma*, sono state analizzate per valutare l'induzione di resistenza per via sistemica in termini di attivazione di geni di difesa mediante Real Time qRT-PCR, dopo aver impiegato la RT-PCR in una fase preliminare (dati non mostrati). Le variazioni di RQ dell'espressione di tali geni rispetto al controllo non trattato con *Trichoderma* spp. al tempo zero (calibratore), sono state considerate utili ai fini dello studio per valori di $RQ \geq 2$ per l'attivazione e di $RQ \leq 0,5$ per l'inibizione, non sono invece state considerate significative per valori compresi tra 0,5 e 2 ($0,5 < RQ < 2$).

Dopo l'inoculazione con il patogeno, i geni della via di segnalazione del SA (geni *PR*), attivati in seguito all'interazione con il solo *Trichoderma* spp., hanno mostrato a 24 hpi una generale diminuzione dei livelli d'espressione nelle foglie situate al di sopra di quelle inoculate, similmente alle piante controllo non trattate con *Trichoderma* (**Fig. 15**). Al contrario, nello stesso intervallo di tempo, i geni della via di segnalazione del JA (geni *PIN* e *Lox*) hanno mostrato un aumento dei livelli d'espressione rispetto alle piante del controllo sottoposte ad infezione, almeno con uno dei due ceppi di *Trichoderma* (**Fig. 15**). I profili di espressione dei geni di difesa in studio hanno mostrato, inoltre, andamenti caratteristici per ciascuna linea di pomodoro durante lo sviluppo della malattia (**Fig. 15**). Questo indica che a 24 hpi l'infezione di *B. cinerea* ha inibito la via di segnalazione del SA nelle piante trattate con *Trichoderma* e nel controllo, mentre ha attivato la via di segnalazione del JA, in misura maggiore nelle piante trattate rispetto al controllo. Anche a 48 hpi, il livello di espressione dei geni di difesa della via di segnalazione del JA in seguito all'infezione di *B. cinerea*, è stato generalmente stimolato dalla presenza *Trichoderma*, per almeno uno dei due ceppi, rispetto al controllo.

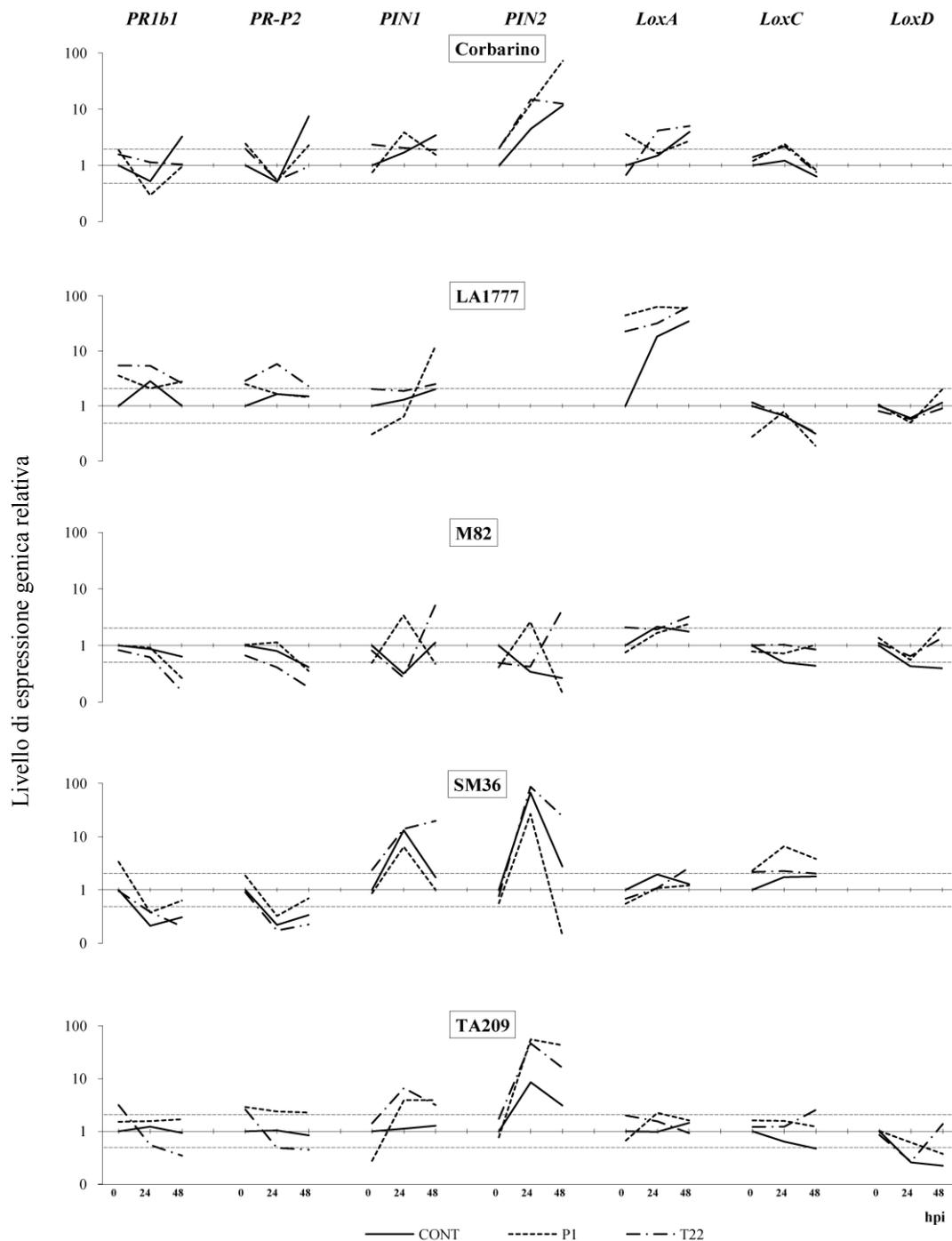


Figura 15. Effetti del trattamento con *Trichoderma* spp. sull'induzione della trascrizione di geni correlati alla difesa in seguito all'inoculazione del patogeno *B. cinerea*. L'attività trascrizionale dei geni *PR1b1*, *PR-P2*, *PIN1*, *PIN2*, *LoxA*, *LoxC* e *LoxD* è stata misurata mediante Real Time qRT-PCR a differenti tempi dopo l'inoculazione con il patogeno *B. cinerea* (0, 24 e 48 hpi) e in foglie distali rispetto al sito di infezione di piante di *S. lycopersicum* (linee Corbarino, M82, SM36 e TA209) e di *S. habrochaites* (linea LA1777), sviluppate da semi trattati con *T. atroviride* P1 (P1), *T. harzianum* T22 (T22) o non trattati (Cont). I livelli di espressione relativa (RQ) di ciascun gene sono riportati in scala semilogaritmica rispetto al controllo non trattato con *Trichoderma* spp. prima dell'inoculazione con il patogeno (0 hpi). I valori entro le linee orizzontali tratteggiate non sono stati considerati significativi ($0,5 < RQ < 2$). I dati di espressione di *PIN2* nella linea selvatica LA1777 sono assenti poiché non c'è stata amplificazione via PCR di questo gene con la coppia di primer in uso. I risultati mostrati sono relativi ad un esperimento rappresentativo dei tre effettuati.

In particolare, nella linea Corbarino, i livelli d'espressione dei geni codificanti per le proteine PR (*PR1b1* e *PR-P2*), attivati come risposta a *Trichoderma* a 0 hpi rispetto al controllo non trattato, hanno mostrato a 24 hpi dall'infezione col patogeno un decremento transiente seguito, a 48 hpi, da un ritorno verso i valori iniziali, tuttavia a livelli inferiori di quelli indotti da *B. cinerea* nel controllo (**Fig. 15**). Relativamente ai geni della via del JA, si osserva in generale un aumento della loro espressione indotto dall'infezione del patogeno, a livelli maggiori rispetto al controllo per *PINI* in seguito al trattamento con P1, per *LoxA* in seguito al trattamento con T22 e per *PIN2* e *LoxC* in seguito al trattamento con entrambe le specie di *Trichoderma* (**Fig. 15**).

Nella linea selvatica LA1777, l'infezione con *B. cinerea* ha indotto a 24 hpi una variazione transitoria dei livelli di espressione dei due geni PR (*PR1b1* e *PR-P2*) in maniera più intensa nelle piante trattate con T22 rispetto ai controlli, mentre a 48 hpi i livelli sono ritornati a valori paragonabili a quelli osservati a 0 hpi (**Fig. 15**). Per quanto riguarda i geni *PIN* e *Lox*, l'infezione del patogeno ha indotto un incremento notevole dell'espressione del gene *PINI* a 48 hpi nelle piante trattate con P1 rispetto al controllo, anche in considerazione del fatto che a 0 e 24 hpi tale espressione risultava essere inibita. Inoltre, la trascrizione del gene *LoxA* è stata fortemente stimolata da *B. cinerea* a 24 e 48 hpi, in misura molto maggiore in presenza sia di P1 sia di T22, rispetto alle piante controllo, mentre non ci sono state variazioni significative dell'espressione dei geni *LoxC* e *LoxD*.

L'infezione con *B. cinerea* della linea M82 ha determinato una diminuzione significativa dei livelli trascrizionali dei geni della via del SA (*PR1b1* e *PR-P2*) a 48 hpi sia nelle piante controllo sia trattate con P1 o T22, in misura più intensa nelle piante trattate con i funghi benefici rispetto ai controlli (**Fig. 15**). A 24 hpi, il patogeno ha indotto una riduzione significativa dell'espressione dei due geni *PIN* nelle piante controllo e

trattate con T22, mentre nelle piante trattate con P1 si osserva un'induzione transiente degli stessi geni. Un andamento opposto presenta l'attività trascrizionale dei due geni a 48 hpi, in quanto si osserva una diminuzione dell'espressione nelle piante trattate con P1 e un aumento nelle piante trattate con T22, molto maggiore di quello osservato nelle piante controllo (**Fig. 15**). Infine, i tre geni *Lox* non hanno mostrato variazioni rilevanti se non tardivamente (48 hpi), che sono risultate significative rispetto al controllo a 0 hpi solo per *LoxA* sia con P1 sia con T22 (**Fig. 15**).

Nella linea SM36, l'infezione con *B. cinerea* ha indotto una diminuzione dei livelli d'espressione, rispetto a 0 hpi, dei geni per le proteine PR (*PR1b1* e *PR-P2*), più intensa a 24 hpi, sia nelle piante trattate con *Trichoderma* sia nei controlli non trattati (**Fig. 15**). Al contrario, i geni PIN hanno mostrato un incremento di espressione molto rilevante a 24 hpi, con livelli che rimangono molto elevati nelle piante trattate con T22 rispetto ai controlli non trattati fino a 48 hpi. I geni *Lox* non hanno mostrato variazioni significative, rispetto al controllo a 0 hpi, eccetto che per l'attivazione di *LoxC* con P1 a 24 e 48 hpi (**Fig. 15**).

L'infezione con il patogeno della linea TA209 ha significativamente inibito l'espressione dei geni PR (*PR1b1* e *PR-P2*) in presenza di T22, mentre ha indotto solo *PR-P2* nelle piante trattate con P1 (**Fig. 15**). I geni PIN (*PIN1* e *PIN2*) sono stati attivati dall'infezione del patogeno con entrambi i ceppi di *Trichoderma* a 24 hpi e fino a 48 hpi, in misura maggiore rispetto al controllo non trattato, mentre si osservano aumenti trascurabili, a 24 e/o 48 hpi, dei livelli di espressione dei geni *Lox*, generalmente superiori nelle piante trattate con *Trichoderma* rispetto ai controlli non trattati (**Fig. 15**).

Dai risultati ottenuti è possibile osservare che i livelli d'espressione dei geni PR, relativi alla via di segnalazione del SA, rilevati in seguito all'infezione con *B. cinerea* e incrociati con le misure delle lesioni necrotiche non sono stati sempre correlabili tra loro ai fini della resistenza al patogeno (**Fig. 14 e 15**). Al contrario, i dati d'espressione dei geni PR

riportati in assenza d'infezione, relativi alla sola interazione con *Trichoderma* spp., hanno mostrato una buona correlazione (**Fig. 13**). È importante notare che l'attivazione di alcuni geni *Lox* e *PIN*, relativamente alla via di segnalazione del JA, è invece quasi sempre associata ad un aumento della resistenza al patogeno mediata da *Trichoderma* (**Figg. 14 e 15**)

Complessivamente, questi risultati indicano che gli effetti benefici che *Trichoderma* spp. hanno sull'espressione sistemica dei geni di difesa di pomodoro durante l'infezione con *B. cinerea*, usato come modello di organismo patogeno, sono molto complessi. Essi sembrano implicare l'attivazione di entrambi i meccanismi di difesa SAR e ISR, con i geni della via di segnalazione del SA che sono attivati a lungo termine da *Trichoderma*, mentre quelli della via del JA subiscono un potenziamento della loro espressione indotta nel corso dell'infezione di un patogeno (*priming*).

Capitolo 4

DISCUSSIONE

Le piante, in quanto organismi sessili, non possono sottrarsi all'esposizione di fattori ambientali avversi (biotici e abiotici) che possono ridurre la vitalità e, quindi, comprometterne la produttività e la sopravvivenza. In conseguenza di ciò, gli organismi vegetali hanno evoluto complessi meccanismi di protezione, tra cui riveste particolare rilevanza la capacità di instaurare interazioni simbiotiche, a livello della rizosfera, con organismi benefici della microflora del suolo che possono esercitare un'azione di potenziamento della risposta di difesa dagli stress e di stimolazione dell'accrescimento e della produttività.

A questo riguardo, durante la presente attività di ricerca è stata studiata la risposta di diversi genotipi di pomodoro, coltivato e selvatico, all'interazione con funghi benefici del genere *Trichoderma*, in termini sia di promozione della crescita sia di attivazione delle risposte di difesa.

4.1. Effetto biofertilizzante in terreno e idroponica

Da qualche tempo è stato accertato che diverse specie di *Trichoderma* sono capaci di instaurare un'interazione simbiotica a livello radicale con numerose specie vegetali, incluso il pomodoro, stimolandone la germinazione, l'accrescimento e la produttività (Chang *et al.*, 1986; Harman *et al.*, 2004a; Windham *et al.*, 1986; Yedidia *et al.*, 2001). Tali funghi benefici realizzano una solubilizzazione di fosforo e di microelementi (Fe, Mg, Mn, Zn) dalla fase solida del suolo attraverso meccanismi complessi (acidificazione, chelazione e riduzione), che portano a maggiore disponibilità e migliore assorbimento di questi nutrienti per la pianta (Altomare *et al.*, 1999; Bae *et al.*, 2009; Benitez *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010; Yedidia *et al.*, 2001). Nelle piante si manifesta, inoltre, un maggior

vigore dovuto a un aumento d'efficienza nella fotosintesi, nell'uso dell'azoto e nella tolleranza agli stress abiotici (Altomare *et al.*, 1999; Harman *et al.*, 2004a; Harman *et al.*, 2004b; Shores *et al.*, 2010). Il meccanismo proposto attualmente per spiegare il fenomeno della promozione della crescita della pianta, in seguito alla colonizzazione delle radici da parte di *Trichoderma*, si può sintetizzare in una combinazione tra (1) azione di biocontrollo diretta contro la microflora deleteria della rizosfera, (2) solubilizzazione di nutrienti minerali altrimenti non disponibili per la pianta, (3) induzione nella pianta di una maggiore capacità di assorbimento di questi nutrienti e (4) produzione di metaboliti ormono-simili ad azione fitostimolante (Benitez *et al.*, 2004; Gravel *et al.*, 2007; Shores *et al.*, 2010).

Con lo scopo di valutare alcuni componenti di questo particolare effetto benefico, il presente studio è stato condotto su diverse linee di pomodoro coltivate in terreno e in soluzione di crescita per idroponica, entrambi sterilizzati in autoclave per escludere i possibili effetti sulla crescita della pianta determinati dal biocontrollo di eventuali microrganismi dannosi. Inoltre, l'ampia e bilanciata disponibilità di nutrienti in coltura idroponica, garantita da un substrato specificamente messo a punto per il pomodoro, ha escluso l'effetto dovuto alla solubilizzazione dei minerali da parte del fungo benefico.

Dai risultati ottenuti per le colture in terreno, è stato possibile notare come la maggior parte delle linee abbia mostrato una risposta a *T. atroviride* P1 opposta rispetto a *T. harzianum* T22 per quanto riguarda lo sviluppo della parte aerea e della radice. Complessivamente, l'effetto sull'accrescimento delle linee in studio si è dimostrato di maggiore entità con T22 per la parte aerea (**Fig. 7** e **Tab. 9**) e con P1 per l'apparato radicale (**Figg. 8** e **9**), ed è risultato, inoltre, essere dipendente dal genotipo della pianta. In entrambi i casi potrebbe essere presente un importante effetto biofertilizzante, dovuto alla solubilizzazione di minerali non immediatamente biodisponibili per la pianta. Relativamente al confronto tra i due ceppi fungini in studio, i nostri risultati confermano le

conclusioni di altri Autori, dimostrando che, per la stimolazione della crescita della parte aerea, il fungo *T. harzianum* T22, un ceppo commerciale di biocontrollo, è più efficace di *T. atroviride* P1, un ceppo finora utilizzato principalmente a scopo scientifico (Vinale *et al.*, 2008b; Woo *et al.*, 2006).

In coltura idroponica, la promozione della crescita da parte di entrambe le specie di *Trichoderma* utilizzate è stata generalmente apprezzabile nei confronti della parte aerea delle piante di pomodoro in studio (**Fig. 10**), mentre è stata poco rilevante nei confronti dell'apparato radicale (**Fig. 11**). Tali risultati indicano che, in condizioni di ampia e bilanciata disponibilità di nutrienti, il maggiore sviluppo della parte aerea indotto da entrambi i ceppi fungini avvenga in maniera indipendente da una maggiore esplorazione del substrato da parte dell'apparato radicale, possibilmente attraverso una stimolazione dell'assorbimento dei nutrienti e/o un diverso bilancio ormonale, mentre non sono rilevanti in coltura idroponica gli effetti dovuti alla solubilizzazione dei minerali. D'altronde, effetti positivi di *T. atroviride* sulla produzione di pomodoro sono stati riportati appunto in coltura idroponica (Gravel *et al.*, 2007).

In terreno e idroponica, entrambi i funghi benefici utilizzati potrebbero produrre molecole ormono-simili ad azione fitostimolante. A questo riguardo, il presente lavoro di ricerca ha consentito di approfondire la conoscenza dei meccanismi esistenti alla base dell'effetto biofertilizzante osservato. I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di attività auxino-simile nei filtrati culturali di entrambe le specie di *Trichoderma* (ceppi P1 e T22) usate in questo studio attraverso il test dei fusticini di pisello (**Fig. 12**), in accordo con la riportata capacità di entrambi i ceppi in studio di rilasciare acido indol-3-acetico (IAA) nel substrato di crescita (Tucci *et al.*, 2011). Altri Autori hanno osservato uno sviluppo dell'apparato radicale di piante di cetriolo in seguito al trattamento con *T. harzianum* T-203, tuttavia in assenza di induzione di IAA nei primi stadi dell'interazione pianta-

Trichoderma (Yedidia *et al.*, 2001). Al contrario, Gravel *et al.* (2007) hanno dimostrato che un isolato non specificato di *T. atroviride* rilascia IAA nel substrato di crescita e hanno suggerito che questa specie potrebbe essere in grado di stimolare in maniera controllata la crescita di piante di pomodoro mediante uno stretto bilanciamento tra sintesi e degradazione di IAA ed Et a livello della rizosfera. Studi più recenti hanno riportato una correlazione tra la stimolazione della crescita della parte aerea e dello sviluppo laterale della radice, indotta da *T. virens* nella specie modello *Arabidopsis*, e la produzione di IAA e composti ad attività auxino-simile da parte del fungo (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Tuttavia, è importante sottolineare che l'IAA agisce sulla crescita della pianta *in toto* in maniera inversamente dipendente dalla dose utilizzata, poiché determina un incremento della crescita soltanto se usato a basse concentrazioni ($\sim 10^{-5}$ M), mentre la reprime a dosi superiori (Vinale *et al.* 2008a; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). La modulazione dell'architettura del sistema radicale potrebbe rappresentare un vantaggio per i PGPF, fornendo una maggiore superficie di approdo disponibile per la colonizzazione fungina, con la conseguenza, vantaggiosa per la pianta, di rendere maggiormente disponibili i nutrienti e di aumentare l'assorbimento di acqua. Ad ulteriore supporto di tali osservazioni, è stato riportato che anche il realizzarsi della simbiosi micorrizica è modulato dalla produzione di auxine di origine fungina, le quali, insieme ad altri fattori, contribuiscono all'adesione delle cellule fungine con quelle vegetali e potrebbero avere un ruolo rilevante nel processo di colonizzazione della radice mediante il superamento delle barriere difensive (Navarro *et al.*, 2006). Complessivamente, l'effetto diretto delle auxine fungine sull'accrescimento della pianta *in toto*, sommato a questi ulteriori vantaggi, potrebbe spiegare l'aumento di biomassa osservato nei nostri esperimenti, particolarmente evidente nelle colture in terreno.

Un'altra interessante ipotesi suggerisce che il potere biofertilizzante di *Trichoderma* sia correlato alla produzione di molecole con attività citochinino-simile (zeatina) e di gibberelline (GA₃), in accordo anche con l'effetto, osservato da alcuni Autori per *Trichoderma* spp., di stimolare la germinazione dei semi attraverso fattori di crescita diffusibili (Windham *et al.*, 1986; Benitez *et al.*, 2004). Infatti le gibberelline hanno un importante ruolo nella germinazione. Poiché le funzioni benefiche di *Trichoderma* spp. sono attualmente considerate alla pari di quelle dei batteri benefici della rizosfera (PGPR), l'esistenza di citochinine prodotte da alcuni PGPR potrebbe confermare l'ipotesi che gli stessi ormoni dei funghi benefici rivestano un importante ruolo nella promozione della crescita delle piante (Ortiz-Castro *et al.*, 2009).

Alla luce delle su menzionate conoscenze, una spiegazione della diversa risposta ai due ceppi fungini dell'apparato radicale rispetto a quella della parte aerea e della variabilità genetica presente in pomodoro nella risposta a *Trichoderma* spp., potrebbe essere la regolazione fine della sintesi di fitormoni antagonisti (auxine/citochinine) da parte del fungo benefico e della pianta. Lo specifico equilibrio ormonale, determinato dall'interazione ceppo fungino-genotipo della pianta, potrebbe infatti essere alla base delle differenze osservate nei nostri esperimenti. Come, ad esempio, la crescita bilanciata della parte aerea (**Figg. 6 e 7**) e dell'apparato radicale (**Figg. 8 e 9**) osservata per la linea TA209 in presenza di P1. Al contrario, uno spostamento dall'equilibrio potrebbe essere alla base degli effetti di P1 sullo sviluppo della radice rispetto al fusto della linea Corbarino e di T22 sullo sviluppo del fusto rispetto alla radice della linea TA209 (**Figg. 7, 8, 9 e Tab. 9**).

Un'ulteriore spiegazione per la stimolazione differenziale della parte aerea e radicale può essere l'appartenenza dei due ceppi in studio (P1 e T22) a diverse specie di *Trichoderma*, essendo noto che gli effetti benefici nei confronti della stessa pianta sono dipendenti dalla specie e dal ceppo di fungo benefico utilizzato, possibilmente a causa

degli effetti di metaboliti secondari prodotti esclusivamente da determinati ceppi fungini (Shoresh *et al.*, 2010; Vinale *et al.*, 2008b). Tra questi composti, *T. atroviride* P1 produce specificamente, e in quantità relativamente elevate, il 6-pentil- α -pirone (6PP), che ha mostrato di possedere azione antibiotica, e, solo di recente, anche un effetto di regolazione dose-dipendente della crescita della pianta, probabilmente di tipo auxino-simile o mediato dall'induzione di auxine (Vinale *et al.*, 2008a). Gli stessi Autori hanno, infatti, mostrato che piante di pomodoro coltivate in terreno, trattate con 6PP (10^{-6} M) mediante aspersione fogliare, sviluppavano notevolmente la parte aerea e l'apparato radicale. Inoltre, il 6PP ha indotto una curvatura positiva nel test dei fusticini di pisello, confermando una sua attività di tipo auxinico (Vinale *et al.*, 2008a). I risultati di questi Autori, anche se ottenuti in condizioni sperimentali diverse dal presente studio, possono contribuire all'interpretazione degli effetti da noi osservati, poiché la produzione ceppo-specifica di 6PP a livello della rizosfera potrebbe spiegare la stimolazione osservata in presenza di P1 dell'apparato radicale.

I dati ottenuti nel presente lavoro di Tesi, per pomodoro in coltura idroponica, sembrerebbero indicare che l'effetto biofertilizzante di *Trichoderma* spp. sia complesso e implichi anche fattori dovuti a differenti condizioni di disponibilità dei nutrienti, qui rappresentate dalle diverse condizioni colturali in terreno e in idroponica. In generale, i nostri risultati confermano quanto riportato da altri Autori, che, quanto maggiore è lo stress idrico e/o la carenza di minerali, tanto maggiore è l'effetto biofertilizzante di *Trichoderma* sulla pianta, al contrario, tale l'effetto appare scarso, perlomeno nei confronti dell'apparato radicale, quanto maggiore è la disponibilità di acqua e nutrienti (Harman *et al.*, 2004a; Harman, 2006; Shoresh *et al.*, 2010).

In definitiva, l'esito dell'interazione pianta-fungo, nella capacità di promuovere una crescita bilanciata delle piante di pomodoro da parte di *Trichoderma*, sembra dipendere da

un meccanismo molto complesso con almeno tre componenti: (1) un'aumentata disponibilità per la pianta ad opera di *Trichoderma* di acqua e nutrienti minerali a livello della rizosfera, altrimenti scarsamente assimilabili; (2) una regolazione fine, da parte del fungo benefico, della sintesi/degradazione di ormoni fitostimolanti e/o composti precursori con attività ormono-simili; (3) un controllo genetico, dipendente dal particolare genotipo della pianta, della regolazione della sintesi/degradazione di ormoni fitostimolanti di origine vegetale e fungina.

Come già accennato, un ulteriore ragguardevole risultato del presente studio è stato l'osservazione dell'esistenza, in pomodoro, di una risposta genotipo-dipendente all'interazione con ciascun ceppo di *Trichoderma* in termini di effetto biofertilizzante in terreno (**Figg. 6-9**) e in idroponica (**Figg. 10 e 11**). Infatti, i nostri risultati hanno dimostrato che P1 può avere anche effetti negativi sulla crescita della parte aerea, ad esempio sulle linee a sviluppo indeterminato Corbarino e LA1777 (**Fig. 7**), mentre T22 ha mostrato anche inibizione sullo sviluppo dell'apparato radicale, ad esempio per le linee M82 e TA209 (**Figg. 8 e 9**). Tali risultati contrastano con quanto concluso da altri Autori, che la componente genetica della pianta non è predominante ai fini di tale interazione benefica, dato che l'effetto biofertilizzante è risultato simile su diverse specie vegetali (Vinale *et al.*, 2008b). Tuttavia, a conferma dei risultati da noi ottenuti, uno studio, condotto in campo su linee e ibridi di mais (*Zea mais*) trattati con *T. harzianum* T22, ha dimostrato che, mentre la maggior parte dei genotipi mostrava gli attesi incrementi di produzione, alcuni genotipi rivelavano importanti riduzioni di produttività (Harman *et al.*, 2004b). Una successiva analisi genetica ha poi permesso di concludere che, in mais, l'effetto biofertilizzante in risposta a *T. harzianum* T22 è sotto il controllo di geni dominanti della pianta (Harman, 2006). I risultati della presente attività di ricerca

dimostrano, quindi, anche in pomodoro, che la risposta a *Trichoderma* spp. in termini di biostimolazione della crescita è sotto controllo genetico.

4.2. Induzione di resistenza sistemica al patogeno

L'attività diretta di biocontrollo nei confronti di numerosi patogeni delle piante presente in alcune specie di funghi appartenenti al genere *Trichoderma* è stata chiaramente documentata. L'antibiosi, il micoparassitismo e la competizione per lo spazio e i nutrienti sono i principali meccanismi che conferiscono, anche sinergicamente, al fungo benefico l'attività biopesticida (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991; Haran *et al.*, 1996). Più di recente, è stato riportato che l'insediamento di questi funghi benefici nella rizosfera, fino a penetrare con le loro ife negli interstizi cellulari dell'epidermide radicale limitandosi ai primi strati corticali, determina anche l'induzione di risposte naturali di resistenza sistemica della pianta alle malattie (Bigirimana *et al.*, 1997; De Meyer *et al.*, 1998; Harman *et al.*, 2004a; Shores *et al.*, 2010; Yedidia *et al.*, 1999, 2000, 2003), con un meccanismo riconducibile alla resistenza sistemica indotta dall'interazione dell'apparato radicale con batteri rizosfera-competenti (PGPR) (Ahn *et al.*, 2007; Hammerschmidt, 1999; Pieterse *et al.*, 2003; van Loon *et al.*, 1998). Similmente, anche altri funghi benefici, dei generi *Gliocladium* e *Penicillium*, hanno un effetto benefico paragonabile a quello indotto dai PGPR. In particolare, i funghi rizosfera-competenti *Trichoderma* spp. inducono protezione contro i patogeni e, nel contempo, promuovono la crescita delle piante (De Meyer *et al.*, 1998; Elad, 2000; Harman *et al.*, 2004a, Yedidia *et al.*, 1999, 2000, 2001, 2003). I nostri risultati confermano la capacità sia di *T. atroviride* P1 sia di *T. harzianum* T22 di limitare in maniera sistemica lo sviluppo delle lesioni necrotiche causate dall'infezione di *B. cinerea* sulle foglie di pomodoro in seguito al loro insediamento nella rizosfera (**Fig. 14**). Questa capacità di *Trichoderma* spp. di stimolare le risposte di difesa

delle piante ospiti nei confronti dei patogeni è stata riportata anche in altre importanti specie commerciali quali cotone, fagiolo, lattuga, peperone e tabacco, oltre che in pomodoro (Chang *et al.*, 1997; De Meyer *et al.*, 1998; Howell *et al.*, 2000; Howell, 2006; Sid Ahmed *et al.*, 2000). A questo proposito, è ormai stato dimostrato che alla base degli effetti positivi osservati nei confronti della pianta c'è l'interazione di *Trichoderma* con l'apparato radicale, che innesca, a livello locale, una serie di modificazioni strutturali e biochimiche (Yedidia *et al.*, 1999, 2000) e, a livello sistemico, un aumento e/o una sintesi *ex-novo* di metaboliti secondari, coinvolti nelle risposte di difesa attive nei confronti dei patogeni, quali terpenoidi (Howell *et al.*, 2000) e capsidiolo (Sid Ahmed *et al.*, 2000). Di conseguenza, questo ulteriore meccanismo di biocontrollo esercitato da *Trichoderma* spp. si manifesta in assenza di un'interazione diretta tra *Trichoderma* e patogeno. La presente attività di ricerca ha inoltre dimostrato che diverse specie di *Trichoderma* hanno capacità diverse di limitare la malattia, con *T. harzianum* T22 risultato più efficace di *T. atroviride* P1. D'altronde, T22, un ceppo commerciale ormai consolidato nell'uso comune, è stato selezionato proprio per i suoi effetti superiori, mentre P1 non è stato selezionato attraverso un processo di selezione altrettanto ampio ed è usato principalmente nella ricerca scientifica. Quest'osservazione conferma quanto riportato da altri Autori, che hanno dimostrato l'efficacia di T22 nell'induzione della crescita e della resistenza a malattie nelle piante, in particolar modo in condizioni di stress (Harman, 2006).

Di particolare importanza, inoltre, è stata l'osservazione di differenze tra le linee di pomodoro in studio anche nella risposta di resistenza indotta da *Trichoderma* spp. nei confronti del patogeno (**Fig. 14**). Nelle fasi iniziali dell'infezione (48 hpi), l'espansione delle lesioni necrotiche causate dal patogeno è stata limitata da T22 in tutte le linee di pomodoro saggiate (**Fig. 14A**). In seguito (96 hpi), T22 ha ridotto significativamente l'area media delle lesioni, rispetto al controllo non trattato con *Trichoderma*, soltanto in TA209 e

Corbarino, due linee abbastanza suscettibili al patogeno (**Fig. 14B**). La risposta a P1, che è risultata essere efficace soltanto in TA209, ha inaspettatamente reso la linea M82 più suscettibile nei confronti del patogeno *B. cinerea* (**Fig. 14**), risultati che ben si correlano con le limitate variazioni dei livelli trascrizionali di geni di difesa osservate in seguito al trattamento con *Trichoderma* (**Figg. 13 e 15**). La linea TA209 è stata l'unica a mostrare una significativa e intensa riduzione dei sintomi della malattia in seguito al trattamento sia con P1 sia con T22.

Questi risultati hanno dimostrato che, in pomodoro, il genotipo della pianta modula l'effetto del trattamento con *Trichoderma* sulla resistenza al patogeno, a conferma che l'induzione di resistenza sistemica, come la promozione della crescita, è dipendente dal genotipo della pianta. In base alle informazioni reperibili in letteratura, nella presente Tesi sono riportati i primi risultati relativi ad un effetto del genotipo della pianta sulla resistenza sistemica indotta da differenti ceppi di *Trichoderma* nei confronti dei patogeni, nonostante che sia stata riportata in precedenti lavori la capacità diretta e indiretta di *T. harzianum* di ridurre significativamente lo sviluppo dei sintomi della malattia in pomodoro e in mais (De Meyer *et al.*, 1998; Dik e Elad, 1999; Harman *et al.*, 2004b; Harman, 2006; O'Neill *et al.*, 1996; Seaman *et al.*, 2003). Inoltre, i risultati qui riportati ben concordano con quelli degli esperimenti in cui è stato dimostrato che il genotipo della pianta influenza l'induzione della resistenza sistemica in risposta ai rizobatteri del tipo PGPR (Liu *et al.*, 1995), che condividono con i PGPF meccanismi molto simili nell'ISR (Segarra *et al.*, 2009).

La linea selvatica LA1777 ha mostrato una risposta eccellente, poiché la notevole resistenza a *B. cinerea* osservabile nel controllo è stata ulteriormente accresciuta dall'interazione con ciascuno dei ceppi di *Trichoderma* (**Fig. 14C**). Tale osservazione potrebbe essere spiegata con una maggiore capacità della specie selvatica di trarre vantaggio dall'interazione simbiotica, perché ecologicamente più adatta a interagire con la

microflora del suolo, in quanto selezionatasi nel tempo in condizioni naturali e in assenza di fertilizzanti artificiali. Similmente, la varietà locale Corbarino, che non ha subito un intenso lavoro di selezione ed è coltivata in condizioni a basso input, ha usufruito in maniera molto positiva dell'interazione con *T. harzianum* T22.

4.3. Espressione di geni di difesa

Nonostante la loro importanza e i numerosi studi a riguardo, i meccanismi attraverso cui le risposte naturali di difesa della pianta sono stimulate sistematicamente a livello della rizosfera con funghi benefici del genere *Trichoderma*, rimangono ancora largamente poco conosciuti. Allo scopo di apportare un contributo alle attuali conoscenze a riguardo, la presente attività di ricerca ha analizzato, nella risposta sistemica della pianta all'interazione con *Trichoderma* spp., i livelli trascrizionali di alcuni geni di pomodoro marcatori specifici della resistenza mediata da SA o da JA/Et (**Tab. 10**): *PR1b1*, marcatore dell'attivazione della SAR e delle risposte mediate da SA; *PR-P2*, principalmente indotto da SA; *PIN1* e *PIN2*, indotti attraverso la via di segnalazione mediata da JA; *LoxA*, *LoxC* e *LoxD*, implicati nella risposta di difesa mediata da JA.

I risultati ottenuti sulle piante trattate con *Trichoderma* (P1 o T22), in assenza di patogeni, confermano che *Trichoderma* è in grado di mantenere attivate le difese sistemiche della pianta, in particolare quelle mediate da SA (**Fig. 13**). Infatti, i geni della famiglia *PR*, marcatori della via di segnalazione di difesa mediata da SA, sono risultati attivati, anche se a livelli trascrizionalmente non molto superiori al controllo, per un periodo temporale relativamente lungo (60 giorni), mentre la risposta mediata da JA non è stata attivata alla stessa maniera, fatta eccezione per *LoxA* in alcune linee. Questi risultati confermano l'esistenza di un meccanismo di difesa sistemica della pianta mediato da SA che può essere attivato e mantenuto in uno stato di allerta nel tempo da *Trichoderma* spp.,

probabilmente attraverso una continua, ma non patogena, stimolazione sostenuta attraverso la via di segnalazione del SA, dovuta all'instaurazione definitiva della simbiosi pianta-fungo, o grazie a una sorta di "memoria" che la pianta conserva dell'interazione iniziale (**Fig. 13**). In parziale accordo con questi risultati, alcuni Autori hanno riportato, durante le fasi precoci della colonizzazione della radice di cetriolo da parte di *T. harzianum* T203 (fino a 72 ore), un'induzione, a livello sia locale (radici) sia sistemico (foglie), delle attività enzimatiche di alcune proteine PR: perossidasi e idrolasi (glucanasi, cellulasi e chitinasi), che tuttavia erano solo transienti (Yedidia *et al.*, 1999, 2000). In accordo con i nostri risultati, gli stessi e altri Autori hanno riportato il potenziamento dell'espressione genica di alcune proteine PR (chitinasi, glucanasi e perossidasi) e l'attivazione trascrizionale del gene *Pall*, più intensa a livello locale (radici) che sistemico (foglie), sempre in assenza del patogeno (Shoresh *et al.*, 2005; Yedidia *et al.*, 2003). Al contrario, la colonizzazione dell'apparato radicale di piantine di cetriolo da parte di *T. harzianum* T203 è stata correlata con l'attivazione dell'espressione genica di difesa della via di segnalazione del JA/Et, a livello sia locale (radici) sia sistemico (foglie), anche se solo in maniera transiente e nei primi momenti dell'interazione (entro le 72 ore) (Shoresh *et al.*, 2005). Tuttavia, questi lavori non hanno esplorato la possibilità di un'attivazione a lungo termine delle difese.

A ulteriore conferma dei nostri risultati nel lungo periodo, un'analisi trascrittomiche di circa 16.000 geni di pomodoro ha dimostrato, dopo cinque settimane dal trattamento con *T. hamatum* 382, l'induzione a livelli non elevati (3-5 volte) di due geni della famiglia *PR5*, codificanti proteine simili all'osmotina considerate marcatori della SAR (Alfano *et al.*, 2007), similmente all'attivazione dell'espressione di 2-5 volte da noi osservata per i geni *PR* oggetto del nostro studio. Gli stessi Autori (Alfano *et al.*, 2007) non hanno osservato nessuna variazione significativa dell'espressione di geni marcatori della via del JA/Et,

analogamente a quanto dimostrato nel presente studio. L'apparente contrasto con i risultati sopra riportati di Shores *et al.* (2005) è probabilmente imputabile alle differenze nei tempi di osservazione utilizzati.

Sulla scorta dei nostri risultati, si può concludere che alla base della risposta di resistenza nei confronti del patogeno necrotrofo *B. cinerea*, indotta in pomodoro da *Trichoderma* spp. (**Fig. 14**), può esservi un fenomeno noto come *priming*, analogamente a quanto osservato in seguito all'interazione con rizobatteri benefici, che si manifesta come un precoce e amplificato innalzamento delle barriere difensive inducibili (Ahn *et al.*, 2007; Conrath *et al.*, 2001, 2002, 2006). Infatti, nel nostro studio, le piante trattate con *Trichoderma* spp. si troverebbero in uno stato di difesa potenziato (*primed*), dimostrato dall'attivazione di alcuni geni *PR* (**Fig. 13**), e quindi in grado di contrastare l'attacco del patogeno attraverso una risposta più rapida e intensa (**Figg. 14 e 15**).

Le conoscenze riguardo alla possibilità che *Trichoderma* possa indurre ISR attraverso il fenomeno del *priming* sono attualmente limitate. Per approfondire ulteriormente quest'aspetto è stata effettuata un'analisi temporale di espressione degli stessi geni in seguito all'inoculazione con il patogeno necrotrofo *B. cinerea* (0, 24 e 48 hpi), che ha dimostrato che i livelli d'espressione dei geni *PR* (*PR1b1* e *PR-P2*), in generale, diminuiscono a 24 hpi per poi aumentare di nuovo a 48 hpi (**Fig. 15**). In cetriolo, è stato invece osservato un potenziamento dell'induzione da parte di un patogeno emibiotrofo di alcuni geni *PR* in seguito al trattamento con *T. harzianum* T203 (Shores *et al.*, 2005). Tuttavia, i risultati di questi Autori si riferiscono a trattamenti con *Trichoderma* e con il patogeno molto ravvicinati tra loro (48 ore), e a specie di pianta ospite e di patogeno diverse da quelle del presente studio, che potrebbero, quindi, portare all'attivazione di una diversa via di segnalazione di difesa (Pieterse *et al.*, 2009). I risultati conseguiti nel presente lavoro di Tesi sono, inoltre, in accordo con i risultati dell'analisi del proteoma di

foglie di fagiolo, in risposta all'interazione con *T. atroviride* P1 a livello radicale e due patogeni fungini, che dimostrano come l'azione dell'antagonista *Trichoderma* determini, qualitativamente e quantitativamente, un'attenuazione della risposta di difesa della pianta al patogeno in termini di sintesi di alcune proteine PR (Marra *et al.*, 2006).

Relativamente ai geni marcatori della via di segnalazione di difesa mediata dal JA (*PIN* e *Lox*), l'attività trascrizionale osservata in seguito all'infezione col patogeno risulta, nella maggior parte delle linee di pomodoro in studio, intensificata da *Trichoderma*, rispetto al controllo, in maniera genotipo-dipendente (**Fig. 15**). Questi risultati confermano che *Trichoderma* è in grado di potenziare le difese inducibili della pianta attraverso un meccanismo di *priming*. A conferma di ciò, è stata osservata una correlazione tra questo potenziamento dei livelli di espressione di geni di difesa da parte di *Trichoderma* (**Fig. 15**) e un rallentamento dello sviluppo delle lesioni necrotiche dovute a *B. cinerea* (**Fig. 14**), rispetto ai controlli non trattati con *Trichoderma*, in particolare nelle linee di pomodoro Corbarino, LA1777 e TA209, tuttavia, non è sempre vero il contrario. Infatti, la linea M82 trattata con P1 ha mostrato un potenziamento, rispetto al controllo non trattato, dell'espressione dei geni *PINI* e *PINII* a 24 hpi, ma non a 48 hpi (**Fig. 15**), accompagnato però da un'aumentata suscettibilità al patogeno (**Fig. 14**).

In definitiva, i risultati ottenuti dimostrano, per la prima volta, che l'interazione con *Trichoderma* è in grado di indurre in pomodoro un potenziamento delle difese che persiste nel lungo termine (60 gg.). Questo potenziamento si estrinseca in un innalzamento costante delle difese mediate da SA e, in seguito all'infezione del patogeno, in un'amplificazione delle difese mediate da JA/Et.

A conferma di questi risultati, l'induzione di entrambe le vie di segnalazione di difesa del SA e del JA/Et è stata osservata anche in altre specie ortive, tassonomicamente separate dal pomodoro, in un fenomeno di difesa locale attivato in risposta a *Trichoderma*

spp. A tal proposito, Martinez *et al.* (2001) hanno dimostrato che l'infiltrazione di cotiledoni di melone con cellulasi isolate da *T. longibrachiatum* ha determinato un'augmentata resistenza all'oidio, correlata ad una complessa co-attivazione delle vie di segnalazione mediate da SA e da JA/Et, che contribuiscono entrambe ad un incremento locale di attività perossidasi e chitinasi. Martinez *et al.* (2001) hanno proposto un modello per interpretare i loro risultati, che prevede l'induzione, da parte della cellulasi attiva di *T. longibrachiatum*, di uno stress ossidativo che, a sua volta, porta ad un accumulo di SA mediato dalla stimolazione dell'attività dell'enzima fenilalanina ammonio liasi (PAL). Il SA a sua volta incrementa ulteriormente l'attività PAL che, mediante un meccanismo a cascata, stimola il metabolismo dei fenilpropanoidi culminando con la sintesi di composti fenolici e con un incremento dell'attività perossidasi e chitinasi. In concomitanza, la stessa cellulasi induce anche un precoce aumento dell'attività lipossigenasi (LOX), che subito dopo risulta nella sintesi e accumulo di JA/Et, stimolando ulteriormente l'enzima PAL e la produzione di composti fenolici (Martinez *et al.*, 2001). Tale parallela attivazione delle due vie di segnalazione è, inoltre, necessaria per indurre una resistenza significativa nei confronti della malattia.

In precedenti studi su pomodoro, il SA era risultato essere un antagonista specifico della via di segnalazione del JA, mediante l'inibizione della sintesi del JA e dell'espressione genica controllata dal JA a livello locale e sistemico (Peña-Cortés *et al.*, 1993). Tuttavia, tale inibizione è stata dimostrata essere transiente, persistendo solo finché era presente SA (Peña-Cortés *et al.*, 1993). Successivamente, è stato anche dimostrato che il SA inibisce in foglie di pomodoro la biosintesi di proteine PIN indotta da JA e da ferita, a valle della sintesi del JA e prima della trascrizione dei geni *PIN* (trasduzione del segnale), mentre il JA non ha mostrato inibire la sintesi di proteine della famiglia PR3, indotte dal SA (Doares *et al.*, 1995). Questi studi suggeriscono pertanto un ruolo del SA nella regolazione

simultanea delle due più importanti vie di segnalazione di difesa delle piante. Un fenomeno simile di inibizione è presente anche nei mammiferi, dove il SA e l'acido acetilsalicilico (aspirina) di origine esogena agiscono da antinfiammatori, attraverso l'inibizione delle reazioni di ossigenazione mediate da ciclossigenasi necessarie alla sintesi delle prostaglandine e dei leucotrieni, eicosanoidi strutturalmente simili al JA. Nel caso qui riportato, la modulazione delle due vie di segnalazione si traduce, nelle piante trattate con *Trichoderma*, in un'inibizione transiente della via del SA preattivata dal simbionte, che consente l'estrinsecarsi del fenomeno del *priming* e quindi un'intensificazione delle risposte di difesa al patogeno necrotrofo *B. cinerea* che in pomodoro sembrano essere mediate da JA/Et (Díaz *et al.*, 2002). Altri Autori hanno già suggerito a riguardo che le vie di segnalazione del SA e del JA/Et costituiscono, poiché interconnesse, una rete di difesa che consente alla pianta di attivare meccanismi diversi in combinazione/successione tra loro per modulare con accuratezza le risposte di difesa a patogeni diversi (Chang *et al.*, 1997; Korolev *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse e van Loon, 1999).

Altri studi hanno suggerito l'esistenza di ulteriori fattori, non ancora noti, ma differenti da SA e JA, nella resistenza indotta in tabacco da *T. longibrachiatum* (Chang *et al.*, 1997). A conferma di ciò, l'acido abscissico (ABA), già noto per la sua funzione nello sviluppo della pianta e come mediatore della risposta a stress abiotici, è stato proposto avere un ruolo nell'induzione di ISR da parte di *Trichoderma* su *Arabidopsis*, attraverso una interconnessione con la via di segnalazione del JA/Et, che rimane comunque la principale via di segnalazione attivata da *Trichoderma*, mentre la resistenza mediata dall'ABA attiva principalmente una risposta di difesa basata sull'accumulo di callosio (Korolev *et al.*, 2008).

In definitiva, sulla scorta delle conoscenze disponibili sopra riportate e dei risultati da noi ottenuti, è possibile supporre che il potenziamento delle risposte di difesa della pianta

mediato da *Trichoderma* dipende dall'attivazione in successione di entrambe le vie di segnalazione del SA e JA/Et, che, come riportato da altri Autori, portano congiuntamente anche all'attivazione del metabolismo dei fenilpropanoidi attraverso l'incremento dell'attività dell'enzima PAL (Martinez *et al.*, 2001; Shoresh *et al.*, 2005; Yedidia *et al.*, 2003).

Un ulteriore rilevante risultato è stato l'osservazione di un'influenza del genotipo di pomodoro sull'espressione dei geni di difesa, correlata al fenomeno dell'ISR dovuto a *Trichoderma* spp. A nostra conoscenza, finora non esistono in letteratura evidenze sperimentali che dimostrano una modulazione della regolazione trascrizionale dei geni di difesa dipendente dal genotipo della pianta in seguito all'interazione con *Trichoderma* spp. I meccanismi alla base delle differenze genotipiche osservate nel presente studio non sono stati indagati, tuttavia si può supporre che possano includere, da parte della pianta, una diversa capacità di promuovere la simbiosi attraverso la colonizzazione della radice, una differente sensibilità a elicitori prodotti dal fungo benefico o agli ormoni implicati nelle vie di trasduzione del segnale, le cui concentrazioni potrebbero essere, inoltre, controllate da *Trichoderma*.

Nel loro insieme, i profili di espressione genica indotti in pomodoro, in seguito all'interazione con *Trichoderma* prima e *B. cinerea* dopo, indicano un complesso meccanismo operato dal fungo benefico nella modulazione dell'attivazione delle singole vie di segnalazione di difesa, che potrebbe essere schematizzato come di seguito:

(1) il trattamento della pianta con *Trichoderma* spp. (*seed coating*), in assenza d'infezione, induce nel lungo periodo un potenziamento dell'espressione dei geni *PR* in studio (*PR1b1* e *PR-P2*), indicativo di un'attivazione della via di segnalazione mediata da SA e del fenomeno del *priming* che potenzierà la risposta di difesa alla malattia;

(2) in seguito al pre-trattamento con *Trichoderma*, l'infezione della pianta con *B. cinerea* riduce l'espressione genica delle proteine PR, indicando una repressione della via di difesa mediata da SA;

(3) il pre-trattamento con *Trichoderma* determina, subito dopo l'infezione con *B. cinerea*, un potenziamento dell'induzione dell'espressione dei geni *PIN* e *Lox* come conseguenza del *priming*, probabilmente attraverso un meccanismo di ISR, attivato ad opera delle reti di difese mediate da SA e da JA.

I risultati ottenuti nel presente studio mostrano, inoltre, che (1) le risposte a lungo termine della pianta a *Trichoderma* in termini di promozione della crescita e di resistenza sistemica al patogeno sono genotipo-specifiche e che (2) i geni di difesa marcatori delle vie di segnalazione mediate da SA e JA presentano, nelle piante che interagiscono con *Trichoderma*, un potenziamento dell'espressione genotipo-dipendente correlato con la resistenza al patogeno (*priming*).

La dimostrazione dell'esistenza di variabilità genetica nella risposta a *Trichoderma* in pomodoro apre il campo a futuri programmi di miglioramento genetico, volti ad ottenere genotipi migliorati nella capacità di interagire con questi organismi benefici della rizosfera.

Un altro importante risultato ottenuto nell'ambito della presente attività di ricerca è stato l'individuazione di due genotipi di pomodoro, Corbarino e TA209, che rispondono più efficacemente all'interazione con *Trichoderma* spp. Al contrario, la linea M82 è stata identificata per aver dato la peggiore risposta al fungo benefico, in termini sia di promozione della crescita sia di induzione di resistenza sistemica, verificata anche attraverso i profili di espressione genica.

Attualmente, nei formulati commerciali si utilizza, in genere, un solo ceppo di *Trichoderma* in combinazione con rizobatteri. La considerazione del differente livello di biostimolazione di ciascuno dei due ceppi (P1 o T22) sulla parte aerea e radicale, consente

di proporre di utilizzare un cocktail formulato con una combinazione delle spore di P1 e T22, anche a differente titolo relativo, che potrebbe indurre nella pianta effetti benefici sinergici per entrambe le parti aerea e radicale, strettamente dipendenti dal ceppo fungino e del genotipo della pianta. Naturalmente, dovranno prima essere eseguiti degli studi per valutare la possibile esistenza di competizione tra i due ceppi di *Trichoderma*.

In futuro, le piante potranno essere trattate più efficacemente con *Trichoderma* per indurre una reazione di sensibilizzazione, che consentirà loro di rispondere più rapidamente e più efficacemente ad un patogeno, con la consapevolezza, a cui hanno contribuito le acquisizioni del presente studio, dell'importanza di tenere in maggiore considerazione la risposta specifica di ciascun genotipo.

Capitolo 5

CONCLUSIONI

La comprensione dettagliata dei meccanismi di base che controllano le risposte delle piante all'ambiente biotico benefico offre la possibilità di potenziarne e/o modularne gli effetti, quali la biofertilizzazione e/o l'induzione di difese naturali. Riguardo ai funghi benefici del genere *Trichoderma*, le conoscenze di tali meccanismi e di come gli effetti benefici indotti dipendano dal genotipo della pianta ospite sono ancora incomplete, nonostante la loro importanza per il miglioramento dell'agricoltura nella direzione dell'eco-compatibilità e della salvaguardia della salute del consumatore. A tal proposito, la presente attività di ricerca è stata rivolta a identificare le basi genetico-molecolari della risposta della pianta, in termini di promozione della crescita e di attivazione delle difese naturali nei confronti di stress biotici.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno dimostrato che:

- (I) la capacità del pomodoro, coltivato e selvatico, di beneficiare dell'interazione con i funghi benefici delle specie *T. atroviride* e *T. harzianum* è genotipo-dipendente, con notevoli differenze relativamente alla promozione della crescita e all'induzione di resistenza sistemica (ISR) contro il patogeno *B. cinerea*;
- (II) la variabilità genetica della risposta di pomodoro alle interazioni complesse *Trichoderma*-pomodoro e *Trichoderma*-pomodoro-patogeno riguarda anche l'attivazione genotipo-dipendente delle vie di segnalazione di difesa della pianta, come dimostrato dai profili trascrizionali di geni correlati alla difesa: geni *PR*, marcatori della risposta SA-mediata, e geni *PIN* e *Lox*, marcatori della risposta JA/Et-mediata;
- (III) l'effetto di *Trichoderma* sulle difese della pianta dai patogeni è molto complesso, in quanto coinvolge sia le vie di segnalazione del SA sia quelle del JA; esso è correlato alla capacità di *Trichoderma* di stimolare nella pianta, in assenza del patogeno,

l'attivazione sistemica e a lungo termine di geni di difesa, come dimostrato dai geni della via di segnalazione del SA e, in seguito all'infezione con *B. cinerea*, di potenziare (*priming*) l'attivazione trascrizionale di geni di difesa contro patogeni necrotrofi, mediata da JA;

(IV) sono state identificate associazioni pianta/antagonista più favorevoli, in particolare tra le linee Corbarino e TA209 e le specie *T. atroviride* o *T. harzianum*, che hanno mostrato le migliori risposte in termini sia di promozione della crescita sia di induzione di risposte di difesa tipo ISR contro il patogeno; tali specifiche combinazioni linea di pomodoro/ceppo di microrganismo benefico potranno essere particolarmente utili per ottenere buoni livelli produttivi con un ridotto uso di fertilizzanti e pesticidi, a vantaggio dell'ambiente e della salubrità dei prodotti agro-alimentari.

Queste nuove acquisizioni contribuiscono alla comprensione dei meccanismi genetico-molecolari attivati *in planta* in seguito all'interazione simbiotica. I risultati ottenuti aprono la strada ad ulteriori studi rivolti all'identificazione dei principali determinanti genetici della pianta coinvolti nell'interazione con *Trichoderma* spp., che potranno portare alla selezione e/o all'ottenimento di nuovi genotipi migliorati con una incrementata capacità di beneficiare della colonizzazione della rizosfera da parte di questi microrganismi benefici.

Capitolo 6

PRODOTTI DELL'ATTIVITÀ DI DOTTORATO

Tucci M., M. Ruocco, **L. De Masi**, M. De Palma e M. Lorito (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4): 341-354. IF (2010): 3.709; ISI JCR Ranking in Plant Sciences: 20/188.

Acciarri N., T. Ciriaci, L. Pulcini, N. Felicioni, F. Fusari, E. Sabatini, G. L. Rotino, L. Frusciante, M. R. Ercolano, A. Barone, L. Monti, M. S. Grillo, S. Grandillo, M. Tucci, M. Cammareri, M. De Palma, I. Massarelli, P. Tripodi, **L. De Masi**, A. Infantino, N. Pucci, G. Tamietti, D. Valentino, M. Davino, S. Davino, N. Pecchioni e M. Barbieri (2010). *Pomodoro da mensa*. In “Progetto di Ricerca per potenziare la competitività di Orticole in aree Meridionali (P.R.O.M.)”, Ed. Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, MiPAAF, p. 1-62, CD-ROM cod. ISBN 978-88-97081-00-5.

Accotto G. P., C. Caruso, M. Catoni, F. Cillo, G. Corrado, **L. De Masi**, M. De Palma, M. R. Ercolano, F. Ferriello, L. Frusciante, M. Lorito, C. Lotti, T. Mascia, S. Pavan, F. Pennacchio, S. Proietti, G. Puopolo, R. Rao, L. Ricciardi, M. Ruocco e A. Zoina (2009). *Geni e network genici coinvolti nell'interazione pomodoro/ambiente biotico*. In Quaderni “Genomica per la valorizzazione di frumento duro e pomodoro”, Supplemento a “I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili” Anno 2009 - Serie VIII - Vol. 6, p. 89-113.

De Masi L., M. Ruocco, M. De Palma, M. Lorito e M. Tucci. *Investigating the role of the plant in the interaction with the facultative symbiont Trichoderma spp.* Proceedings of the 54th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Matera, 27-30 settembre 2010. ISBN 978-88-904570-0-5. Poster Abstract - 4.38.

Ruocco M., M. Tucci, **L. De Masi**, M. De Palma, M. Lorito. *The plant genotype affects the outcome of the beneficial interaction between tomato and selected Trichoderma spp. strains*. Proceedings of the IOBC/WPRS Congress “Biological control of fungal and bacterial plant pathogens”, Graz, Austria, 7-11 giugno 2010, Poster Abstract - 64.

De Palma M., **L. De Masi**, M. Ruocco, M. Lorito e M. Tucci. *Identification of genetic determinants involved in the interaction between tomato and the beneficial organism Trichoderma spp.* Proceedings of the 53rd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Torino, 16-19 settembre 2009. ISBN 978-88-900622-9-2. Poster Abstract - 2.30.

Ruocco M., S. Lanzuise, D. Turrà, M. Reverberi, M. Tucci, **L. De Masi**, F. Vinale, R. Marra, V. Aloy, S. Woo e M. Lorito. *Protein Hytral secreted by Trichoderma plays a key role in induced systemic resistance.* 9th International Congress of Plant Pathology (ICPP), Torino, 24-29 agosto 2008. Abstract in Journal of Plant Pathology, vol. 90 (2, supp.) Agosto 2008.

Ruocco M., **L. De Masi**, M. De Palma, D. Turrà, M. Lorito e M. Tucci. *Tomato genotypes specifically modulate the interactions with beneficial fungi of the genus Trichoderma.* European Plant Science Organisation, 4th EPSO Conference “Plants for Life”, Toulon (Côte d’Azur), France, 22-26 giugno 2008.

De Masi L., M. Ruocco, M. De Palma, D. Turrà, M. Lorito e M. Tucci. *Tomato genotypes respond specifically to Trichoderma treatments.* X *Trichoderma* and *Gliocladium* International Workshop, VII Phytopathology National Congress, II Plant Protection Congress, “Protecting tomorrow’s food supply through today’s research”, San José, Costa Rica, 21-23 maggio 2008.

Capitolo 7

BIBLIOGRAFIA

Acciarri, N. *et al.* (2010). *Pomodoro da mensa*. In “Progetto di Ricerca per potenziare la competitività di Orticole in aree Meridionali (P.R.O.M.)”, Ed. Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, MiPAAF, p. 1-62.

Ahn, I.P., Lee, S.W. e Suh, S.C. (2007) Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 759-768.

Alfano, G., Ivey, M.L., Cakir, C., Bos, J.I., Miller, S.A., Madden, L.V., Kamoun, S. e Hoitink, H.A. (2007) Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97, 429-437.

Altomare, C., Norvell, W.A., Bjorkman, T. e Harman, G.E. (1999) Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295–22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2926-2933.

Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S.H., Strem, M.D., Melnick, R.L. e Bailey, B.A. (2009) The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* 60, 3279-3295.

Bari e Jones (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473-488.

Barone, A., Di Matteo, A., Carputo, D. e Frusciante, L. (2009) High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency. *Current Genomics* 10, 1-9.

Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. e Codon, A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249-260.

Bertini, L., Leonardi, L., Caporale, C., Tucci, M., Cascone, N., Di Berardino, I., Buonocore, V. e Caruso, C. (2003) Pathogen-responsive wheat PR4 genes are induced by activators of systemic acquired resistance and wounding. *Plant Sci.* 164, 1067-1078.

Bigirimana, J., De Meyer, G., Poppe, J., Elad, Y. e Höfte, M. (1997) Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 62, 1001-7.

Budnik, L.T. e Baur, X. (2009) The assessment of environmental and occupational exposure to hazardous substances by biomonitoring. *Dtsch Arztebl. Int.* 106, 91-97.

Caporale, C., Di Berardino, I., Leonardi, L., Bertini, L., Cascone, A., Buonocore, V. e Caruso, C. (2004) Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. *FEBS Letters* 575, 71–76.

Chang, Y.-C., Chang, Y.-C., Baker, R., Kleifeld, O. e Chet., I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 70, 145-148.

Chang, P.-F.L., Xu, Y., Narasimhan, M.L., Cheah, K.T., D'Urzo, M.P., Damsz, B., Kononowicz, A.K., Abad, L., Hasegawa, P.M. e Bressan, R.A. (1997) Induction of pathogen resistance and pathogenesis-related genes in tobacco by a heat-stable *Trichoderma* mycelial extract and plant signal messengers. *Physiologia Plantarum* 100, 341-352.

Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S. e Kohler, A. (2001) Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 113-119.

Conrath, U., Pieterse, C.M.J. e Mauch-Mani, B. (2002) Priming in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7(5), 210-216.

Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. e Mauch-Mani, B. (2006) Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 1062-1071.

Contreras-Cornejo, H.A., Macias-Rodriguez, L., Cortes-Penagos, C. e Lopez-Bucio, J. (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149, 1579-1592.

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. e Hofte, M. (1998) Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104(3), 279-286.

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M. e Pinelli, E. (2010) Effects of pesticides on freshwater diatoms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 203, 87-103.

Díaz, J., ten Have, A. e van Kan, J.A.L. (2002) The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 129, 1341-51.

Dik, A.J. e Elad, Y. (1999) Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 123-137.

Doares, S.H., Narvaez-Vasquez, J., Conconi, A. e Ryan, C.A. (1995) Salicylic-acid inhibits synthesis of proteinase-inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 108, 1741-1746.

Elad, Y. (2000) Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19, 709-714.

Eshed, Y. e Zamir, D. (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141, 1147-62.

- Ferrie, B.J., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowsher, C.G. e Rothstein, S.J. (1994) The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol.* 106, 109-118.
- Feussner, I. e Wasternack, C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 275-297.
- Fidantsef, A.L., Stout, M.J., Thaler, J.S., Duffey, S.S. e Bostock, R.M. (1999) Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54, 97-114.
- Fiocchetti, F., Caruso, C., Bertini, L., Vitti, D., Saccardo, F. e Tucci, M. (2006) Over-expression of a pathogenesis-related protein gene in transgenic tomato alters the transcription patterns of other defence genes. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 81(1), 27-32.
- Frusciante, L., Carli, P., Ercolano, M.R., Pernice, R., Di Matteo, A., Fogliano, V. e Pellegrini, N. (2007) Antioxidant nutritional quality of tomato. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 609-617.
- Gailīte, A., Samsone, I. e Ievinsh, G. (2005) Ethylene is involved in *Trichoderma*-induced resistance of bean plants against *Pseudomonas syringae*. *Acta Universitatis Latviensis* 691, 59-70.
- Ghisalberti, E.L. e Sivasithamparam, K. (1991) Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.* 23(11), 1011-20.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathology* 43, 205-227.
- Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L.H. e Ryan, C.A. (1985a) Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves (I) *J. Biol. Chem.* 260, 6555-60.

- Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L.H. e Ryan, C.A. (1985b) Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves (II) *J. Biol. Chem.* 260, 6561-64.
- Gravel, V., Antoun, H. e Tweddell, R.J. (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39, 1968-1977.
- Hammerschmidt, R. (1999) Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 77-84.
- Hammerschmidt, R. (2011) More insight into how *Botrytis* kills. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72(2), 75.
- Hanson, L.E. e Howell, C.R. (2004) Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 94, 171-176.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. e Chet, I. (1996) Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86(9), 980-85.
- Harman, G.E. (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96, 190-194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. e Lorito, M. (2004a) *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43-56.
- Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A. e Chen, J. (2004b) Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94, 147-153.
- Heitz, T., Bergey, D.R., e Ryan, C.A. (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 114, 1085-1093.

- Hermosa, M. R., Turra`, D., Fogliano, V., Monte, E. e Lorito, M. (2006) Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68, 138-148
- Howell, C.R. (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1), 4-10.
- Howell, C.R. (2006). Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96(2), 178-180.
- Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D. e Puckhaber, L.S. (2000) Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90, 248-52.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., e Zitter, T.A. (1991). Compendium of Tomato Diseases (St. Paul, MN: APS Press).
- Kononowicz, A.K., Nelson, D.E., Singh, N.K., Hasegawa, P.M. e Bressana, R.A. (1992) Regulation of the osmotin gene promoter. *The Plant Cell* 4, 513-524.
- Korolev, N., David, D.R. e Elad, Y. (2008) The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Biocontrol* 53, 667-683.
- Li, X., Xia, B., Jiang, Y., Wu, Q., Wang, C., He, L., Peng, F. e Wang, R. (2010) A new pathogenesis-related protein, LrPR4, from *Lycoris radiata*, and its antifungal activity against *Magnaporthe grisea*. *Mol. Biol. Rep.* 37, 995-1001.
- Linthorst, H.J.M., Danhash, N., Brederode, F.T., Van Kan, J.A.L., De Wit, P.J.G.M. e Bol, J.F. (1991) Tobacco and tomato PR proteins homologous to win and pro-hevein lack the "hevein" domain. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4(6), 586-592.

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

Livak, K.J. e Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402-408.

Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E. e Monte, E. (2010) Translational research on *Trichoderma*: from 'Omics' to the field. *Annu. Rev. Phytopathology* 48, 395-417.

Mandal, S. e Mitra, A. (2007) Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 201-209.

Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S.L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Gigante, S., Turrà, D., Fogliano, V., Scala, F. e Lorito, M. (2006) Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr. Genet.* 50(5), 307-321.

Martinez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M. e Baccou, J.C. (2001) Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol.* 127, 334-344.

Monforte, A.J. e Tanksley, S.D. (2000) Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: A tool for gene mapping and gene discovery. *Genome*, 43:(5) 803-813.

Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. e Wasternack, C. (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140, 249-262.

Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., e Jones, J.D.G. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436-439

O'Neill, T.M., Niv, A., Elad, Y. e Shtienberg, D. (1996) Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 635-643.

Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macias-Rodriguez, L. e Lopez-Bucio, J. (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 4, 701-712.

Peña-Cortés, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E.W. e Willmitzer, L. (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191, 123-128.

Pieterse, C.M., van Wees, S.C., Hoffland, E., van Pelt, J.A. e van Loon, L.C. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8, 1225-1237.

Pieterse, C.M.J. e van Loon, L. C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4(2), 52-58.

Pieterse, C.M.J., van Pelt, J.A., Verhagen, B.W.M., Ton, J., van Wees, S.C.M., León-Kloosterziel, K.M. e van Loon, L. C. (2003) Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis* 35, 39-54.

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. e van Wees, S.C.M. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chem. Biol.* 5(5), 308-316.

Porta, H. e Rocha-Sosa, M. (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol.* 130, 15-21.

Rick, C.M. (1969) Controlled introgression of chromosomes of *Solanum pennellii* into *Lycopersicon esculentum*: segregation and recombination. *Genetics* 62, 753-768.

Ruddiman, W. F. (2003) The anthropogenic greenhouse era began thousands of years ago. *Climatic Change* 61, 261-293.

Rozen, S. e Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S.A. e Misener, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 132, 365-386.

<http://primer3.sourceforge.net>

Rudresh, D.L., Shivaprakash, M.K. e Prasad, R.D. (2005). Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can. J. Microbiol.* 51(3), 217-222.

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y. e Hunt, M. D. (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8, 1809-1819.

Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E. e 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(12), 4364-70.

Seaman, A., Stivers, L., Shail, J. e Price, H. (2003) Efficacy of OMRI-approved products for tomato foliar disease control. *NY State Integr. Pest Manag. Program* 129, 164-167.

Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M.A., Oliveira, E. e Trillas, I. (2007) Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7, 3943-52.

Segarra, G., Van der Ent, S., Trillas, I. e Pieterse, C.M.J. (2009) MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol.* 11, 90-96.

- Shoresh, M., Yedidia, I. e Chet, I. (2005) Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95, 76-84.
- Shoresh, M., Harman, G.E. e Mastouri, F. (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathology* 48, 21-43.
- Sid Ahmed, A., Pèrez Sánchez, C. e Candela, M.E. (2000) Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 817-824.
- Siviero, P. e Bergamini, L. (2001) Le malattie da funghi. In: Le avversità del pomodoro da mensa e da industria. *L'Informatore Agrario*, Supp. n.16, 15-22.
- Spooner, D.M., Peralta, I.E. e Knapp, S. (2005) Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon* 54 (1), 43-61.
- Stasz, T.E., Harman, G.E. e Weeden, N.F. (1988) Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* 80, 141-150.
- Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V. e Vera, P. (1997) Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 624-634.
- Tronsmo, A. (1991) Biological and integrated controls of *Botrytis cinerea* on apple with *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control* 1, 59-62.
- Tucci, M., De Palma, M. e Monti, L. (2010) Applicazioni biomolecolari e genomiche per il miglioramento delle piante ortive. *Italus Hortus* 17(1), 11-31.

Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M. e Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol. Plant Pathol.* 12(4), 341-354.

Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M. e Pieterse, C.M.J. (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70, 1581-88.

Van Kan, J. A. L. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11(5), 247-253.

Van Kan, J.A.L., Cozijnsen, T., Danhash, N. e De Wit, P.J.G.M. (1995) Induction of tomato stress protein messenger-RNAs by ethephon, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylate. *Plant Mol. Biol.* 27, 1205-13.

Van Loon, L.C. e van Kammen, A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40(2), 199-211.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. e Pieterse, C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36,453-83.

Van Loon, L.C., Rep, M. e Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135-62.

Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. e Valero, J.R. (2007) Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* 37, 1-20.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L. e Lorito, M. (2008a) A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72, 80-86.

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

Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 100, 681-697.

Wasternack, C., Stenzela, I., Hauseb, B., Hausec, G., Kuttera, C., Mauchera, H., Neumerkela, J., Feussnerd, I. e Mierscha, O. (2006) The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *J. Plant Physiol.* 163, 297-306.

Windham, M.T., Elad, Y.E. e Baker R. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76, 518-521.

Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M. e Lorito, M. (2006) The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96, 181-185.

Yedidia, I., Benhamou, N. e Chet, I. (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1061-1070.

Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y. e Chet, I. (2000) Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 863-873.

Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y. e Chet, I. (2001) Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235, 235-242.

Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. e Chet, I. (2003) Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas spingae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7343-7353.