UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

FACOLTÀ DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ANIMALI, VEGETALI E DELL'AMBIENTE

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN

"DIFESA E QUALITÀ DELLE PRODUZIONI AGRO-ALIMENTARI E FORESTALI"

XXI CICLO

SETTORE MUR: AGR/12- Patologia vegetale

Isolamento e caratterizzazione di mutanti di *Trichoderma harzianum* ITEM 908 resistenti a sostanze antifungine prodotte da *Fusarium oxysporum*

Tutor:

Dott. Claudio Altomare

Dott. Angelo Visconti

Coordinatore:

Prof. Pasquale Trematerra

Dottoranda:

Dott.ssa Marinella Marzano

Alla mia famiglia

INDICE

RIASSUNTO I
ABSTRACT III
1. INTRODUZIONE 1
1.1 LOTTA BIOLOGICA 2
1.2 MECCANISMI DI AZIONE DEGLI ANTAGONISTI 4
1.3 IL GENERE *TRICHODERMA*: BIOLOGIA E ECOLOGIA 9
1.3.1 IL CONTROLLO BIOLOGICO CON *TRICHODERMA* SPP. 12
1.3.1.1 MECCANISMI D'AZIONE DIRETTI 13
1.3.1.2 MECCANISMI D'AZIONE INDIRETTI 18
1.4 *FUSARIUM OXYSPORUM*: BIOLOGIA ED ECOLOGIA 21
1.4.1 *F. OXYSPORUM* COME AGENTE FITOPATOGENO 23
1.4.2 *F. OXYSPORUM* COME AGENTE DI BIOCONTROLLO 25
1.4.3 METABOLITI SECONDARI PRODOTTI DA *F. OXYSPORUM* 27
1.5 STRATEGIE DI MIGLIORAMENTO DELL'EFFICACIA DI MICRORGANISMI ANTAGONISTI E DEL CONTROLLO BIOLOGICO 31
1.5.1 MUTAGENESI 32
1.5.2 TECNICHE DEL DNA RICOMBINANTE 35
1.6 SCOPO DELLA TESI 37
2. MATERIALI E METODI 40
2.1 ISOLATI FUNGINI UTILIZZATI 40
2.2 SUBSTRATI DI COLTURA UTILIZZATI 42
2.3 SAGGIO DI PATOGENICITÀ DI ISOLATI DI *FUSARIUM* SU POMODORO 45
2.4 CONSERVAZIONE DEGLI ISOLATI 46
2.5 INTERAZIONE TRA *T. HARZIANUM* TH908 E *F. OXYSPORUM* 46
2.5.1 INTERAZIONE IN VITRO (COLTURA DUALE) 47
2.5.2 INTERAZIONE IN VIVO SU GERMINELLI DI POMODORO 48
2.6 PRODUZIONE DI ESTRATTI COLTURALI DI *F. OXYSPORUM* CON ATTIVITA' ANTIFUNGINA 49
2.6.1 PRODUZIONE DI FILTRATI COLTURALI DI *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797 49
2.6.2 ESTRAZIONE DI METABOLITI DA BRODI DI COLTURA DI *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797 50
2.6.3 SAGGIO DI ATTIVITA' ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI DI *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797 SU *G. CANDIDUM* 50

2.6.4 INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI *T. HARZIANUM* TH908 DA PARTE DI METABOLITI PRODOTTI DA *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797 51

2.7 IDENTIFICAZIONE DEI METABOLITI BIOATTIVI PRODOTTI DA *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797 52

2.7.1 ANALISI CROMATOGRAFICA DI ENNIATINA E BEAUVERICINA 52

2.7.2 ANALISI DI ACIDO FUSARICO MEDIANTE TLC 53

2.7.3 QUANTIFICAZIONE DI ACIDO FUSARICO E ACIDO 9,10-DEIDROFUSARICO 53

2.8. INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI *T. HARZIANUM* TH908 DA PARTE DELL'ACIDO FUSARICO 55

2.9 OTTENIMENTO DI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* TH908 DOTATI DI RESISTENZA A METABOLITI DI *F. OXYSPORUM* 55

2.9.1 MESSA A PUNTO DELLE CONDIZIONI DI MUTAGENESI 55

2.9.2 SELEZIONE DEI MUTANTI RESISTENTI 56

2.10 INTERAZIONE IN VITRO TRA I CEPPI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* TH908 E *F. OXYSPORUM* (COLTURA DUALE) 58

2.11 VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE FISIOLOGICHE DEI MUTANTI: COMPETENZA PER LA RIZOSFERA 59

2.12 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTAGONISTICA DEI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* IN VIVO 61

2.13 ANALISI DI ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELLA MULTI DRUG RESISTANCE (MDR) IN *T. HARZIANUM* 63

2.13.1 CONDIZIONI COLTURALI 63

2.13.2 ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI 64

2.13.3 RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR) E REAZIONI DI AMPLIFICAZIONI 65

2.13.4 SEQUENZIAMENTO E ANALISI DELLE SEQUENZE 66

2.14 STATISTICA 67

3. RISULTATI 68

3.1 SAGGIO DI PATOGENICITÀ DI ISOLATI DI *FUSARIUM* SU SEMI GERMINANTI DI POMODORO 68

3.2 INTERAZIONE TRA *T. HARZIANUM* TH908 E *F. OXYSPORUM* 70

3.2.1 INTERAZIONE IN VITRO (COLTURA DUALE) 70

3.2.2 INTERAZIONE IN VIVO SU GERMINELLI DI POMODORO 72

3.3. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI COLTURALI DI *F. OXYSPORUM* 75

3.3.1 SAGGIO DI ATTIVITA' ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI DI FOFT2 E FO2797 SU *GEOTRICHUM CANDIDUM* 75

3.3.2 INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI *T. HARZIANUM* TH908 DA PARTE DI METABOLITI PRODOTTI DA *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797 77

3.4. IDENTIFICAZIONE DEI METABOLITI BIOATTIVI PRODOTTI DA *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797 80
3.4.1 ANALISI CROMATOGRAFICA DI ENNIATINA E BEAUVERICINA 80
3.4.2 ANALISI DI ACIDO FUSARICO MEDIANTE TLC 81
3.4.3 QUANTIFICAZIONE DI ACIDO FUSARICO E ACIDO 9,10-DEIDROFUSARICO 81
3.5 INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI *T. HARZIANUM* TH908 DA PARTE DELL'ACIDO FUSARICO 82
3.6 OTTENIMENTO DI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* TH908 DOTATI DI RESISTENZA A METABOLITI DI *F. OXYSPORUM* 84
3.6.1 MESSA A PUNTO DELLE CONDIZIONI DI MUTAGENESI 84
3.6.2 SELEZIONE DEI MUTANTI RESISTENTI 85
3.7 INTERAZIONE IN VITRO TRA I CEPPI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* TH908 E *F. OXYSPORUM* (COLTURA DUALE) 88
3.7.1 INIBIZIONE DELL'ACCRESCIMENTO DELLE COLONIE DI *T. HARZIANUM* .. 88
3.7.2 INTERAZIONE MICELICA DEI FUNGHI POSTI A CONFRONTO 89
3.8. VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE FISIOLOGICHE DEI MUTANTI: RHIZOSPERE COMPETENCE 92
3.9 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTAGONISTICA DEI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* IN VIVO 95
3.10 ANALISI DI ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELLA MULTI DRUG RESISTANCE (MDR) IN *T. HARZIANUM* 98
3.10.1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO E REAZIONI DI AMPLIFICAZIONE ... 99
3.10.2 ESTRAZIONE DELL'RNA, RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR) E REAZIONI DI AMPLIFICAZIONI 100
4. DISCUSSIONE 104
5. CONCLUSIONI 119
6. ABBREVIAZIONI UTILIZZATE 121
7. BIBLIOGRAFIA 122
RINGRAZIAMENTI .....

RIASSUNTO

La lotta biologica mediante l'impiego di funghi antagonisti è un utile mezzo di difesa delle colture agrarie da agenti fitopatogeni fungini. Il fungo antagonista *Trichoderma harzianum* viene impiegato efficacemente per contrastare l'azione di funghi fitopatogeni terricoli come *Pythium* spp., *Sclerotinia* spp. e *Rhizoctonia* spp. Risultati meno soddisfacenti si sono avuti nel controllo di *Fusarium oxysporum* ff.sp. Ciò è dovuto alle forti attitudini competitive di *F. oxysporum* che, almeno in parte, dipendono dalla produzione di sostanze antimicrobiche che assicurano al fungo un vantaggio competitivo nell'ambito delle biocenosi del terreno. Obiettivo di questo lavoro di tesi è stato il miglioramento della tolleranza dell'isolato *T. harzianum* ITEM 908 (Th908) all'azione di metaboliti antifungini di *F. oxysporum*. Ciò al fine di **I)** migliorare le prestazioni antagonistiche del ceppo Th908 nei confronti di forme fitopatogene di *F. oxysporum* e **II)** rendere possibile l'uso combinato del ceppo Th908 con ceppi di *F. oxysporum* non patogeni per colture agrarie e utilizzati come agenti di biocontrollo. E' stata investigata la produzione di metaboliti bioattivi da parte di due isolati di *F. oxysporum*, di cui uno fitopatogeno (Fo2797) e l'altro impiegato come micoerbicida (FoFT2), mediante TLC e HPLC. L'acido fusarico (AF) e il suo analogo acido 9,10-deidrofusarico (ADF) sono stati identificati come i principali metaboliti bioattivi di entrambi gli isolati (Fo2797:AF=46 mg/ml, ADF=151 mg/ml;FoFT2: AF=51 mg/ml, ADF=34 mg/ml). Sia l'AF che gli estratti organici dei brodi colturali di Fo2797 e FoFT2 mostravano una forte attività d'inibizione verso Th908. L'attività antifungina di AF, generalmente considerata una fitotossina, è qui riportata per la prima volta. Allo scopo di generare mutanti di Th908 migliorati nella tolleranza ai metaboliti antifungini di Fo2797 e FoFT2, conidi di Th908 sono stati esposti a irraggiamento con UV-C. La sucessiva selezione, condotta su oltre 300 mutanti utilizzando substrati arricchiti con AF o estratti colturali di FoFT2, ha consentito di selezionare due mutanti (Th908-5 e Th908-81) dotati di migliorata resistenza ai metaboliti bioattivi e la cui mutazione è risultata stabile nel tempo. Successive indagini di tipo eco-fisiologico hanno escluso variazioni

peggiorative di importanti caratteristiche, quali la competenza per la rizosfera e la capacità di diffusione nel terreno, rispetto al ceppo selvatico (Th908-wt). I nuovi biotipi mostravano inoltre una maggiore competitività nei confronti degli isolati di *F. oxysporum* in colture duali. Quando saggiati in vivo su germinelli di pomodoro, il mutante Th908-5 è risultato più efficace di Th908-wt e del mutante Th908-81 nel contrastare l'effetto patogenico di Fo2797, riducendo del 40% ($p<0,05$) la mortalita delle piantine causata da Fo2797. Inoltre, l'azione di Th908-5 non è stata ridotta da FoFT2, dimostrando la compatibilità dei due funghi. Infine, è stata indagata la base genetica della resistenza acquisita dai nuovi biotipi attraverso l'analisi dell'espressione di 5 geni, codificanti proteine transmembrana potenzialmente coinvolte nella polichemioresistenza (MDR) di *T. harzianum*, mediante RT-PCR. In risposta all'AF, il gene putativamente codificante la proteina Multidrug resistance protein B è risultato espresso in maniera differenziale nei due mutanti, permettendo così di ipotizzare una possibile implicazione in tale fenomeno.

ABSTRACT

The use of fungal antagonists is regarded as an effective mean of control of soil-borne plant pathogens. *Trichoderma harzianum* is a well-known fungal antagonist that has been shown to be an effective biological control agent (BCA) against *Pythium* spp., *Sclerotinia* spp., *Rhizoctonia* spp. and *Fusarium* spp. The biological control of *Fusarium oxysporum* ff. spp. by *T. harzianum* has been less successful. Probably, this is due to the highly competitive nature of *F. oxysporum*, at least in part related to the production of antimicrobial compounds used as weapons within the soil microbial consortium. The aim of this work was to improve the tolerance of the antagonistic strain *T. harzianum* ITEM 908 (Th908) to antifungal metabolites produced by *F. oxysporum*, in order to **I)** improve the antagonistic performance of Th908 against phytopathogenic *F. oxysporum* strains; **II)** enhance the compatibility between Th908 and non pathogenic strains of *F. oxysporum* used as BCA. The production of bioactive metabolites by two *F. oxysporum* strains, a phytopathogenic strain (Fo2797) and a mycoherbicidal strain (FoFT2), was investigated by TLC and HPLC. Fusaric acid (FA) and its analogous 9,10-Dehydrofusaric Acid (DHFA) were identified as the major bioactive compounds produced by the analysed strains (Fo2797:AF=46 mg/ml, ADF=151 mg/ml;FoFT2: AF=51 mg/ml, ADF=34 mg/ml). Both FA and culture extracts of Fo2797 and FoFT2 showed a strong inhibitory effect towards Th908. This is the first report of the antifungal activity of FA. In order to generate mutants of Th908 resistant to antifungal metabolites of Fo2797 and FoFT2, a UV-mutagenesis strategy was used. Among 300 presumptive UV-C mutants isolated, two mutants (Th908-5 e Th908-81), which bore stable mutation, were resistant to AF and FoFT2 organic extracts. Further, eco-physiological investigations did not show any detrimental effects of mutation with regard to rhizosphere competence and soil colonization capability of the new biotypes, compared to the wild type strain (Th908-wt). In addition, in dual culture assays both mutants were more competitive than Th908-wt to *F. oxysporum*. When tested in vivo on

tomato germlings, Th908-5 showed a greater biocontrol efficacy than Th908-wt and Th908-81. Th908-5 was able to reduce by 40% ($p<0,05$) the germling mortality caused by the pathogenic strain Fo2797. At the same time the mutant was compatible with the non pathogenic strain of *F. oxysporum* (FoFT2). Finally, the genetic basis of mutants' acquired tolerance to antifungal metabolites of *F. oxysporum* was studied by a RT-PCR gene expression analysis of 5 genes coding for proteins putatively involved in Multi Drug Resistance (MDR) of *T. harzianum*. In response to the exposure to FA, the mutants showed a differential expression of the gene putatively coding for the Multi drug resistance protein B, suggesting the involvement of this gene in the resistance of *T. harzianum* to FA.

1. INTRODUZIONE

A partire dalla metà del XX secolo, con la cosiddetta "Green Revolution", l'agricoltura è andata incontro ad un radicale cambiamento caratterizzato dall'abbandono progressivo delle tradizionali tecniche di coltivazione e dall'adozione di un insieme di tecniche colturali e mezzi tecnici più moderni, che prevedono un uso intensivo di fertilizzanti chimici e fitofarmaci di sintesi. Ciò, se da una parte ha consentito un aumento delle rese e il miglioramento delle condizioni fitosanitarie delle colture, dall'altra ha determinato non pochi effetti indesiderabili sull'ambiente e sulla salute umana. Basti pensare alll'inquinamento delle falde acquifere per lisciviazione, alla modificazione della flora infestante e alla presenza di residui di principi attivi tossici negli alimenti (Matta, 1996). Inoltre, il diffuso impiego di pesticidi, in particolare benzimidazoli e altri principi attivi con meccanismo d'azione altamente specifico, ha posto all'attenzione dei patologi vegetali il problema della rapida insorgenza di fenomeni di resistenza nelle popolazioni dei patogeni (Garibaldi e Gullino, 1987; Goldman et al., 1994; Naseby et al., 2000).

In questo scenario ricco di rapidi cambiamenti e nuove problematiche, l'attenzione da parte dell'opinione pubblica e della comunità scientifica è sempre più rivolta alla riduzione dei potenziali rischi ambientali e sanitari legati all'impiego di sostanze chimiche in agricoltura (Hjeljord e Tronsmo, 1998). Da qui l'interesse per forme di agricoltura aventi minore impatto ambientale (Cook e Granados, 1991; Lorito et al., 1994).

Una possibile alternativa alla lotta chimica per la difesa delle colture agrarie da fitopatie, parassiti e altre avversità biotiche, è rappresentata dalla lotta biologica, basata principalmente sull'impiego di pesticidi biologici (fungicidi, erbicidi e insetticidi microbici, nematodi entomopatogeni, virus, insetticidi e sostanze semiochimiche derivanti da piante). Nonostante gli indubbi vantaggi che potrebbero derivare da un suo più largo impiego, la lotta biologica è ancora poco diffusa, anche a causa dell'incostanza dei risultati. Tale incostanza può essere imputata

all'influenza dall'ambiente in cui gli agenti di biocontrollo (Biological Control Agent, BCA) si trovano ad operare e che di volta in volta può risultare favorevole al patogeno o al suo antagonista, ma anche all'efficacia, a volte modesta, di alcuni BCA (Whipps e Lumsden, 2001). Ne consegue che nel confronto con i composti organici di sintesi, i biopesticidi appaiono spesso perdenti. Infatti, a fronte di alcuni innegabili vantaggi dei composti di sintesi (effetto rapido, efficacia anche in fase post-infezionale, ampio spettro d'azione e maggiore facilità di preparazione ed applicazione), i biopesticidi mostrano alcuni limiti, quali l'efficacia inferiore in alcune condizioni ambientali, la lentezza nel produrre gli effetti desiderati, l'uso esclusivamente preventivo, la minore conservabilità (shelf-life), nonchè conservazione e applicazione più difficoltose. In termini economici, tali aspetti si traducono in uno svantaggio diretto per l'utilizzatore, che è costretto ad acquistare più prodotti per combattere diversi agenti fitopatogeni altrimenti controllabili con un singolo prodotto chimico, e in uno svantaggio indiretto dovuto alla necessità di effettuare un numero maggiore di trattamenti e di attrezzarsi per una conservazione e un'applicazione corretta dei biofitofarmaci.

Alla luce di queste considerazioni, molte ricerche mirano attualmente a migliorare le prestazioni dei BCA da impiegare come biopesticidi cercando di individuare soluzioni innovative che, partendo da una conoscenza più approfondita dei meccanismi fisiologici e molecolari dell'interazione dei diversi organismi coinvolti (pianta, agente patogeno/parassita e BCA), aumentino l'efficacia e amplino lo spettro d'azione dei BCA.

1.1 LOTTA BIOLOGICA

La lotta biologica viene definita l'insieme delle misure che influiscono negativamente, anche in modo indiretto, sull'attività dei parassiti mediante l'intervento di organismi non compresi nel binomio ospite-parassita (Matta, 1996). In particolare, in patologia vegetale tale metodo ha come obiettivo la riduzione degli attacchi di microrganismi patogeni

attraverso l'impiego di altri microrganismi, chiamati antagonisti, in grado di contrastarli ed il chiarimento dei complessi rapporti ecologici e biochimici che sono alla base di tale fenomeno (Matta, 1996).

Le prime applicazioni di lotta biologica risalgono ai primi anni del novecento e, più precisamente al 1919, quando l'entomologo H. S. Smith propose l'introduzione artificiale di insetti esotici parassiti o predatori per contenere l'espansione di insetti dannosi (Doutt, 1964). Da quel momento l'interesse nei confronti della lotta biologica si è allargato e diversi autorevoli studiosi hanno cercato di definire meglio il concetto e gli obiettivi della lotta biologica, senza peraltro mai raggiungere univocità di pareri. De Bach (1964) definì la lotta biologica una pratica atta a favorire "*l'azione dei parassiti, dei predatori o dei patogeni nel mantenere la densità di popolazione di un altro organismo ad un livello più basso di quello che essa avrebbe in assenza di questi*". Questo concetto "classico" di lotta biologica, che bene si applicava alla lotta contro gli insetti dannosi, si è nel tempo molto evoluto ed ampliato, determinando anche la rivisitazione del nome lotta biologica in controllo biologico o biocontrollo. Cook e Baker, nel 1983, intesero il biocontrollo come "*la riduzione della densità di inoculo o delle attività patogeniche del patogeno ottenuta per mezzo di uno o più organismi diversi dall'uomo"* (Cook e Baker, 1983). Dopo alcuni anni l'Accademia Nazionale della Scienza degli Stati Uniti (1987) rielaborò il concetto, inglobando nella definizione di lotta biologica anche le pratiche di lotta agronomica e l'applicazione delle moderne tecniche di biologia molecolare per lo sviluppo di nuove biotecnologie. In base a tele criterio la lotta bilogica è definita come "(l') *utilizzo di organismi naturali o modificati, di geni o prodotti genici, atti a ridurre gli effetti degli organismi indesiderati, e per favorire quelli utili all'uomo, alle coltivazioni, agli animali e ai microrganismi simbionti".*

Per convenzione, la lotta biologica ai patogeni delle piante, può essere realizzata attraverso tre strategie (Gabriel e Cook, 1990):

1. contenimento della popolazione patogena mediante interventi sul suolo o sull'ambiente miranti a favorire la naturale soppressività;

2. sfruttamento della resistenza della pianta ospite che si esplica attraverso meccanismi di natura meccanica e biochimica;
3. esclusione dell'infezione attraverso trattamenti con microrganismi antagonisti.

In generale, il successo del controllo biologico richiede non solo lo studio del potenziale agente antagonista, ma anche la conoscenza delle complesse interazioni ecologiche che si instaurano tra la pianta, l'agente patogeno, la microflora naturale e l'ambiente in genere.

L'impiego di funghi antagonisti per contenere malattie causate da funghi fitopatogeni rappresenta uno tra i più diffusi esempi di lotta biologica, che trova applicazione sia contro malattie radicali che contro patogeni della parte aerea delle piante. Tra gli agenti fitopatogeni più dannosi (responsabili nel complesso di circa il 70% delle principali malattie delle colture agrarie secondo Deacon, 1997), per i quali esistono interessanti applicazioni di lotta biologica, si annoverano specie appartenenti ai generi *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Sclerotinia* e *Fusarium*.

1.2 MECCANISMI DI AZIONE DEGLI ANTAGONISTI

Un antagonista è un microrganismo, batterio o fungo, in grado di contrastare un patogeno bersaglio, andando ad interferire con il suo ciclo vitale (Baker e Cook, 1974). Nonostante le modalità attraverso cui i microrganismi antagonisti attaccano gli agenti patogeni non siano sempre del tutto chiare, i meccanismi d'azione ad oggi individuati sono molteplici. Tali meccanismi possono essere distinti in meccanismi diretti ed indiretti. I meccanismi diretti sono quelli che operano nell'ambito dell'interazione antagonista-patogeno e comprendono: il parassitismo, l'antibiosi e la competizione per spazio e nutrienti. Tra i meccanismi indiretti, invece, vengono incluse tutte quelle modificazioni morfologiche e biochimiche elicitate nella pianta ospite dall'agente antagonista e che si traducono in una maggiore resistenza della pianta a stress abiotici e biotici. Nessuno di questi meccanismi esclude l'altro ed è anzi più frequente che l'agente di

biocontrollo esplichi la sua attività antagonistica impiegando diversi metodi di azione. La capacità di esprimere un determinato meccanismo nel complesso processo del biocontrollo da parte di un isolato antagonistico può infatti variare al variare del patogeno, dall'ospite e dalle condizioni ambientali, in particolare disponibilità di nutrienti, ph e temperatura (Benitez et al., 2004; Vinale et al., 2008).

Il parassitismo è correlato alla capacità di un antagonista di vivere in intima associazione con un altro microrganismo dal quale trae le sostanze nutritive. L'interazione dell'antagonista con il patogeno bersaglio si realizza attraverso il susseguirsi di fasi distinte: localizzazione, riconoscimento, contatto e penetrazione, ed acquisizione del nutrimento a spese dell'organismo parassitizzato. Nel caso di antagonisti fungini si parla più specificamente di micoparassitismo. In questo processo, durante la fase di contatto e penetrazione, giocano un ruolo chiave sia enzimi litici quali chitinasi, glucanasi e proteasi, capaci di degradare la parete cellulare dell'ospite, sia gli antibiotici prodotti dagli antagonisti (Elad et al, 1982; Woo e Lorito, 2007; Dos Reis Almeida et al., 2007). A seconda del danno provocato a carico del proprio ospite, i micoparassiti vengono distinti in necrotrofici e biotrofici. I necrotrofici, stabilito il contatto con l'ospite, ne determinano la morte, invadendo le cellule ed utilizzando le sostanze nutritive liberate dalle ife colpite (Kendrick, 1992). I biotrofici, invece, stabiliscono un contatto persistente ed un'occupazione della cellula ospite che continua a rimanere viva. Tra i funghi micoparassiti, oltre a numerose specie di *Trichoderma*, considerate per lo più micoparassiti necrotrofici, ricordiamo anche quelli appartenenti ai generi *Chaetomium*, *Coniothirium*, *Gliocladium, Pythium* e *Fusarium*.

Anche l'antibiosi riveste un ruolo importante nell'azione che gli antagonisti esplicano nei confronti dei patogeni. Per antibiosi si intende la produzione di sostanze antibiotiche o metaboliti tossici che esplicano un'azione dannosa su un altro microrganismo, determinando l'inibizione di importanti funzioni metaboliche, della crescita o la morte dello stesso (Cook e Baker, 1983; Howell et al., 1983; Simon et al., 1988; Dunlop et al., 1989; Harman, 2000). Tali metaboliti possono essere composti a

basso peso molecolare oppure macromolecole, come enzimi extracellulari, e possono essere volatili e non (Fravel, 1988; Weller, 1988). La loro funzione biologica è quella di favorire la colonizzazione di una particolare nicchia ecologica da parte del microrganismo produttore a scapito dei microrganismi competitori. I funghi antagonisti hanno dimostrato di essere capaci di produrre un'ampia varietà di sostanze antibiotiche, direttamente coinvolte nei meccanismi di controllo delle malattie delle piante. Ad esempio, la gliovirina e la gliotossina prodotte da *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) Arx sono risultate attive contro *Pythium ultimum* Trow e *Rhizoctonia solani* Kuhn (Wilhite et al., 1994) mentre la cheatomina prodotta dal genere *Chaetomium* è risultata responsabile del controllo di *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderhold, agente della ticchiolatura del melo (Davis et al., 1992).

Il controllo biologico da parte degli antagonisti può realizzarsi anche attraverso la competizione per spazio e nutrienti. Cook e Baker (1983) hanno definito la competizione come "*il tentativo di due o più microrganismi di utilizzare quantità adeguate di un fattore vitale, nella forma e nelle condizioni specifiche in cui il fattore è presente, quando la quantità disponibile non è sufficiente per entrambi*". La competizione tra microrganismi avviene principalmente per fattori nutrizionali (carboidrati, azoto, ferro, fattori di crescita), ma anche per lo spazio (siti di ingresso della pianta) e per l'ossigeno (Faull, 1988). Tale fenomeno è strettamente correlato alla capacità degli antagonisti di adattarsi ed essere attivi in svariate condizioni ambientali (pH, temperatura e umidità), capacità che favorisce la rapida colonizzazione dei siti d'interazione tra antagonista e agente patogeno (rizosfera, filloplano, siti d'infezione) con la conseguente formazione una vera e propria barriera biologica all'invasione da parte dei patogeni (Cook, 1988). Un importante esempio di competizione per i nutrienti è fornito da alcuni antagonisti, in grado di sequestrare il ferro presente nel terreno anche in condizioni estreme, come per esempio a bassi valori di pH, rendendolo indisponibile per gli altri microrganismi. Ciò avviene grazie alla dotazione di alcuni BCA di un sistema di assimilazione del ferro altamente efficiente, basato sulla

produzione di siderofori (molecole con un sito di legame selettivo per il ferro) e sul trasporto all'interno della cellula mediante una proteina di trasporto (carrier) specifica (Renshaw et al., 2002*)*. La competizione per carbonio, azoto, e ferro, sembra essere alla base del biocontrollo di *Fusarium* spp. da parte di isolati di *Trichoderma* spp. e ceppi non patogeni di *Fusarium* spp. (Mandeel e Baker, 1991; Couteaudier, 1992). La competizione per siti d'infezione sembra invece essere il meccanismo d'azione di ceppi non patogeni di *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen, capaci di ridurre la colonizzazione delle radici da parte di isolati patogeni della stessa specie (Schneider, 1984; Mandeel e Baker, 1991; Eparvier e Alabouvette, 1994).

Come accennato in precedenza, i BCA possono esplicare la loro azione anche inducendo un sostanziale cambiamento nella fisiologia della pianta ospite, che si traduce nell'aumento della capacità di difesa nei confronti dei patogeni e, conseguentemente, nella riduzione dell'incidenza e della gravità delle malattie (Vinale et al., 2008; Van Wees et al., 2008). Infatti, alcuni antagonisti sono in grado di modulare i meccanismi di difesa delle piante, inducendo l'attivazione della risposta ipersensibile (Hypersensible response, HR) e della resistenza sistemica indotta (Induced Systemic Resistance, ISR) (Lanzuise, 2005). Alcune piante, a seguito della continua minaccia da parte dei microrganismi patogeni e dei continui trattamenti con pesticidi chimici, hanno sviluppato costitutivamente un sistema di difesa in grado di prevenire l'invasione e/o l'attacco dei loro tessuti (Harman et al., 2004). L'attivazione della HR nella zona di infezione, caratterizzata dalla formazione di aree necrotiche e dalla conseguente riduzione della crescita e dello sviluppo dei patogeni biotrofi, rappresenta una delle più importanti risposte della pianta all'invasione microbica. Una volta attivata la risposta localizzata nei siti d'infezione, generalmente si sviluppa quella che viene definita la resistenza sistemica acquisita (Systemic Aquired Resistance, SAR) nei confronti di successive infezioni da parte dello stesso o di altri patogeni (Kothari e Patel, 2004). Alla base di questo processo, sembrano esserci molecole segnale come l'acido salicilico o l'acido jasmonico, le quali,

insieme con etilene e ossido di azoto, attivano una cascata di eventi biochimici che portano alla produzione di numerosi metaboliti e proteine, tra cui fenoli, specie reattive dell'ossigeno (ROS), fitoalessine, sesquiterpeni e proteine legate alla patogenesi (Pathogenesis Related Protein, PR Protein), con svariate funzioni biologiche (Harman et al., 2004). Una di queste è la capacità di inibire il patogeno. E' stato dimostrato che la resistenza sistemica nelle piante può essere indotta anche in seguito alla colonizzazione delle radici da parte di microrganismi non fitopatogeni come i BCA (Walters e Daniell, 2007). In questo caso si parla di ISR ed alla base di tale fenomeno vi è il rilascio da parte degli antagonisti di molecole segnale (elicitori) in grado di generare nella pianta una cascata di eventi assimilabili a quelli descritti in precedenza. Per esempio, diversi studi attestano la capacità di *Trichoderma* spp. di produrre, nel corso dell'interazione con la pianta, differenti classi di metaboliti che agiscono da elicitori, ovvero da induttori di resistenza (Vinale et al., 2008). Tali molecole comprendono proteine con attività enzimatica (es. xylanasi), prodotti genici di avirulenza, e composti a basso peso molecolare rilasciati dalle pareti cellulari del fungo o della pianta in seguito all'azione degli enzimi di *Trichoderma* spp. (Vinale et al., 2008). Altri esempi di resistenza indotta da microrganismi antagonisti sono noti con riferimento a isolati fungini non patogeni di *Rhizoctonia* spp., *Penicillum* spp., *Phoma* spp., *Fusarium* spp. (Hwang e Benson, 2003; Koike et al., 2001; Duijff et al., 1998; Benhamou et al., 2002) e ad alcuni ceppi batterici dotati di competenza per la rizosfera (Van Loon et al., 1998).

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

I BCA registrati e già disponibili in commercio includono sia batteri appartenenti ai generi *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e

Bacillus, sia funghi dei generi *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* e *Coniothyrium* (Vinale et al., 2008). Tra gli antagonisti fungini più interessanti e maggiormente studiati vi sono diverse specie del genere *Trichoderma*. Tale genere racchiude un'ampia varietà di biotipi che, oltre ad esercitare un antagonismo diretto nei confronti degli agenti fitopatogeni, sono in grado di stabilire rapporti fisiologici complessi con le piante, promuovendone lo sviluppo ed inducendo resistenza localizzata e sistemica (Harman et al., 2004).

1.3 IL GENERE *TRICHODERMA*: BIOLOGIA E ECOLOGIA

L'origine del genere *Trichoderma* è riconducibile a più di 200 anni fa (1794) quando Persoon isolò questo fungo da materiale organico decomposto e lo descrisse formalmente.

Il genere *Trichoderma* (divisione *Ascomycota,* ordine *Hypocreales*) è un genere dei funghi imperfetti che producono conidi su ife conidiofore libere, non aggregate in sinnemi o sporodochi (famiglia *Hypocreaceae*) (Gams e Bisset, 1998). Le forme sessuate (anche dette teleomorfiche o perfette) in relazione con le specie di *Trichoderma* sono riconducibili al genere *Hypocrea*, descritto per la prima volta nel 1925 da Elias Fries. La relazione esistente tra le due forme, sessuata (teleomorfo) ed asessuata (anamorfo), fu scoperta solo nel 1957 da Dingley e successivamente confermata da da Webster e Rifai (Webster e Rifai, 1968).

La tassonomia di *Trichoderma* è molto complessa ed ancora incompleta, come problematica è la distinzione delle specie appartenenti a questo genere, nonostante le moderne tecniche molecolari abbiano permesso di dirimere molte questioni tassonomiche difficilmente risolvibili sulla base dei soli caratteri morfologici (Druzhinina e Kubicek, 2005). Infatti, a partire dal 1995, l'analisi delle sequenze del DNA delle regioni intergeniche ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer 1 e 2) dell'rDNA e di una porzione interna del gene *TEF 1-alpha* (Translation Elongation Factor 1-alpha) ha permesso l'identificazione di circa 104 specie di *Trichoderma e Hypocrea,* a fronte delle 9 specie (aggregati di specie)

descritte da Rifai (1969) e delle 35 specie, distinte in 5 sezioni, successivamente riconosciute da Bisset (1984-1992). La caratterizzazione molecolare di *Trichoderma*, oltre a consentire la definizione di nuove specie, ha permesso anche di risolvere alcuni dubbi e incongruenze derivanti da un'errata attribuzione della specie a ceppi antagonistici o di interesse industriale (Druzhinina et al., 2005). Per esempio, in passato gli isolati micoparassitari usati nel controllo biologico venivano generalmente considerati appartenenti alla specie *Trichoderma harzianum* Rifai. Lo studio della variabilità genetica mediante tecniche molecolari, ha consentito di stabilire che isolati antagonistici sono invece ascrivibili ad un numero molto maggiore di specie (Hermosa et al., 2000). Inoltre, Samuels et al. (2002) sulla base di studi filogenetici molecolari hanno dimostrato la netta distinzione di *T. harzianum* sensu stricto, comprendente isolati antagonistici, da *T. harzianum* biotipi Th4 e Th2, comprendenti invece isolati dannosi in quanto micoparassiti di funghi agaricali coltivati e oggi riconosciuti come appartenenti ad una specie e due forme distinte (*Trichoderma aggressivum* Samuels & W. Gams forma *aggressivum* e *T. aggressivum* forma *europaeum*). Un sistema di identificazione molecolare di isolati di *Trichoderma*, denominato TrichOKEY v.2, basato sui marcatori molecolari ITS1-ITS2, è attualmente disponibile on-line sul sito http://www.isth.info/.

I funghi appartenenti al genere *Trichoderma* sono caratterizzati da colonie con crescita molto rapida. Nella maggior parte dei casi, i *Trichoderma* presentano un micelio fioccoso. I conidiofori possono essere prodotti dalla colonia in modo diffuso, a ciuffi o raccolti in pustole compatte, comunemente distribuite in anelli concentrici dalle tipiche sfumature verdi, raramente bianche, grigie, biancastre o marroni. In alcune specie di *Trichoderma* (es. *T. harzianum*) i conidiofori sono costituiti da un asse centrale su cui si alternano, ad intervalli regolari, ramificazioni laterali a loro volta caratterizzate da ramificazioni secondarie che diventano via via sempre più corte quanto più si avvicinano all'apice, dando luogo ad una struttura piramidale (Fig. 1.1). In altre specie, invece, le ramificazioni non sono così regolari, ma

solitarie o opposte e con ramificazioni secondarie scarse. Solitamente le ramificazioni dei conidiofori terminano con una o più fialidi (ife conidiogene) che possono essere di forma cilindrica, subglobosa o ampolliforme. In alcuni casi, le fialidi possono essere raggruppate sull'asse principale (es. *T. polysporum* (Link) Rifai, *T. hamatum* (Bon.) Bain) oppure essere solitarie e disposte irregolarmente (es. *T. longibrachiatum* Rifai).

I conidi sono monocellulari, di forma ellissoidale, subglobosa, allungata ed in alcuni casi cilindrica, generalmente verdi anche se per alcuni isolati possono presentarsi incolori, grigi o marroni (Fig. 1.2).

A **B**

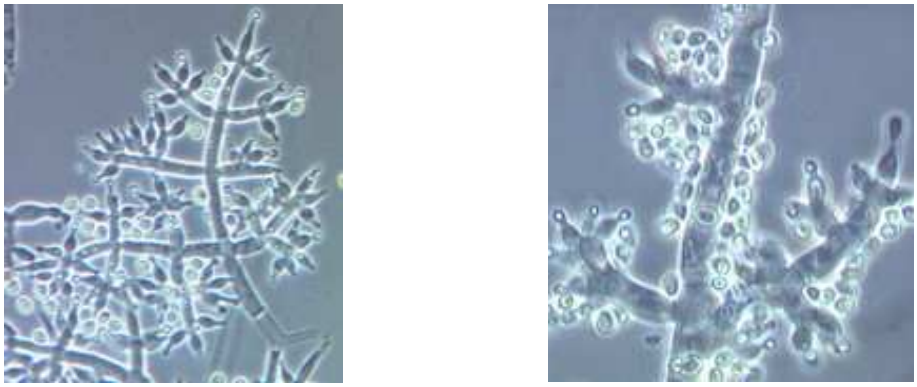


Fig. 1.1. Conidiofori di *T. harzianum* **(A)** e *T. fertile* Bissett **(B)** costituiti da un asse centrale su cui si alternano, ad intervalli regolari, ramificazioni laterali a loro volta portanti ramificazioni secondarie, formando così una struttura piramidale.

A **B** **C**

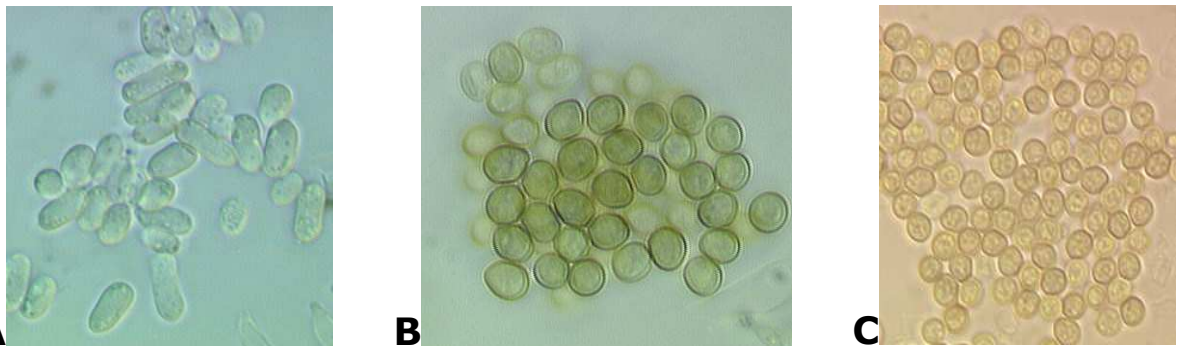


Fig. 1.2. Conidi di forma elissoidale **(A)**, subglobosa **(B)** e globosa **(C)** di *T. citrinoviride* Bissett, *T. asperellum* Samuels, Lieckf. et Nirenberg, *T. aggressivum* Samuels & W. Gams, rispettivamente.

Tutte le specie producono clamidiospore unicellulari subglobose in posizione intercalare o terminale lungo le ife.

Cosmopoliti e ubiquitari nel terreno e sul legno in decomposizione, oltre che comuni colonizzatori di sostanza organica vegetale, i trichoderma risultano largamente diffusi in natura, grazie anche alla loro attitudine a sopravvivere in diverse condizioni climatiche. Basti pensare che quasi tutti i suoli dell'area temperata e tropicale contengono circa 10^1-10^3 propaguli/gr di terreno (Samuels, 1996; Klein e Eveleigh, 1998; Harman et al., 2004). Ciò è attribuibile alle versatili capacità metaboliche ed alla natura competitiva di molte delle specie appartenenti a questo genere (Gams e Bissett, 1998).

1.3.1 IL CONTROLLO BIOLOGICO CON *TRICHODERMA* SPP.

Le potenzialità delle specie di *Hypocrea/Trichoderma* come possibili BCA di funghi fitopatogeni furono riconosciute per la prima volta nel 1932 da Weindling (Weindling, 1934). Egli osservò che alcuni isolati di *T. lignorum* (*T. viride*) (Tode) Harz erano in grado di parassitizzare in coltura funghi fitopatogeni del terreno, come *Rhizoctonia* spp. e *Sclerotinia* spp., e propose di arricchire il terreno con questi micoparassiti per ridurre l'incidenza delle malattie da essi causate. Il lavoro di Weindling stimolò numerose successive ricerche sull'argomento, che nel tempo hanno portato all'uso di diverse specie appartenenti a questo genere come biopesticidi, biofertilizzanti e ammendanti del terreno (Harman, 2000; Harman et al., 2004). Attualmente, la magggior parte dei prodotti commerciali per la lotta a fitopatie che utilizzano funghi come principio attivo, sono a base di *Trichoderma* spp. (Vannacci e Gullino, 2000; Woo et al., 2006).

Diversi isolati di *Trichoderma* spp., per la maggior parte appartenenti alla specie *T. harzianum*, sono risultati efficaci BCA di funghi patogeni del suolo, come *P. ultimum* (Naseby et al., 2000), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Inbar et al., 1996) e *Fusarium* spp. (Ozbay e Newman, 2004), sia in condizioni di serra che in pieno campo. Questo è dovuto alla capacità di *Trichoderma* spp. di contrastare l'azione di isolati

fitopatogeni attraverso molteplici, sinergici e complessi meccanismi d'azione (Benitez et al., 2004), ancora oggi non del tutto elucidati. Senza dubbio è possibile asserire che le principali interazioni antagonistiche *Trichoderma*–patogeno sono ascrivibili ai processi, già definiti in precedenza, di antibiosi (Howell, 1998), micoparassitismo (Howell, 2003) e competizione per le sostanze nutritive e/o lo spazio (Chet, 1987). Oltre a questi classici meccanismi d'azione, recenti studi hanno evidenziato la capacità di alcuni isolati antagonistici di interagire direttamente con la pianta, inducendo effetti benefici come la promozione della crescita, l'aumento della disponibilità di nutrienti, il miglioramento della produzione e l'aumento della capacità di difesa (Harman, 2006). Per tali ragioni i *Trichoderma* spp. possono essere considerati, in rapporto alle complesse relazioni ecologiche che stabiliscono con le piante, come organismi simbionti avirulenti e opportunisti (Harman et al., 2004).

L'impiego di questi funghi antagonisti, sia per la limitata disponibilità di isolati con azione mirata nei confronti di specifiche malattie e sia per l'efficacia raramente equivalente a quella dei fungicidi di sintesi (Vurro e Gressel, 2006), viene per lo più associato all'impiego di fitofarmaci in programmi di lotta integrata (Ruocco et al., 2009). Inoltre, sono ancora carenti alcune conoscenze di base necessarie per la registrazione di biofungicidi contenenti *Trichoderma* spp. come principio attivo, inclusa una sufficiente conoscenza dei meccanismi d'azione e della compatibilità d'uso con altri BCA (Vurro e Gressel, 2006). Il chiarimento dei meccanismi d'azione a livello fisiologico e molecolare, l'aumento dell'efficacia, il miglioramento della compatibilità con altri mezzi (chimici e/o biologici) di lotta e la messa a punto di processi tecnologici efficienti per la produzione e la formulazione di biomasse di *Trichoderma* spp. sono oggi le principali sfide nei settori della ricerca e dello sviluppo di biofungicidi a base di *Trichoderma*.

1.3.1.1 MECCANISMI D'AZIONE DIRETTI

E' nota la capacità di diverse specie e ceppi del genere *Trichoderma* di produrre un'ampia gamma di metaboliti tossici con attività antibiotica,

molti dei quali sono stati caratterizzati da un punto di vista chimico e biologico. Tali composti possono essere raggruppati, a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche in tre categorie: antibiotici volatili, antibiotici non volatili e peptaiboli (Vinale et al., 2008; 2009). Tra i metaboliti con attività antifungina maggiormente studiati vi sono il 6-pentil-α-pirone (6PP), responsabile del caratteristico odore di cocco di *Trichoderma*, l'harzianolide, la gliovirina, la gliotossina, la viridina, ma anche terpeni, derivati isocianidici e, tra i peptaboli, le alameticine 1 e 2, la trichotossina A40 e A50 (Papavizas, 1985; Brueckner et al., 1985; Brewer et al., 1987; Claydon et al., 1987; Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998; Reino et al., 2008). Il ruolo dell'antibiosi nel biocontrollo da parte di *Trichoderma* è stato oggetto di numerosi studi che hanno chiarito l'implicazione di questo processo nel controllo di alcuni agenti fitopatogeni. Howell (2000), per esempio, ha dimostrato la specificità d'azione degli antibiotici gliovirina e gliotossina, prodotti da diversi ceppi (designati come ceppi "P" e ceppi "Q") di *T. virens,* nei confronti di *P. ultimum* e *R. solani*, rispettivamente. Non meno interessanti sono apparsi, poi, i risultati ottenuti applicando sul patogeno bersaglio le sostanze antibiotiche in assenza dell'antagonista. L'azione delle due sostanze bioattive risultava efficace nel controllo dei rispettivi patogeni bersaglio al pari dei corrispondenti ceppi produttori (Vinale et al., 2008).

Oltre ad avere azione diretta, le molecole dotate di attività antimicrobica prodotte da *Trichoderma* possono agire in sinergia con altri fattori prodotti dallo stesso microrganismo, contribuendo a rendere il biocontrollo più efficace (Woo et al., 2002). Questo fenomeno è stato messo in luce con particolare chiarezza nelle fasi che caratterizzano il complesso processo del micoparassitismo esercitato da *Trichoderma* spp. La simultanea produzione di sostanze antibiotiche e di enzimi idrolitici, oltre all'azione di proteasi fungine, rappresenta l'elemento chiave dell'intero processo. Infatti, *Trichoderma* è in grado di avvertire la presenza del fungo bersaglio e di sovra-regolare la produzione costitutiva di enzimi degradativi della parete cellulare fungina (Cell Wall Degrading

Enzymes, CWDE), i quali avviano la cascata di eventi successivi (Kubicek et al., 2001; Howell, 2003; Woo et al., 2006; Woo e Lorito, 2007). I CWDE catalizzano il rilascio di oligomeri dalla parete del fungo bersaglio che, a loro volta, inducono nell'antagonista l'espressione di endochitinasi ed altri CWDE in grado di attaccare le pareti del fungo ospite prima dell'effettivo contatto fisico (Zeilinger et al., 1999; Viterbo et al., 2002). Dopo l'avvolgimento delle proprie ife attorno a quelle del patogeno, vi è un ulteriore rilascio di elevate quantità di CWDE, soprattutto chitinasi e glucanasi, che degradano la parete cellulare del fungo parassitizzato, causandone la morte (Benitez et al., 2004). In questo complesso processo anche altri composti con attività antifungina, come gli antibiotici prodotti dall'antagonista, hanno un ruolo chiave. Infatti, il drammatico effetto inibitorio a carico del patogeno sembrerebbe essere proprio dovuto alla sinergia d'azione tra enzimi e antibiotici, piuttosto che all'azione esclusiva dei CWDE (Lorito et al., 1994; Schirmbock et al., 1994; Lorito et al., 1996). Un modello funzionale dell'azione sinergica di CWDE e antibiotici peptaibolici è stato proposto da Kubiceck et al. (2001). Secondo tale modello, i CWDE degradano la parete del fungo bersaglio e ne riducono la rigidità, facilitando così l'accesso dei peptaiboli alla membrana cellulare. I peptaiboli hanno la capacità in modificare la permeabilità delle membrane cellulari, compromettendone l'integrità e la funzionalità. Una volta penetrati, i peptaiboli danneggiano la membrana cellulare del fungo bersaglio e inibiscono l'attività di enzimi di trans-membrana (chitina-sintetasi e β-glucano sintetasi) deputati alla riparazione dei danni alla parete determinati dai CWDE, compromettendo la capacità riparatrice dell'ifa del fungo parassitizzato. A supporto di tali osservazioni vi sono diversi studi condotti in passato che hanno evidenziato cambiamenti nella permeabilità di membrana dell'ospite durante le interazioni micoparassitiche con *Trichoderma* spp. (Lewis e Papavizas, 1987). Una questione ancora aperta e fortemente dibattuta in questi ultimi anni riguarda i meccanismi attivati dai *Trichoderma* per prevenire l'autointossicazione, difendendosi dalla complessa miscela di composti antifungini secreti da esso stesso durante l'attività

antagonistica. Una delle ipotesi più accreditata per spiegare questo fenomeno fa riferimento alla produzione di inibitori dei propri enzimi litici. A tal proposito, Lora e colleghi (1994) hanno rilevato la produzione di inibitori di chitinasi rilasciati simultaneamente ai CWDE. Questo meccanismo potrebbe spiegare l'alto livello di resistenza mostrato da *T. harzianum* nei confronti di alcune sue endochitinasi purificate (Lorito et al., 1993).

La competizione per spazio e nutrienti è un altro meccanismo d'azione attraverso cui *Trichoderma* esplica la sua attività di biocontrollo nei confronti di funghi fitopatogeni (Ozbay e Newman, 2004). Tale capacità risulta strettamente legata all'elevata adattabilità ecologica e versatilità metabolica di *Trichoderma*, proprietà che conferiscono a questi funghi un vantaggio in termini di efficienza di colonizzazione di differenti nicchie ecologiche e di utilizzazione di diversi substrati. Basti pensare che questi funghi sono residenti nei suoli di tutto il mondo, anche sottoposti a condizioni ambientali estreme. Quest'ultimo aspetto è legato alla capacità di *Trichoderma* di persistere come clamidospore e conidi, in condizioni di stress da carenza di nutrienti (Gams e Bisset, 1998). Pertanto, la rapida velocità di crescita, l'abbondante produzione di conidi dotati di elevata persistenza ed un'ampia versatilità nell'utilizzo dei substrati (Gams e Bisset, 1998), fanno di *Trichoderma* un efficace competitore, in grado di sfruttare le risorse disponibili sia come colonizzatore primario, che come colonizzatore secondario di risorse già occupate da altri microrganismi (Cooke e Rayner, 1984). La competizione dei *Trichoderma* nei confronti degli altri microrganismi può interessare l'accaparramento di nutrienti derivanti da tessuti già colonizzati dai patogeni, come nel caso del biocontrollo di *Botrytis* spp. e *Sclerotinia* spp. (Dubos, 1987; Gullino, 1992), oppure l'utilizzo degli essudati radicali delle piante e dei semi germinanti, come accade nel biocontrollo di *P. ultimum* (Ahmad e Baker, 1988). Inoltre, la capacità di alcuni isolati di *Trichoderma* di competere per spazio e nutrienti è strettamente correlata all'abilità di alcuni ceppi di colonizzare prima, e poi svilupparsi, sull'apparato radicale delle piante, inducendo in alcuni casi anche un miglioramento della crescita,

dell'architettura e dell'efficienza delle radici (Ozbay e Newman, 2004). Tale qualità, definita competenza per la rizosfera (*rhizosphere competence*), può risultare cruciale per rendere massima l'espressione dell'attività biologica di un antagonista (Sivan e Harman, 1991; Harman et al., 2004).

Recenti risultati hanno provato la capacità di alcuni isolati di resistere ad una varietà di tossine e composti xenobiotici, inclusi antibiotici prodotti da altri microrganismi, composti antimicrobici di origine vegetale e fungicidi di sintesi (Harman et al., 2004). La base molecolare del meccanismo di resistenza che rende questi funghi dei forti competitori ed attivi colonizzatori di ambienti "inquinati", è stata parzialmente delucidata con la recente scoperta di un set di trasportatori di membrana chiamati, trasportatori ABC (ATP Binding Cassette) (Lanzuise, 2005). Quest'ultimi sono permeasi di membrana ATP-dipendenti che mediano il trasporto di differenti substrati attraverso le membrane biologiche, contro un gradiente di concentrazione (Driessen et al., 2000). La peculiarità di queste proteine è quella di detossificare il citoplasma delle cellule attraverso il trasporto attivo verso l'esterno delle molecole tossiche. La bassa specificità di substrato, e pertanto la capacità di trasportare sostanze chimiche diverse, conferisce ai trasportatori ABC il ruolo di fattori di polichemiorestenza (Multi Drug Resistence, MDR) (Lanzuise, 2005). Infatti, è stato ipotizzato che i trasportatori ABC di *Trichoderma* spp. svolgano un ruolo importante in numerosi processi, dalla secrezione di fattori (micotossine, enzimi idrolitici, ormoni ecc.) necessari per stabilire un'interazione compatibile tra il micoparassita, il fungo ospite e/o la pianta, alla resistenza a sostanze tossiche prodotte dalla microflora o introdotte da attività antropiche (fungicidi e metalli pesanti) (Ruocco et al, 2009). Prova del coinvolgimento dei trasportatori ABC nelle interazioni micoparassitiche che si verificano tra antagonista e patogeno, sono gli studi condotti su mutanti knockout di *T. atroviride* Karst., la cui azione risultava inibita dai metaboliti tossici di *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., *R. solani e P. ultimum* a causa dell'assenza di queste specifiche proteine di membrana (Harman et al., 2004). Nonostante i

notevoli risultati ottenuti, ancora poco si conosce circa la funzione di queste permeasi nelle interazioni fungine che si verificano nell'ambito del biocontrollo, come del resto ridotto risulta il numero di pubblicazioni riguardanti l'isolamento e la caratterizzazione di geni di trasportatori ABC nei funghi e, in particolare, in *Trichoderma* spp. Solo molto recentemente è stato ottenuto il clonaggio e la caratterizzazione funzionale del primo gene (*Taabc2*), codificante per un trasportatore ABC dell'isolato antagonistico *T. atroviride* P1 (Ruocco et al., 2009). Attraverso uno studio di espressione e l'induzione di mutanti knock-out, gli autori hanno dimostrato il coinvolgimento di tale gene nell'attività antagonistica e nel biocontrollo esercitato dall'isolato fungino. Il gene *Taabc2* riveste un ruolo chiave nel determinare la resistenza o la tolleranza del ceppo P1 ad alcuni fungicidi chimici, come anche a tossine prodotte dai patogeni fungini. Inoltre, lo stesso gene previene l'autointossicazione del BCA dovuta ai composti inibitori prodotti dallo stesso isolato durante le interazioni antagonistiche.

1.3.1.2 MECCANISMI D'AZIONE INDIRETTI

In realtà, quando si esaminano i meccanismi d'azione dei *Trichoderma* non ci si può limitare ai meccanismi basati sulla diretta interazione con il patogeno, ma è necessario considerare anche l'interazione dell'antagonista con la pianta. Infatti, l'efficacia del biocontrollo non è attribuibile solo al diretto effetto antagonistico esercitato dai *Trichoderma* verso i patogeni ma è il risultato delle complesse interazioni che si verificano tra antagonista, patogeno e ospite vegetale. Recenti studi hanno dimostrato la capacità di isolati di *Trichoderma* spp. di indurre cambiamenti metabolici e biochimici nella pianta che si traducono anche in una maggiore resistenza della stessa all'invasione di agenti fitopatogeni (Harmann et al., 2004). L'induzione della ISR e della SAR da parte di *Trichoderma* spp. è stata osservata su un'ampia gamma di piante, sia mono che dicotiledoni, incluse graminacee, solanacee e cucurbitacae, e nei confronti di diversi agenti fitopatogeni (Harman, 2006; Woo et al., 2006). Un esempio è la capacità del ceppo *T.*

harzianum T-39 di determinare una risposta di difesa nei confronti di *B. cinerea* in piante di pomodoro, tabacco, lattuga, peperone e fagiolo, con una conseguente riduzione della gravità dei sintomi in misura del 25%-100% (De Meyer et al., 1998). Alla base di tale fenomeno sembrerebbe ci sia la capacità delle ife di *Trichoderma* di penetrare nelle radici delle piante e di produrre metaboliti secondari bioattivi (proteine con attività enzimatica, prodotti genici di avirulenza e composti a basso peso molecolare rilasciati dalle pareti cellulari del fungo) in grado di elicitare nella pianta la cascata di eventi biochimici tipici della risposta di difesa (Harman, 2006; Vinale et al., 2008). In particolare, la risposta della pianta all'interazione con l'antagonista è a sua volta caratterizzata dalla sintesi e dal successivo accumulo di differenti enzimi quali perossidasi, chitinasi, glucanasi, e di fitoalessine, nonchè dall'attivazione del pathway delle lipossigenasi e delle idroperossidi liasi, eventi comunemente associati all'attacco di agenti fitopatogeni (Howell et al., 2000; Harman et al., 2004). A differenza di quanto rilevato per la maggior parte dei funghi, gli isolati di *Trichoderma* risultano resistenti a tali composti tossici, continuando a persistere sulle radici ed esplicare la loro attività di biocontrollo anche dopo l'attivazione di questa cascata di eventi biochimici (Harman et al., 2004). I meccanismi alla base dell'interazione *Trichoderma*-pianta, non sono stati completamente elucidati (Vinale et al., 2008). Nonostante questo, negli ultimi anni, gli approcci di tipo molecolare e proteomico, sono risultati un utile strumento di indagine per comprendere meglio la base genetica dell'interazione simbiontica che si verifica tra pianta ed antagonista e per scoprire nuove proteine con funzione di elicitori (Shoresh e Harman, 2008; Gallou et al., 2008; Kumar et al., 2009). Uno studio genomico condotto da Djonovic et al. (2006) ha permesso, ad esempio, di identificare una nuova proteina, l'Sm1, prodotta da *T. virens*, che agisce da elicitore nell'attivazione della ISR e della SAR su piante di cotone. La stessa proteina è risultata successivamente coinvolta anche nella risposta di difesa da parte dello stesso isolato su piante di mais (Djonovic et al., 2007). Ancora, sempre per *T. virens* la purificazione di una sintetasi dei peptaiboli ed il clonaggio

del corripondente gene ha permesso di facilitare la conoscenza del ruolo di tali composti nella risposta di difesa di *Trichoderma* (Wiest et al., 2002).

Come già accennato in precedenza, alcuni isolati di *Trichoderma* una volta giunti in contatto con l'ospite vegetale non si limitano ad attivare la risposta di difesa ma agiscono anche da biofertilizzanti. E' ampiamente documentata, infatti, l'abilità di isolati appartenenti a questo genere di migliorare la crescita e lo sviluppo dell'apparato radicale di numerose colture (Harman, 2004). Tale fenomeno è risultato strettamente collegato alla capacità di *Trichoderma* spp. di vivere in intima associazione con la pianta, colonizzando le radici e persistendo su di esse anche per lunghi periodi di tempo (Howell, 2003). E' noto il caso dell'isolato T-22 di *T. harzianum*, la cui capacità di promuovere lo sviluppo dell'apparato radicale, e di determinare un incremento del vigore vegetativo, della biomassa e della produttività di piante di mais e di diverse colture ortive è stata confermata in numerose ricerche sia di tipo accademico che commerciale (Harman, 2006). La produzione di fattori di crescita (sostanze fitormoni simili) sembrerebbe essere uno dei meccanismi alla base di tale effetto (Kleifeld e Chet, 1992; Windham et al., 1986). E' inoltre documentata la capacità di alcuni isolati di esplicare la propria attività di biofertilizzanti favorendo nel suolo la solubilizzazione e quindi la biodisponibilità per le piante di sostanze minerali insolubili o poco solubili, come il MnO_2, calcio fosfato, Fe_2O_3, CuO e lo Zn^0, favorendo in questo modo il loro assorbimento da parte delle radici (Altomare et al., 1999). Inoltre, nelle piante in associazione simbiotica con *Trichoderma* è stato osservato un incremento dell'assorbimento e della traslocazione di molti micronutrienti, come arsenico, cobalto, cadmio, cromo, nickel, piombo, boro, vanadio, magenesio, manganese, rame, zinco, alluminio, rame e sodio (Harman et al., 2004). Questi microelementi, sebbene richiesti in quantità molto ridotte, sono necessari per processi biochimici essenziali e la loro carenza può determinare scompensi fisiologici che si traducono in ridotta produttività e aumentata suscettibilità alle malattie.

1.4 *FUSARIUM OXYSPORUM*: BIOLOGIA ED ECOLOGIA

L'isolamento e la caratterizzazione di *Fusarium oxysporum* von Schjetendahl risale al 1824 ad opera del botanico tedesco D. F. L. von Schjetendahl. E' senza dubbio la specie appartenente al genere *Fusarium* più largamente diffusa in natura, possedendo una distribuzione che spazia dall'Artico (Kommedahl et al., 1988), alle zone tropicali e desertiche (Mandeel et al., 1995), dai suoli vergini alle aree coltivate (McMullen e Stack, 1983). Oltre ad occupare habitat molto diversificati, questa specie è anche caratterizzata da un'ampia varietà di biotipi con caratteristiche differenti: tutti sono saprofiti, molti sono endofiti (sono in grado di invadere in maniera estesa alcuni tessuti delle piante senza indurre alcun specifico sintomo), ed alcuni sono agenti fitopatogeni di colture ortive come cetriolo, pomodoro, patata, ma anche di cereali e di piante ornamentali e spontanee (Leslie e Summerell, 2006).

Poiché di questa specie non è conosciuta la forma sessuata, il concetto biologico classico di specie non può essere applicato ad essa e pertanto si parla più propriamente di *F. oxysporum* Complex (FOC).

Fonte: Balech, 2008

Fig. 1.3. Coltura su PDA di un isolato di *Fusarium oxysporum*

Molti isolati fitopatogeni di *F. oxysporum* si presentano come ospite-specifici, proprietà che ha determinato la distinzione in seno a *F.*

oxysporum di forme speciali (formae speciales) e razze fisiologiche, in base alla specializzazione ed al grado di aggressività che gli isolati hanno nei confronti di particolari specie vegetali e cultivar (Snyder e Hansen, 1940; Armstrong e Armstrong, 1981). Ad oggi sono state descritte più di 100 forme speciali (Booth, 1971; Leslie e Summerell, 2006). Non sono ancora chiari i complessi rapporti genetici esistenti tra isolati appartenenti a patotipi diversi, né è possibile distinguere ceppi patogeni e non sulla base di caratteri morfologici e genetici o in base alla compatibilità vegetativa (Nogales Moncada et al., 2009).

L'alta variabilità intraspecifica, oltre che fisiologicamente e geneticamente, si manifesta anche nella morfologia e nella pigmentazione delle colonie, che possono assumere un aspetto molto diverso in funzione del mezzo di coltura utilizzato. Su PDA, per esempio, il micelio può essere fioccoso, sparso o abbondante ed il colore può variare da bianco a viola pallido nella parte aerea, mentre il substrato può avere colore biancastro o assumere una pigmentazione viola scuro o magenta (Fig. 1.3).

Fonte: Balmas et al., 2000

Fig. 1.4. Conidi di *F. oxysporum*. (**A)** Macroconidi settati, (**B)** microconidi.

F. oxysporum produce tre tipi di spore asessuali: microconidi, macroconidi e clamidiospore (Agrios, 1988) (Fig. 1.4). I microconidi

rappresentano le spore prodotte più abbondantemente e più frequentemente in tutte le condizioni ambientali. Di forma ovale, ellittica o reniforme, generalmente non presentano setti e vengono prodotti da monofialidi molto numerose e di dimensioni ridotte. I macroconidi, invece, si ritrovano spesso sulle superfici dei tessuti vegetali invasi da isolati fitopatogeni. Di media lunghezza, leggermente curvi, i macroconidi possiedono generalmente tre setti e sono formati da monofialidi portate da conidiofori riuniti in sporodochi (corpi fruttiferi asessuati). Le clamidiospore sono abbondanti, circolari, con parete cellulare spessa e vengono prodotte dal micelio senescente o dai macroconidi (Leslie e Summerell, 2006).

1.4.1 *F. OXYSPORUM* COME AGENTE FITOPATOGENO

Tutti gli isolati della specie *F. oxysporum* sono in grado di sopravvivere saprofitariamente per lunghi periodi su materiale organico nel suolo e nella rizosfera di molti ospiti vegetali (Garrett, 1970). *F. oxysporum* rappresenta una delle specie di *Fusarium* di maggiore interesse fitopatologico ed economico. Le diverse forme speciali sono infatti responsabili di malattie vascolari (tracheofusariosi) e marciumi parenchimatici di molte colture economicamente importanti (O'Donnell et al., 2004).

Fonte: http://www.ilpomodoroitaliano.it

Fig. 1.5. Marcescenza radicale e del fusto di una pianta di pomodoro colpita da tracheofusariosi causata da *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Gli ospiti vegetali includono pomodoro (Jones et al., 1991), lattuga (Pasquali et al., 2003), melone (Wechter et al., 1995), banana (Nel et al., 2006), come anche diverse piante ornamentali quali garofano (Cerchiai, 2005), margherita, lisianthus, gerbera, *Hebe* spp., ninfea e dimorfoteca (Gullino e Garibaldi, 2007). Sotto il nome di tracheomicosi si annoverano malattie caratterizzate dalla prevalente localizzazione del patogeno fungino nel sistema vascolare legnoso delle piante (Frasconi, 2006). I sintomi tipici della malattia includono: nanismo, appassimento, clorosi, scolorimento vascolare, necrosi e morte della pianta (Fig. 1.5). Tali manifestazioni possono verificarsi contemporaneamente o in successione, e prevalere le une sulle altre in funzione dell'ospite, del patotipo e delle condizioni ambientali. Possono essere interessate piante sia in coltura protetta che in pieno campo, in qualsiasi stadio vegetativo e in qualsiasi fase fenologica, sebbene siano le infezioni contratte precocemente quelle che causano i danni economici più rilevanti. Le forme speciali di *F. oxysporum* diffondono i loro propaguli per via aerea e, solitamente, penetrano nell'ospite attraverso il sistema radicale. Durante il processo di colonizzazione dell'ospite, i *Fusaria* producono enzimi degradativi, in prevalenza pectinolitici responsabili della macerazione cellulare e di ostruzione dei vasi (Gothoskar et al., 1953; Deese e Stahmann, 1962). Nella patogenesi dell'avvizzimento causato da *F. oxysporum* è implicato anche il rilascio di metaboliti secondari con azione fitotossica (Eged e Srobarova, 1994). La fitotossina più importante è l'acido fusarico, la cui produzione in vivo da parte di numerose forme speciali di *F. oxysporum* e la cui implicazione nel processo patogenetico è stata dimostrata su anguria, pomodoro, garofano, lino e cavolo (Bacon et al., 1996). Come risposta all'invasione da parte di *F. oxysporum*, alcuni ospiti vegetali hanno sviluppato un sistema di difesa caratterizzato dalla produzione di gel, gomme e tille all'interno degli elementi dei vasi xilematici (Pennypacker, 1981) in modo da limitare la diffusione del patogeno, intrappolando i conidi fra gli elementi vascolari (Frasconi, 2006). Gli agenti di tracheomicosi hanno un'ecologia particolare, in quanto se da una parte causano alcune delle più devastanti malattie per le piante e

dimostrano un alto grado di specificità d'ospite, dall'altra si limitano a crescere nei vasi xilematici non più vitali (dopo esser penetrati attraverso apici radicali o ferite) ed invadono i tessuti vivi della pianta solamente quando quest'ultima va incontro a senescenza. In sostanza, questi funghi si comportano come deboli parassiti che, per la maggior parte della vita trascorsa all'interno della pianta si nutrono utilizzando i pochi nutrienti organici che risalgono nei vasi xilematici (Deacon, 2006).

1.4.2 *F. OXYSPORUM* COME AGENTE DI BIOCONTROLLO

Oltre a isolati fitopatogeni, la specie *F. oxysporum* comprende anche isolati non fitopatogeni, capaci di penetrare nelle radici e nei semi di una varietà di piante, senza tuttavia invaderne il sistema vascolare o causare malattie (Booth, 1971; Domsch et al. 1980; Leslie et al. 1990; Mathur e Manandhar, 2003; Olivain e Alabouvette, 1999). Ceppi non patogeni di *F. oxysporum* sono una componente importante della popolazione microbica di alcuni terreni soppressivi e sono ritenuti responsabili della soppressività di questi terreni (Mandeel e Baker, 1991; Yamaguchi et al., 1992; Chakraborty e Gupta, 1995; Blok et al., 1997; Larkin e Fravel, 1998; Klein e Correll, 2001; Ichikawa et al., 2003). Attualmente, alcuni ceppi non patogeni di *F. oxysporum* sono utilizzati come agenti di biocontrollo e per la produzione di biofungicidi.

Come per altri agenti di biocontrollo, anche nell'antagonismo esercitato da *F. oxysporum* intervengono meccansimi diretti (antibiosi, competizione, micoparassitismo) e meccanismi indiretti (Fravel et al., 2003). Tuttavia, il meccanismo principale sembra essere la capacità di competere per i nutrienti presenti nel terreno e nella rizosfera e per i siti di infezione sulla superficie o all'interno delle radici delle piante ospiti (Leslie e Summerell, 2006; Mazzola, 2002). Couteaudier e Alabouvette (1990) hanno dimostrato che nei terreni soppressivi isolati patogeni e non patogeni di *F. oxysporum* competono per le fonti di carbonio. Successivamente, ulteriori evidenze dell'importanza della competizione per le fonti di carbonio nel meccanismo d'azione dei *F. oxysporum* antagonisti sono state presentate da Lemanceau et al. (1993) e Larkin e

Fravel (1999). E' stato dimostrato che la competizione tra isolati di *F. oxysporum* si verifica anche sulla superficie delle radici e nei vasi della pianta ospite (Fravel et al., 2003; Postma e Luttikholt, 1996). Mandeel e Baker (1991) hanno descritto la capacità di isolati non patogeni di *F. oxysporum* di ridurre l'avvizzimento causato da *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* grazie alla colonizzazione competiva dei siti di infezione presenti sulle radice di piante di cetriolo. Olivain e Alabouvette (1999), attraverso l'impiego di trasformanti per il gene reporter della beta-glucuronidasi (GUS), hanno studiato il processo di colonizzazione di radici di piante di pomodoro in coltura idroponica da parte di un isolato patogeno e un isolato antagonista di *F. oxysporum*. Entrambi gli isolati erano in grado di colonizzare attivamente gli stessi siti di penetrazione presenti sulla superficie delle radici e di manifestare un processo di diffusione simile, caratterizzato dalla penetrazione nelle cellule dell'epidermide e colonizzazione dello strato più superficiale delle cellule corticali. La pianta reagiva a questa invasione attraverso l'attivazione di una risposta di difesa, che era più intensa quando elicitata dall'isolato non patogeno. L'induzione di resistenza sistemica nella pianta ospite sembra quindi essere uno dei meccanismi d'azione degli isolati antagonistici di *F. oxysporum*. (Biles e Martin, 1989). Tamietti et al. (1993) hanno riscontrarono l'aumento delle attività enzimatiche connesse con l'ISR in piante di pomodoro trapiantate in suolo sterilizzato e successivamente inoculato con un isolato non patogeno di *F. oxysporum*.

Considerata l'elevata specificità d'ospite degli isolati fitopatogeni di *F. oxysporum*, ceppi fitopatogeni che attaccano piante infestanti o parassite (per es. diverse specie di *Orobanche* come *O. ramosa* L., *O. cernua* Loefl., *O. aegyptiaca* Pers., *O. cumana* Wallr.) sono utilizzati per il controllo biologico delle "malerbe" (Leslie e Summerell, 2006; Dor et al., 2007). Questi particolari agenti di biocontrollo vengono definiti micoerbicidi. Alcuni isolati di *F. oxysporum* sono risultati in grado di inibire completamente la germinazione di semi di *O. cumana*, *O. ramosa* e *Striga hermontica* (Del.) Benth, soprattutto per effetto della produzione di fitotossine, quali l'acido fusarico ed il suo derivato l'Acido 9,10-

deidrofusarico (Zonno e Vurro, 1999; Zonno e Vurro, 2002; Dor et al., 2007). Altre applicazioni di *F. oxysporum* come bioerbicida si sono avute nel controllo di *Cassia obtusifolia* L., *Cassia occidentalis* L. e *Sesbania exaltata* Rydb. Ex A. W. Hill (Boyette et al., 1993). Non meno interessante è l'impiego di *F. oxysporum* f. sp. *cannabis* per la distruzione delle piantagioni di marijuana (*Cannabis sativa* L.) in California (McCain e Noviello, 1985) e, per lo stesso scopo, di *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* sulle coltivazioni di cocaina (*Erythroxylum coca* Lam.) in Sud America (Sands et al., 1997).

1.4.3 METABOLITI SECONDARI PRODOTTI DA *F. OXYSPORUM*

Pur essendo considerati non-tossigeni da molti autori, gli isolati di *F. oxysporum*, sia patogeni che non, sono in grado di sintetizzare diversi metaboliti secondari bioattivi. La funzione biologica e le caratteristiche tossicologiche di molti di questi composti non sono state ancora completamente definite (Bell et al., 2003). Essi mostrano un'ampia varietà di effetti tossici dovuti alla loro capacità di interagire con differenti organi e/o sistemi (Grottola, 1999). Le differenti attività biologiche manifestate da questi metaboliti nei vari organismi sono causate da interazioni delle stesse e/o dei loro derivati con diversi componenti cellulari, quali DNA, RNA, proteine funzionali, cofattori enzimatici, e costituenti di membrana.

La maggior parte di queste tossine è stata studiata in relazione a problematiche connesse con la salute umana ed animale (azione micotossica), conseguenti all'accumulo di questi composti nei prodotti agricoli e negli alimenti (Amalfitano et al., 2002). Inoltre, l'azione di alcuni di questi metaboliti sembra essere correlata ai rapporti ecologici che i *F. oxysporum* stabiliscono con altri organismi, come la competizione per la colonizzazione della rizosfera, della fillosfera e degli spazi endofitici, o il processo patogenetico a carico di piante colpite da tracheomicosi (azione fitotossica). Alcune tossine sono state anche valutate per le loro proprietà erbicide (es. verso *Striga hermontica*, *Orobanche ramosa*) (Abbas et al., 1991; Hershenhorn et al., 1992;

Zonno e Vurro, 1999; Zonno e Vurro, 2002). I principali metaboliti secondari bioattivi prodotti da *F. oxysporum* sono i seguenti (Leslie e Summerell, 2006):

- Moniliformina (MON), isolata per la prima volta da *Fusarium moniliforme* J. Sheld [*F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg] (Cole et al., 1973), è considerata sia una micotossina che una fitotossina (Abbas et al., 1990). Il suo effetto fitotossico, legato alla comparsa di sintomi quali necrosi e clorosi internervale, è stato ampiamente osservato su grano e tabacco (Abbas et al., 1989; Chelkowski et al., 1990; Marasas et al., 1979). Inoltre, numerose sono le evidenze sperimentali che attestano la sua tossicità su animali, quali polli e ratti (Li et al., 2000).

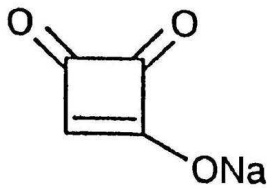


Fig. 1.6. Moniliformina (MON)

- Beauvericina (BEA), è un ciclodepsipeptide studiato per la prima volta per le sue proprietà insetticide (Logrieco et al., 1998). E' un inibitore specifico dell'enzima colesterolo aciltransferasi ed è micotossica verso alcune linee cellulari umane, inducendo morte cellulare programmata simile all'apoptosi e causando citolisi accompagnata da frammentazione del DNA internucleosomiale.

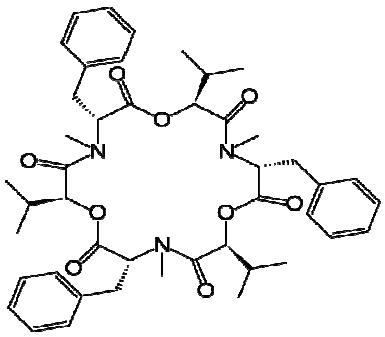


Fig. 1.7. Beauvericina (BEA)

La produzione di BEA sembra essere specifica di alcune forme speciali di *F. oxysporum*, rivestendo un ruolo chiave nel processo di patogenesi che si verifica a carico delle piante ospiti a seguito dell'invasione fungina (Logrieco et al. 1998; Moretti et al., 2002). La BEA è risultata avere attività antifungina nei confronti di isolati aggressivi di *Ceratocystis ulmi* (Buisman) C. Moreau, l'agente della grafiosi dell'olmo (Gemma et al., 1985). Dal punto di vista della struttura chimica, la BEA è correlabile alla famiglia delle enniatine (Logrieco et al., 1998).

- Enniatine (EN), sono un gruppo di cicloesapeptidi, isolati per la prima volta da Gaumann et al. (1947) dal micelio di un isolato di *Fusarium orthoceras* var. *enniatinum* Appi. & Wr. A seconda dei residui aminoacidici N-metilati presenti nella molecola, si distinguono enniatina A, B, C, D, E e F.

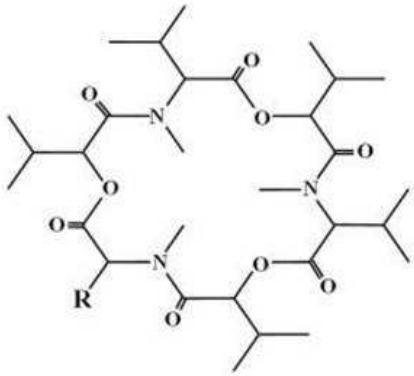


Fig. 1.8. Enniatina A (EN)

Dal punto di vista biologico, l'attività delle EN prodotte da *F. oxysporum* sembra essere associata all'induzione di sintomi di avvizzimento a carico delle piante ospiti (Moretti et al., 2002; Zocher et al., 1982; Zocher et al., 1978). Un esempio è dato dall'enniatina A, estremamente tossica per di piante di pomodoro, su cui produce necrosi del tessuto vascolare e conseguente morte dei tessuti corticali al livello del colletto (Gaumann, 1957). E' stata dimostrata l'attività antifungina delle EN nei confronti di alcuni funghi fitopatogeni tra cui *Eutypa armeniacae* Hansf. & Carter, patogeno dell'albicocco (Bishop e Ilsley, 1978). Le enniatine si sono dimostrate biologicamente attive anche sull'uomo, in cui attivano a livello

cerebrale risposte simili a quelle dovute a prodotti di sintesi come barbiturici e benzodiazepine (Bergendorff et al., 1994).

- Acido fusarico (AF), identificato per la prima volta da Yabuta et al. (1937) come prodotto metabolico di *Fusarium heterosporum* Nees *ex* Fries, rappresenta uno dei primi metaboliti di cui si è scoperta l'implicazione nella patogenesi dell'avvizzimento di piante di pomodoro causato da *F. oxysporum*. (Amalfitano et al., 2002; Bacon et al., 1996; Cohen et al., 2002; Curir et al., 2000; Eged, 2002; Marasas et al., 1984). Tale metabolita presenta una tossicità ad ampio spettro ed è biologicamente attivo nei confronti di piante e animali. Infatti, oltre a rivestire un ruolo nella patogenesi delle tracheofusariosi, l'AF è un comune contaminante di mangimi, è tossico per animali di laboratorio (topi) e presenta proprietà farmacologiche importanti (inibisce un neurotrasmettitore del cervello) (Bacon et al., 2006). Agisce sinergicamente con altre tossine, sia micotossine che fitotossine (es. moniliformina, fumonisine ed enniatina A, aumentandone la tossicità (Bacon et al., 1996).L'AF è stato anche utilizzato come erbicida naturale contro piante infestanti (Capasso et al., 1996; Zonno e Vurro, 2002; Dor et al., 2007).

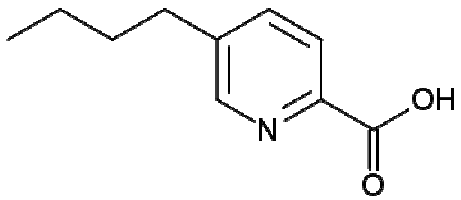


Fig. 1.9. Acido Fusarico (AF)

La produzione di AF da parte di *F. oxysporum*, è frequentemente accompagnata da quella di un suo derivato, l'acido deidrofusarico (ADF). La fitotossicità dell'ADF è notevolmente superiore a quella dell'AF (Gaumann, 1957; Zonno e Vurro, 2002; Capasso et al., 1996; Abouzeid et al., 2004). Come l'AF, anche l'ADF esercita un effetto tessuto-specifico.

Infatti, sul fusto entrambi i metaboliti producono lesioni solo nel tessuto corticale e non nel tessuto vascolare. Sulle foglie danneggiano in modo specifico solo alcune parti del tessuto parenchimatico (Gaumann, 1957).

- Fumonisine (FUM), sono un gruppo di sostanze strutturalmente correlate, prodotte principalmente dalle specie *F. moniliforme* e *F. proliferatum*, sebbene anche altre specie, come *F. oxysporum,* siano potenzialmente in grado di produrle (Cohen et al., 2002; Seo et al., 1996; Seo et al., 1999; Sewram et al., 2005) in quanto possiedono il cluster genico per la produzione di FUM (Proctor et al., 2004). Le fumonisine sono importanti contaminanti del mais (in particolare fumonisine B1, B2 e B3) e sono responsabili di casi di micotossicosi sia di equini che di suini (Grottola, 1999).

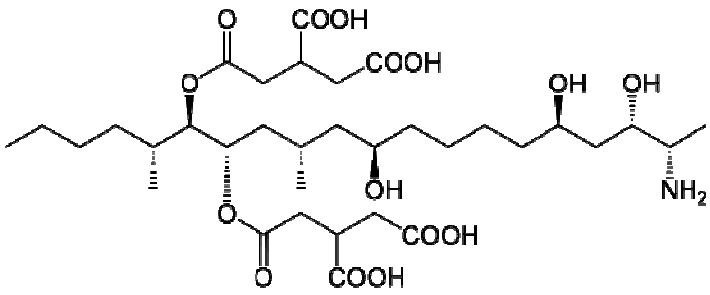


Fig. 1.10. Fumonisina B1 (FUM)

1.5 Strategie di miglioramento dell'efficacia di microrganismi antagonisti e del controllo biologico

La capacità di un microrganismo di attuare il controllo biologico di agenti fitopatogeni può essere migliorata in diversi modi; per esempio alterando l'ambiente in modo da renderlo più favorevole ad esso e alla sua attività, oppure modificando la genetica dell'organismo per produrre nuovi biotipi dotati di migliore adattamento ecologico all'ambiente in cui verrà introdotto (ecological fitness) o in grado di sovraesprimere caratteri importanti ai fini dell'azione antagonistica. Una terza possibilità è operare su entrambi i livelli (Papavizas, 1992).

Oggi, la metodologia senza dubbio più utilizzata per ottenere nuovi biotipi migliorati, è rappresentata dalla manipolazione genetica mediante mutagenesi (induzione di mutazioni casuali lungo la molecola di DNA, seguita da un processo di selezione per i caratteri desiderati) oppure trasformazione (aggiunta o eliminazione di determinate caratteristiche o funzioni mediate da specifici geni) (Hayes et al., 1993). La manipolazione genetica consente di apportare modificazioni stabili a carico del genoma di un microrganismo, con conseguenti cambiamenti della biochimica e della fisiologia dell'organismo manipolato. I potenziali benefici e gli aspetti tecnici della manipolazione genetica sono stati discussi in numerose review (Sumeet e Mukerjii, 2000; Spadaro e Gullino, 2004; Hatvani et al., 2006).

Caratteristiche desiderabili in un agente di biocontrollo, per le quali sono state utilmente impiegate tecniche di manipolazione genetica sono:

- resistenza/tolleranza a metaboliti secondari con attività inibitoria prodotti da altri microrganismi e/o a fungicidi di sintesi;
- capacità di utilizzare alcuni composti organici;
- capacità di produrre alcuni composti legati all'attività antagonistica (es. CWDE e antibiotici);
- resistenza agli stress ambientali (Pusey, 1994).

Sia mutagenesi che metodi di ricombinazione genica (fusione di protoplasti e trasformazione) sono stati utilizzati, in alcuni casi in combinazione tra di loro, per il miglioramento di isolati di *Trichoderma* agenti di biocontrollo (Parekh et al., 2000). Oltre che per il miglioramento delle prestazioni antagonistiche, le tecniche di manipolazione genetica sono state impiegate anche per ottenere ceppi trasformati, difettivi per certi caratteri o che ne sovraesprimono altri, da utilizzare come strumenti per lo studio dei meccanismi d'azione degli agenti di biocontrollo.

1.5.1 MUTAGENESI

Per mutazione genetica si intende ogni modificazione stabile che si verifica a livello della sequenza nucleotidica che compone il genoma di un dato organismo. Tale alterazione può interessare un singolo gene,

porzioni del genoma o l'intero corredo cromosomico, con conseguente alterazione dell'informazione genetica ivi residente. L'organismo portatore della mutazione viene definito mutante.

Oltre che verificarsi spontaneamente in natura, le mutazioni possono essere anche indotte sperimentalmente, mediante tecniche di mutagenesi. Tali metodiche si basano sull'impiego di agenti responsabili della mutazione, detti agenti mutageni. Quest'ultimi, generalmente, vengono distinti in mutageni chimici (per esempio agenti alchilanti quali nitroso guanidina NG, e etilmetansulfonato EMS) e fisici (radiazioni ionizzanti, luce ultravioletta). Gli agenti mutageni sono stati impiegati per indurre mutazioni casuali nel genoma di microrganismi, in modo da ottenere nuovi biotipi con migliorate capacità biocatalitiche e adattative (Parekh et al., 2000). Nel caso di batteri e funghi, la NG è considerata il mutageno per eccellenza, per la moltiplicità delle mutazioni che è in grado di determinare e perché capace di generare la più alta percentuale di mutanti per numero di sopravvissuti (Baltz, 1986). La sua estrema tossicità, però, rende il suo impiego più difficoltoso in termini di sicurezza per l'operatore, rispetto ad altri agenti mutageni.

Sebbene la scelta dell'agente mutageno abbia un'importanza cruciale nell'intera strategia di mutagenesi, la probabilità che una mutazione si verifichi dipende da numerosi altri fattori: tipo di materiale biologico esposto all'agente mutageno (es. spore o conidi), dose del mutageno e tempo di esposizione, tendenza naturale del DNA a creare nuove variazioni del "pool" genico, condizioni di trattamento e post-trattamento, numero frequenza dei trattamenti con il mutageno (Vinci e Byng, 1998). Essendo così tante le variabili in gioco, una fase fondamentale per il successo di questa metodica è rappresentata dalla successiva selezione di ceppi mutanti, che devono essere portatori di mutazioni desiderate (e non di caratteri difettivi o peggiorativi rispetto al ceppo selvatico) che siano stabilmente fissate nel genoma.

La mutagenesi si è dimostrata uno strumento appropriato ed utile per il miglioramento di isolati fungini da impiegare come BCA. In *Trichoderma* spp., la mutagenesi è stata utilizzata largamente (Hatvani et

al., 2006) al fine di aumentare la tolleranza nei confronti di composti tossici (Papavizas et al., 1982; Ferket et al., 2003), come anche per migliorare le capacità di biocontrollo (Papavizas e Lewis, 1983). Mutanti ottenuti mediante mutagenesi chimica e UV, capaci di sovraprodurre metaboliti extracellulari, come per esempio antibiotici ed enzimi degradativi della parete cellulare, hanno mostrato in vitro una maggiore attività antagonistica verso *R. Solani* e *B. cinerea* e sono stati selezionati come potenziali candidati per il biocontrollo di questi agenti patogeni (Graeme-Cook e Faull, 1991; Rey et al. 2001; Szekeres et al., 2004). L'induzione mediante mutagenesi di tolleranza ad alcuni pesticidi ha permesso la selezione di nuovi biotipi di *Trichoderma* spp. compatibili con i prodotti di sintesi e utilizzabili in combinazione con essi nell'ambito di programmi di lotta integrata (Hatvani et al., 2006). Tolleranza a benomyl e a carbendazim è stata ottenuta in isolati di *T. harzianum* e *T. viride* (Papavizas et al., 1982; Papavizas e Lewis, 1983). Jayaraj e Radhakrishnan (2003) hanno dimostrato che il trattamento combinato di piante di cotone con carbendazim a dosi ridotte e con mutanti di *T. harzianum* resistenti al fungicida indotti con gli UV-C, determinava un aumento della biomassa vegetale e riduceva la moria dei semenzai (damping-off) causata da *R. solani*, in condizoni di serra e di pieno campo. Kumar e Gupta (1999) hanno indotto, mediante luce ultravioletta e radiazioni gamma, mutanti di *T. viride* tolleranti al tebuconazole dotati di una maggiore capacità di produrre metaboliti antifungini e hanno ipotizzato che la mutazione avesse attivato qualche via biosintetica, normalmente inattiva, responsabile della produzione di antibiotici. Ahmad and Baker (1988) hanno dimostrato l'acquisizione del carattere della competenza per la rizosfera di piante di cetriolo, mais, ravanello e pomodoro da parte di alcuni mutanti di *T. harzianum*, resi tolleranti al benomyl. Interessanti, infine, sono i recenti risultati ottenuti da Besoain et al. (2007), i quali hanno ottenuto 112 mutanti di *T. harzianum*, di cui 30 mediante irradiazione con luce ultravioletta (UV-A e UV-C), e 82 mediante fusione di protoplasti, capaci di accrescersi in condizioni ambientali estreme, quali basse temperature e pH fortemente basico.

1.5.2 TECNICHE DEL DNA RICOMBINANTE

Oltre che con la mutazione, alterazioni nella molecola del DNA di un organismo possono essere ottenute mediante ricombinazione genetica. Per ricombinazione genetica si intende ogni processo attraverso il quale, a partire da un genotipo, si ottengono nuove combinazioni di alleli rispetto a quelle iniziali. La ricombinazione agisce, quindi, direttamente sul materiale genetico, che nella maggior parte dei casi è costituito da DNA, per cui i metodi che utilizzano questo tipo di manipolazione genetica vengono comunemente definite "tecniche del DNA ricombinante". In particolare, tali tecniche vengono adottate per ottenere nuove molecole di DNA con caratteristiche specifiche e definite, mediante una manipolazione del patrimonio genetico di una cellula basata sull'unione di tratti di DNA (geni o parti di essi, ad esempio sequenze codificanti e/o regolatrici) provenienti da cellule differenti dello stesso organismo o di organismi diversi. Sebbene estremamente specifica e persino puntiforme nella variazione ottenibile, questa manipolazione genetica è tecnicamente più complessa della mutagenesi e non priva di imprevedibilità nei risultati. Infatti, il trasferimento di singoli geni avviene con relativa facilità nei batteri, per la loro naturale capacità di scambiare materiale genetico anche tra specie diverse, ma è notevolmente più difficoltoso nel caso di eucarioti, come funghi, animali e piante, trattandosi di sistemi geneticamente molto complessi.

Nei funghi, le possibili strategie metodologiche utilizzabili per ottenere la ricombinazione genica sono:

- la trasformazione genica, che consiste nell'inserimento attraverso l'ausilio di vettori genici, come per esempio virus, fagi, batteriofagi, plasmidi batterici, di nuovo materiale genetico di interesse (un segmento di DNA) capace di replicarsi ed esprimersi nell'organismo ospite. L'incorporazione del DNA nell'ospite richiede il superamento della parete/membrana cellulare che può avvenire attraverso l'applicazione di diverse procedure sperimentali tra cui il metodo del "calcio-fosfato", l'impiego di lisosomi, l'elettroporazione oppure la microiniezione;

- la fusione di protoplasti, che consiste nell'unione di due cellule geneticamente distinte per dare origine ad una nuova cellula con DNA ibrido (fusante) avente le caratteristiche genetiche di entrambe le cellule parentali e, pertanto, nuovi caratteri. Le cellule parentali possono appartenere alla stessa specie oppure a specie diverse. E' abbastanza comune l'impiego come cellule parentali di mutanti auxotrofi per due diverse sostanze (per esempio due aminoacidi) per poter individuare i fusanti dalla capacità di crescere su di un substrato privo di entrambe le sostanze. Una fase critica di questa metodica è l'ottenimento di protoplasti, che normalmente avviene attraverso l'impiego di CWDE in grado di rimuovere le pareti cellulari dei tubuli germinativi o delle ife. Inoltre, per la preparazione dei protoplasti è anche richiesta la presenza di stabilizzatori osmotici.

Le applicazioni attuali o potenziali delle tecniche del DNA ricombinante in agricoltura sono varie ed eterogenee. La maggior parte di queste applicazioni hanno interessato le piante, allo scopo di ottenere nuove varietà, migliorate nelle caratteristiche organolettiche, merceologiche o agronomiche (per esempio dotandole di un più efficiente sistema di difesa nei confronti di patogeni e fitofagi). Tuttavia, le metodiche del DNA ricombinante sono risultate efficaci anche per rendere i microrganismi più idonei ad alcune utilizzazioni biotecnologiche, tra cui la lotta biologica, oppure per individuare, isolare e caratterizzare geni o prodotti genici coinvolti nei meccanismi di biocontrollo. Come per la mutagenesi, ci sono numerosi esempi in letteratura di applicazioni di tecniche del DNA ricombinante per il miglioramento di BCA. Per esempio, un isolato di *Gliocladium virens* (Miller, Giddens et Foster) Arx è stato reso tollerante a benomyl mediante inserzione nei protoplasti del gene della beta tubulina di *Neurospora crassa* Shear & Dodge (Ossana e Mischke, 1990). La fusione di protoplasti è stata utilizzata in *T. harzianum* per ottenere un ceppo (il ceppo 1295-22) che combinava le caratteristiche di competenza per la rizosfera ed efficacia di biocontrollo possedute dai due ceppi parentali (T95 e T12, rispettivamente), auxotrofi per la lisina e l'istidina (Sivan e Harman, 1991). Sempre utilizzando due

mutanti auxotrofi di *T. harzianum* è stato ottenuto un ceppo prototrofo, capace di controllare gli agenti fitopatogeni *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc., e *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. (Pe'er e Chet, 1990). Anche la sovraespressione di geni responsabili della produzione di antibiotici rientra tra i più comuni obiettivi della manipolazione genetica. Per esempio, un maggior livello di espressione di oomicina, un antibiotico implicato nella sopressione del maricume radicale causato da *Phytium* spp., è stato ottenuto in isolati ricombinanti di *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Orla-Jensen (Lucas, 1998). Ancora, una maggiore efficacia micoerbicida nei confronti di *O. aegyptiaca* è stata riscontrata in un isolato di *F. oxysporum* ed un isolato di *Fusarium arthrosporioides* (Sherb), trasformati mediante inserzione dei due geni *iaaM* e *iaaH*, codificanti intermedi metabolici della via biosintetica che porta alla produzione dell'Acido Indolo-3-acetico (IAA), una delle molecole del gruppo delle auxine (Cohen et al., 2002).

1.6 SCOPO DELLA TESI

Obiettivo di questo lavoro di tesi è stato il miglioramento della tolleranza dell'isolato *T. harzianum* ITEM 908 (Th908), per il quale è in corso la registrazione europea come biopesticida, all'azione tossica di metaboliti di *F. oxysporum*. Ciò al fine di **I)** migliorare le prestazioni antagonistiche del ceppo Th908 nei confronti di forme fitopatogene di *F. oxysporum* e **II)** rendere possibile l'uso combinato del ceppo Th908 con ceppi non fitopatogeni di *F. oxysporum.*

Il lavoro si basa sull'ipotesi che sostanze con attività antifungina eventualmente prodotte da *F. oxysporum* possano avere la funzione di assicurare un vantaggio competitivo nell'interazione con *T. harzianum* nella rizosfera. Pertanto, una maggiore tolleranza di *T. harzianum* all'azione dei metaboliti conferirebbe anche una maggiore competitività nei confronti di *F. oxysporum* e una maggiore efficacia antagonistica.

Una delle possibili strategie per aumentare il livello di controllo delle fitopatie ottenibile con mezzi biologici, rendendo nel contempo la lotta

biologica di più semplice attuazione, è l'impiego combinato di due o più BCA (Guetsky et al., 2001). L'impiego combinato di due o più microrganismi dotati di diversi meccanismi d'azione potrebbe portare non pochi vantaggi in termini di efficacia e spettro d'impiego (inteso come varietà di sistemi vegetali, organismi bersaglio e condizioni ambientali). Per poter far ciò è però indispensabile valutare attentamente la compatibilità degli agenti di biocontrollo da utilizzare congiuntamente, per assicurarsi che i componenti del consorzio microbico esprimano la loro azione nei confronti degli organismi bersaglio e non uno contro l'altro (Migheli e Gullino, 1990). Per esempio, la produzione di metaboliti secondari con attività antifungina e/o antibatterica, da parte di un BCA, potrebbe avere effetti deleteri su coinoculanti fungini o batterici, influenzando negativamente la loro crescita e l'efficacia del biocontrollo. In casi come questo, lo sviluppo di isolati con maggiore tolleranza verso i metaboliti con attività antimicrobica, potrebbe portare a migliorare le prestazioni di biocontrollo del consorzio microbico (Notz et al., 2002).

Dopo aver saggiato l'attività antifungina dei metaboliti bioattivi prodotti dai due isolati di *F. oxysporum*, l'isolato fitopatogeno Fo2797 e l'isolato micoerbicida FoFT2, ed averli successivamente identificati, è stata utilizzata la tecnica di mutagenesi mediante irraggiamento con UV-C per ottenere mutanti di *T. harzianum* resistenti all'azione inibente dei metaboliti antifungini prodotti dai due isolati di *F. oxysporum*.

I mutanti così ottenuti sono stati sottoposti ad ulteriori indagini al fine di:

- valutare la resistenza nei confronti dei metaboliti antifungini prodotti dagli isolati di *F. oxysporum*;
- valutare in vivo importanti caratteristiche fisiologiche, quali la competenza per la rizosfera e l' "ecological fitness";
- valutare in vivo la capacità di biocontrollo nei confronti del ceppo patogeno di *F. oxysporum*;
- valutare, in vivo l'interazione con l'isolato non patogeno di *F. oxysporum* per un potenziale impiego combinato;

- condurre uno studio preliminare di espressione differenziale di geni putativamente implicati nel fenomeno della Multi Drug Resistance (MDR), allo scopo di indagare le basi molecolari della resistenza acquisita per effetto della mutazione.

2. MATERIALI E METODI

2.1 ISOLATI FUNGINI UTILIZZATI

Nel corso di questo studio sono stati impiegati un isolato di *Trichoderma harzianum* Rifai dotato di attività antagonistica, un isolato di *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl patogeno per la pianta parassita *Orobanche ramosa* L. e un isolato di *F. oxysporum* patogeno per il Pomodoro.

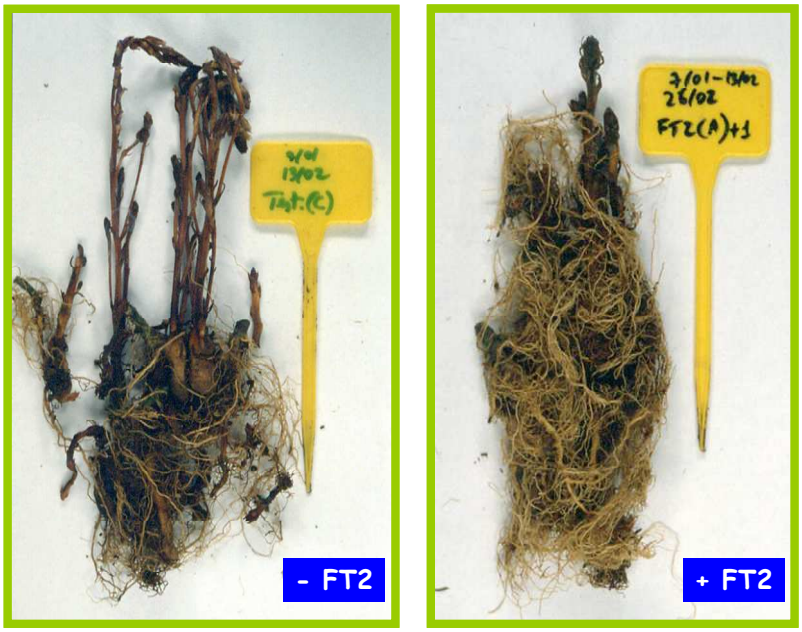
Il ceppo antagonistico *T. harzianum* ITEM 908 (Th908) proveniva dalla collezione dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari del CNR di Bari (ISPA-CNR). Questo fungo è stato isolato da materiale vegetale raccolto in Puglia nell'ambito di un programma di selezione di funghi antagonisti di provenienza autoctona. In prove di laboratorio è risultato in grado di ridurre significativamente (> 60%) la crescita di *Rhizoctonia solani* Kuhn, il principale agente di marciumi radicali di colture orticole in Puglia. Nel corso di prove di efficacia condotte su Pomodoro da mensa in pieno campo, l'applicazione del ceppo Th908 all'apparato radicale al momento del trapianto ha determinato una riduzione del 30% dell'incidenza di marciumi parenchimatici precoci e tardivi (Fig. 2.1). Nel corso di queste prove è stata tuttavia riscontrata una ridotta efficacia nei confronti di specie fitopatogene appartenenti al genere *Fusarium* (*F. equiseti*, *F. oxysporum* e *F. solani*), che venivano frequentemente isolate da piante sintomatiche, successivamente al trattamento con l'antagonista (Altomare, comunicazione personale).

Recentemente questo isolato è stato utilizzato in Emilia Romagna nell'ambito di un programma sperimentale per la prevenzione della Maculatura Bruna del Pero [*Stemphylium vesicarium* (Wallroth) Simmon], con risultati molto positivi (Pattori et al., 2008; Rossi e Pattori, 2009). Il ceppo Th908 è stato utilizzato per lo sviluppo di un biofitofarmaco commerciale, attualmente in corso di registrazione secondo la Direttiva del Consiglio delle Comunità Europee n.414 del 15 luglio 1991 (91/414/CEE) relativa all'immissione in commercio di prodotti fitosanitari.

Fig. 2.1. A) Trattamento di giovani piantine di pomodoro con il fungo antagonista Th908 al momento del trapianto mediante spolveratura dell'apparato radicale. **B)** Piante adulte di pomodoro. A sinistra pianta sana (trattata con Th908), a destra pianta malata (testimone): si osserva lo strozzamento e il disseccamento della parte basale del fusto.

L'isolato *F. oxysporum* FT2 (FoFT2), anch'esso proveniente dalla collezione dell'ISPA-CNR, è stato originariamente isolato da turioni di *O. ramosa*, prelevati da campi di pomodoro e tabacco fortemente infestati da questa pianta parassita. FoFT2 e altri 53 isolati appartenenti al genere *Fusarium* sono stati sottoposti ad analisi chimiche e biologiche finalizzate alla valutazione della patogenicità e della virulenza nei confronti di *O. ramosa* e del loro potenziale impiego come micoerbicidi (Abouzeid et al., 2004). In un saggio preliminare, condotto in coltura idroponica di Pomodoro, l'isolato FoFT2 è risultato tra i più virulenti, in termini di gravità di sintomi e rapidità di effetto sui tubercoli di *Orobanche*. Successivamente, prove condotte in serra, hanno evidenziato la capacità di FoFT2 di inibire notevolmente (70%) lo sviluppo dei germogli di *O. ramosa*, oltre che di determinare effetti benefici sull'apparato radicale delle piante di Pomodoro trattate (Boari e Vurro, 2004) (Fig. 2.2). Inoltre, è stata esclusa la fitopatogenicità di FoFT2 per alcune importanti colture di interesse agrario appartenenti alle famiglie Solanaceae (pomodoro, melanzana), Apiaceae (carota), Fabaceae (fava, cece) e Asteracee (lattuga) (Boari e Vurro, 2004). Sulla base di questi risultati, il ceppo FoFT2 è stato individuato come un promettente candidato per la lotta biologica a *O. ramosa*.

L'isolato *F. oxysporum* ITEM 2797 (Fo2797) è stato utilizzato come fungo "bersaglio" nelle prove di antagonismo *in vitro* e *in vivo* condotte con il ceppo Th908 e con i mutanti da esso ottenuti. L'isolato Fo2797 è risultato particolarmente virulento in prove di patogenicità su Pomodoro, condotte con diversi isolati di *Fusarium*.



Fonte: Boari e Vurro, 2004

Fig. 2.2. Effetto del micoerbicida FoFT2 sull' apparato radicale di piante di pomodoro infestate da *Orobanche ramosa*. Si possono osservare il ridotto sviluppo e le diffuse aree necrotiche dell' apparato radicale nel non trattato in confronto al trattato.

2.2 SUBSTRATI DI COLTURA UTILIZZATI

I substrati liquidi e agarizzati impiegati in questo studio sono stati preparati utilizzando acqua distillata e la sterilizzazione è avvenuta in autoclave a 0,75 atm (115 °C) per 20 min., quando non altrimenti specificato.

- **AA:** Agar-Acqua.

Agar Technical (Oxoid)	12,0	g/L

- **AH:** Substrato di Adams e Hanson (1972).

Glucosio	25,0	g/L
NH_4 tartrato	2,0	g/L

NH_4Cl	2,0	g/L
KH_2PO_4	2,0	g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0	g/L
$Fe\ SO_4 \cdot 7H_2O$	0,01	g/L

Prima della sterilizzazione, portare a pH 6,0 con NaOH 5 N.

- **AH ½ forza:** Substrato di Adams e Hanson ½ forza.

Glucosio	12,5	g/L
NH_4 tartrato	1,0	g/L
NH_4Cl	1,0	g/L
KH_2PO_4	1,0	g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	g/L
$Fe\ SO_4 \cdot 7H_2O$	0,005	g/L

Prima della sterilizzazione, portare a pH 6,0 con NaOH 5 N.

- **AHA:** Substrato di Adams e Hanson agarizzato.

  Aggiungere ad AH 20,0 gr/L di agar.

- **CLA:** Carnation-Leaf-Agar (Fisher et al., 1982).

  Aggiungere ad AA solidificato alcune pezzi di foglie di garofano preventivamente sterilizzate con ossido di propilene.

- **CD:** Brodo di Czapek Dox in tampone fosfato pH 7,0.

  Sciogliere 31,5 g di Czapek-Dox-Broth (Difco, Detroit, MI, USA) in 1 L di tampone fosfato a pH 7,0.

- **MDP**: Estratto di Malto-Destrosio-Peptone.

Estratto di Malto	20,0	g/L
Destrosio	20,0	g/L
Peptone	1,0	g/L
Agar	20,0	g/L

- **PDA**: Patata-Destrosio-Agar.

Potato-Dextrose-Agar (Oxoid)	39,0	g/L

- **PDB:** Brodo di Patata-Destrosio.

Potato-Dextrose-Broth (Oxoid)	24,0	g/L

- **PCNB:** Selettivo per *Fusarium* spp. (Nelson et al., 1983).

Peptone	15,0	g/L
KH_2PO_4	1,0	g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	g/L
Agar	20,0	g/L
Pentacloronitrobenzene	0,75	g/L

Controllare che il pH sia compreso tra 5,5 e 6,5 e sterilizzare in autoclave. Lasciare raffreddare fino a 55 °C ed aggiungere 20 ml di una soluzione al 5% (p/vol) di streptomicina solfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in acqua distillata sterile, e 12 ml di una soluzione all' 1% (p/vol) di neomicina solfato (Sigma-Aldrich) in acqua distillata sterile.

- **RM:** Substrato di Richard Modificato (Altomare et al., 1999).

KNO_3	10,0	g/L
KH_2PO_4	5,0	g/L
$MgSO_4$	1,3	g/L
Saccarosio	20,0	g/L
Soluzione di microlementi*	1,0	mL
$FeCl_3$	0,02	g/L

Prima della sterilizzazione, portare a pH 6,0 con NaOH 5 N.

**Soluzione di mcroelementi (sciogliere in 50 mL acqua distillata):*

Zn $SO_4 \cdot 7H_2O$	0,175	g
Cu $SO_4 \cdot 5H_2O$	0,02	g
Mn $SO_4 \cdot H_2O$	0,015	g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$	0,0065	g

- **SNA:** Spezieller-Nahrstoffarmer-Agar (Nirenberg, 1981).

KH_2PO_4	1,0	g/L
KNO_3	1,0	g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	g/L
KCl	0,5	g/L
Glucosio	0,2	g/L
Saccarosio	0,2	g/L
Agar	20,0	g/L

- **TSM:** *Trichoderma* Selective Medium (Smith et al., 1990).

$Ca(NO_3)_2$	1,44	g/L
KNO_3	0,26	g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,26	g/L

KH_2PO_4	0,12	g/L
$CaCl_2$	1,0	g/L
Acido citrico	0,05	g/L
Saccarosio	2,0	g/L
Agar	20,0	g/L
Igepal 630	500	µl/L

Dopo la sterilizzazione, lasciare raffreddare fino a 55°C ed aggiungere:

Clorotetraciclina	0,05	g/L
Captan	0,04	g/L
Vinclozolin	0,00125	g/L

2.3 SAGGIO DI PATOGENICITÀ DI ISOLATI DI *FUSARIUM* SU POMODORO

L'indagine ha riguardato cinque isolati di *F. oxysporum* (ITEM 1586, ITEM 2793, ITEM 2795 , ITEM 2796 e ITEM 2797) e tre di *F. solani* (ITEM 3799, ITEM 3804, ITEM 3795) ed è stata condotta utilizzando il metodo messo a punto da Sanchez et al. (1975). Tutti gli isolati saggiati provenivano da piante di Pomodoro affette da marciume radicale e sono stati ottenuti dalla collezione micologica dell'ISPA-CNR.

Semi di pomodoro della cv. Marmande sono stati sterilizzati esternamente tramite immersione in una soluzione al 4 % (p/vol) di ipoclorito di sodio (NaClO) per 10 minuti e poi sciacquati ripetutamente con acqua sterile. I semi sono stati posti a germinare in capsule Petri contenenti carta bibula imbevuta di acqua sterile, a 25 °C e al buio per 48 h. Dopo tale periodo, i semi germinati sono stati trasferiti in capsule Petri (10 semi per piastra) di 90 mm di diametro, contenenti 20 ml di CLA e le piastre sono state inoculate con 6 dischetti (diametro 6 mm) di micelio provenienti da colture degli isolati di *Fusarium* su PDA. Il testimone negativo è stato preparato ponendo i semi di pomodoro sterili in piastre contenenti CLA non inoculato. La prova è stata allestita in triplicato. Le piastre sono state poste in incubatore al buio a 25 °C per dieci giorni. Al termine di questo periodo sono stati valutati i sintomi a livello delle radichette, sulla base della seguente scala arbitraria: **0** = nessun

sintomo; **1** = accorciamento senza imbrunimento; **2** = imbrunimento localizzato; **3** = imbrunimento esteso per meno di 1 cm; **4** = imbrunimento esteso per più di 1 cm, ma non completo; **5** = imbrunimento completo / disseccamento della pianta.

La patogenicità di ciascun isolato è stata valutata mediante la determinazione dell'intensità media ponderata della malattia, o indice di McKinney (McKinney, 1923), di un campione di trenta piantine. L'indice di McKinney è stato calcolato con la formula:

$$McK = [\Sigma(c \times f)/N \times X] \times 100$$

Dove:

McK = indice di McKinney;

c = classe di malattia osservata sui germinelli di pomodoro;

f = frequenza della classe considerata;

N = numero totale di germinelli

X = valore della classe più elevata presente nella scala empirica.

I valori degli indici di McKinney, espressi in percentuale, sono stati trasformati in valori angolari [arcsen√(McK/100)] e sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA).

2.4 Conservazione degli isolati

Allo scopo di preservare le caratteristiche fisiologiche e biosintetiche dei ceppi fungini oggetto di questo studio, gli isolati sono stati conservati in gel di silice a -20°C (Dhingra e Sinclair, 1985). Per la conservazione degli isolati per periodi brevi e per la produzione di sub-colture sono state utilizzate colture fresche su substrati agarizzati (PDA per *T. harzianum* e SNA per *F. oxysporum*), mantenute a 5 °C.

2.5 Interazione tra *T. harzianum* Th908 e *F. oxysporum*

L'interazione tra il ceppo Th908 e *F. oxysporum* è stata studiata mediante saggi di antagonismo in vitro e in vivo.

2.5.1 INTERAZIONE IN VITRO (COLTURA DUALE)

L'influenza esercitata reciprocamente sulla crescita delle colonie fungine e il tipo di relazione simbiotica (commensalistica, mutualistica o antagonistica) intercorrente tra i due funghi è stata studiata in coltura duale, su tre diversi substrati agarizzati: AHA, MDP e RM. In queste prove, Th908 è stato posto a confronto sia con FoFT2 che con Fo2797.

Capsule Petri (diametro 9 cm) contenenti 12 ml di substrato sono state inoculate, in due punti distanti 5 cm l'uno dall'altro, con dischetti micelici (diametro 6mm) di Th908 e di *F. oxysporum* prelevati da colture di 3 giorni su PDA. Le piastre sono state poi poste ad incubare a 25°C. Quotidianamente si è misurato l'accrescimento radiale di entrambi gli isolati sia verso il bordo della capsula, sia verso l'altro fungo (Fig. 2.3), in tre repliche per ciascun substrato impiegato. E' stata quindi calcolata l'inibizione percentuale della crescita, utilizzando la formula:

$$I\ \% = [(Rm - rm)/ Rm] \times 100$$

Dove:

Rm = accrescimento radiale del fungo verso il bordo della capsula

rm = accrescimento radiale del fungo verso l'altro isolato presente nella piastra.

I valori di I % sono stati trasformati in valori angolari e sottoposti ad analisi della varianza.

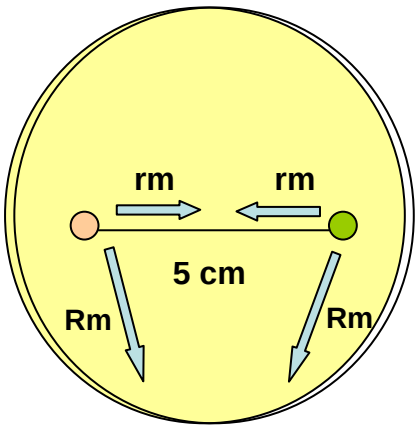


Fig. 2.3. Rappresentazione schematica delle colture duali, utilizzate per la valutazione in vitro dell'interazione tra Th908 (verde) e *F. oxysporum* (rosa).

Dopo 21 giorni, il tipo di interazione tra i due funghi è stato valutato qualitativamente, impiegando la seguente scala (Whipps, 1987):
1 = *F. oxysporum* si arrestava e Th908 cresceva su *F. oxysporum*; **1/2** = Th908 cresceva su *F. oxysporum*, ma *F. oxysporum* continuava a crescere; **2/1** = *F. oxysporum* cresceva su Th908, ma Th908 continuava a crescere; **2 =** Th908 si arrestava e *F. oxysporum* cresceva su Th908; **3** = Lieve inibizione reciproca (zona di inibizione tra le colonie di circa 2 mm); **4** = Forte inibizione reciproca (zona di inibizione tra le colonie maggiore di 4 mm).

2.5.2 INTERAZIONE IN VIVO SU GERMINELLI DI POMODORO

Questa prova è stata condotta allo scopo di valutare la capacità antagonistica di Th908 nei confronti del ceppo fitopatogeno Fo2797.

Semi di pomodoro della cv. Marmande sono stati sterilizzati esternamente e posti a germinare in capsule Petri come descritto in precedenza (paragrafo 2.3). I semi che presentavano una buona energia germinativa e una morfologia regolare sono stati inoculati con Th908 strisciandoli brevemente sulla superficie di una colonia in attiva sporificazione, in modo da ottenere un'abbondante e uniforme copertura del seme con i conidi dell'antagonista.

Capsule Petri (diametro 90 mm) contenenti 20 ml di CLA sono state inoculate spruzzando con un diffusore spray una sospensione conidica (1 x 10^2 conidi/ml) di Fo2797. Dieci semi di pomodoro ricoperti con le spore di Th908 sono stati quindi trasferiti in ciascuna piastra di CLA. La prova comprendeva inoltre un testimone Th908 (semi inoculati con la sospensione dell'antagonista su CLA non inoculato), un testimone Fo2797 (semi sterili su CLA inoculato con la sospensione del patogeno), e un testimone negativo (semi sterili su CLA non inoculato). Ogni tesi è stata saggiata in triplicato. Le piastre sono state incubate al buio, a 25°C per dieci giorni.

Alla fine del periodo di incubazione, si è valutato l'effetto di Th908, di Fo2797 e dalla co-inoculazione dei due funghi sui germinelli di pomodoro a livello dell'ipocotile e della radichetta, utilizzando una scala arbitraria

per la valutazione dei sintomi e calcolando l'indice di McKinney per i diversi trattamenti, in modo simile a quanto descritto nel paragrafo 2.3.

2.6 PRODUZIONE DI ESTRATTI COLTURALI DI *F. OXYSPORUM* CON ATTIVITA' ANTIFUNGINA

La produzione di metaboliti secondari con attività antifungina da parte degli isolati FoFT2 e Fo2797 è stata valutata coltivando i due isolati in substrato liquido. I filtrati colturali sono stati successivamente sottoposti ad estrazione liquido-liquido e l'attività antifungina degli estratti è stata saggiata su *Geotrichum candidum* (Link Ex Pers.) e Th908.

2.6.1 PRODUZIONE DI FILTRATI COLTURALI DI *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797

Al fine di valutare le migliori condizioni di crescita per la produzione di metaboliti con attività antifungina da parte di *F. oxysporum*, l'isolato FoFT2 è stato coltivato su 3 substrati liquidi, AH, MDP e RM modificato.

Beute da 250 ml contenenti 100 ml di substrato liquido (5 beute/substrato) sono state inoculate con 1 ml di una sospensione di conidi di FoFT2 contenente 1 x 10^5 conidi/ml e le colture sono state incubate in agitatore orbitale a 160 rpm, 25 °C, al buio. Per ogni substrato utilizzato è stato inoltre predisposto un testimone non inoculato.

Dopo 2, 4, 7, 10 e 14 giorni dall'inoculazione, una beuta di ciascun substrato è stata prelevata e le colture sono state filtrate attraverso filtri di carta Whatman n. 4 (diametro 90 mm) (Whatman International LTD, Maidstone, UK) per eliminare micelio e conidi. I filtrati colturali e il testimone sono stati sottoposti a determinazione del pH e conservati in congelatore a – 20 °C fino al momento dell'estrazione dei metaboliti.

Sulla base dei risultati relativi alla produzione di filtrati colturali con attività antifungina da parte dell'isolato FoFT2, la produzione di filtrati colturali attivi dell'isolato Fo2797 è avvenuta utilizzando solo il substrato AH e le colture sono state incubate per 14 giorni.

2.6.2 ESTRAZIONE DI METABOLITI DA BRODI DI COLTURA DI *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797

50 ml di filtrato colturale sono stati trasferiti in un imbuto separatore e sottoposti ad estrazione liquido-liquido con 30 ml di cloruro di metilene. Dopo la separazione delle fasi, l'estratto organico (fase inferiore) è stato raccolto in un pallone da vuoto, mentre la fase acquosa (fase superiore) è stata sottoposta ad estrazione con cloruro di metilene per altre due volte al fine di conseguire l'estrazione esaustiva della componente organica. Le tre frazioni organiche sono state riunite e la fase acquosa esausta è stata raccolta, liofilizzata e conservata a -20 °C in attesa delle successive analisi.

L'estratto organico è stato concentrato in evaporatore rotativo, con bagnomaria a 45 °C e pressione ridotta. L'estratto concentrato è stato trasferito in una provetta e portato a secco in bagnomaria a 45 °C, sotto flusso di azoto. Il residuo è stato ri-dissolto in 0,5 ml di metanolo e conservato in congelatore a -20 °C. Allo stesso procedimento sono stati sottoposti anche i substrati non inoculati utilizzati come testimoni.

2.6.3 SAGGIO DI ATTIVITA' ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI DI *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797 SU *G. CANDIDUM*

Il saggio di inibizione della crescita del fungo *G. candidum* è stato utilizzato per valutare la presenza di composti con attività antifungina negli estratti organici di Fo2797 e di. FoFT2e nelle fasi acquose esauste delle colture di FoFT2.

Dischetti di cellulosa per saggio di antibiosi del diametro di 6 mm (Difco) sono stati imbevuti con 20 µl di estratto organico, (equivalenti a 2 ml di filtrato colturale) di FoFT2 o con diverse quantità (10, 20, 30 µl) di estratto organico di Fo2797. Dopo aver lasciato evaporare il solvente, i dischetti sono stati posti in capsule Petri di 90 mm di diametro, contenenti 7 ml di PDA. Quindi, utilizzando un microdiffusore a pressione (Ecospray, Labo Chimie, Aix-en-Provence, Francia) le piastre sono state inoculate con una sospensione di artroconidi di *G. candidum*, ottenuta diluendo 1 ml di una coltura del fungo in PDB in 9 ml di acqua sterile. Le piastre sono state

incubate a 25 °C per 24 ore, al buio. L'attività antifungina è stata valutata misurando il diametro (mm) dell'alone di inibizione dell'accrescimento di *G. candidum* in corrispondenza dei dischetti.

Le fasi acquose esauste delle colture di FoFT2, sono state saggiate mediante il metodo del *"soft agar overlay"*. In capsule Petri di 90 mm di diametro, contenenti 15 ml di PDA solidificato, sono stati versati 5 ml di "soft" AA [AA allo 0,7% (p/vol) di agar] alla temperatura di 55 °C, preparato addizionando 0,5 ml di una sospensione di artroconidi di *G. candidum* di concentrazione 1 x 10^5 conidi/ml a 4,5 ml di soft AA. Dopo la solidificazione del soft AA, sono stati praticati con un fora tappi 6 pozzetti (diametro 10 mm) su ogni piastra e in ciascun pozzetto sono stati dispensati 200 µl della fase acquosa da saggiare. Le piastre sono state incubate a 25 °C per 24 ore. L'attività antifungina è stata valutata misurando il diametro dell'alone di inibizione dell'accrescimento fungino in corrispondenza dei diversi pozzetti.

2.6.4 INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI *T. HARZIANUM* TH908 DA PARTE DI METABOLITI PRODOTTI DA *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797

L'attività antifungina degli estratti organici degli isolati FoFT2 e Fo2797 è stata saggiata sul fungo antagonista Th908. Questo saggio è stato condotto su substrato agarizzato (PDA), a cui sono stati aggiunti gli estratti organici ottenuti dalle colture liquide degli isolati di *F. oxysporum*, coltivati su AH per 14 giorni.

I residui secchi degli estratti dei due isolati di *F. oxysporum* sono stati disciolti in un volume di metanolo corrispondente all'1% del volume iniziale del filtrato colturale e diverse quantità (200, 100, 50 e 25 µl) della soluzione sono state dispensate in provette di vetro sterili. Dopo aver fatto evaporare il solvente in bagnomaria a 50 °C ed aver sciolto i residui in 40 µl di metanolo, 4 ml di PDA a 55 °C sono stati versati in ciascun tubo. Il contenuto delle provette è stato mescolato accuratamente e versato in capsule Petri di 5 cm di diametro, in modo da ottenere PDA contenente il 5%, 2.5%, 1.25%, o 0.62% (vol/vol) di estratto e l'1% (vol/vol) di metanolo. Le piastre utilizzate come testimone sono state

preparate sciogliendo 40 µl di metanolo in 4 ml di PDA. Le piastre sono state inoculate con singoli conidi germinati di Th908 ed incubate a 25°C, al buio. La prova è stata condotta in triplicato.

Dopo 24, 48 e 72 h di incubazione è stato misurato l'accrescimento diametrale (mm) della colonia di Th908. E' stata quindi calcolata l'inibizione percentuale della crescita dell'isolato, con la formula:

$$I\% = [(\varphi_T - \varphi_E)/ \varphi_T] \times 100$$

Dove:

φ_T = diametro della colonia nelle piastre di controllo (testimone)

φ_E = diametro della colonia nelle piastre contenenti l'estratto

I valori di inibizione % sono stati trasformati in valori angolari e sottoposti all'analisi della varianza.

2.7 IDENTIFICAZIONE DEI METABOLITI BIOATTIVI PRODOTTI DA *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797

2.7.1 ANALISI CROMATOGRAFICA DI ENNIATINA E BEAUVERICINA

Gli estratti organici dei due isolati di *F. oxysporum* aventi attività antifungina sono stati esaminati per la presenza di enniatina (EN) e beauvericina (BEA) mediante cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography, TLC).

10 µl di ciascun estratto, 5 µl di una soluzione standard di EN (Sigma–Aldrich) di concentrazione 1 mg/ml in metanolo e 5 µl di una soluzione standard di BEA (Sigma–Aldrich) di concentrazione 1 mg/ml in metanolo sono stati caricati, per mezzo di microcapillari di vetro, in tre punti lungo la linea di riferimento posta a 1,5 cm dal bordo inferiore di una lastra cromatografica 10 x 10 cm al gel di silice con indicatore di fluorescenza (HPTLC, silica gel 60 F_{254}) (Merck, Darmstadt, Germania). La lastra è stata sviluppata per i 2/3 della sua lunghezza in una camera cromatografica contenente una soluzione di sviluppo costituita da cloroformio:isopropanolo 95/5 (v/v).

La lastra cromatografica, dopo essere stata asciugata con un getto di aria calda, è stata osservata sotto luce UV di lunghezza d'onda 254 nm e le macchie fluorescenti sono state marcate a matita. Infine, la lastra è stata esposta a vapori di iodio. EN e BEA apparivano cromatograficamente come macchie con Rf rispettivamente di 0,82 e 0,88, non fluorescenti, che non estinguevano la fluorescenza delle lastre con indicatore e che assumevano una tinta marrone quando esposte a vapori di iodio.

2.7.2 ANALISI DI ACIDO FUSARICO MEDIANTE TLC

L'analisi qualitativa volta a determinare la presenza di acido fusarico (AF) negli estratti degli isolati FoFT2 e Fo2797 è stata condotta mediante TLC.

1 µl di estratto organico dei due isolati di *F. oxysporum* e 5 µl di soluzione standard di AF (Sigma–Aldrich) di concentrazione 1 mg/ml in etanolo sono state caricate su una lastra cromatografica 10 x 10 cm al gel di silice con indicatore di fluorescenza (HPTLC, silica gel 60 F_{254}) (Merck).

La lastra è stata sviluppata in camera cromatografica, utilizzando due diversi solventi di sviluppo: isopropanolo:acetato di etile:acqua:acido acetico nel rapporto volumetrico 4:3,8:2:0,2 (soluzione A) e isopropanolo:butanolo:acqua:ammonio idrossido nel rapporto volumetrico 6:2:1,5:0,5 (soluzione B) (Burmeister et al., 1985).

Dopo essere stata sviluppata ed asciugata mediante un getto di aria calda, la lastra è stata osservata sotto luce UV di lunghezza d'onda 254 nm. L'AF appariva cromatograficamente come una macchia di Rf 0,87 e 0,65 rispettivamente nei sistemi A e B e che estingueva la fluorescenza delle lastre con indicatore.

2.7.3 QUANTIFICAZIONE DI ACIDO FUSARICO E ACIDO 9,10-DEIDROFUSARICO

Alla luce dei risultati qualitativi ottenuti con l'analisi TLC, si è proceduto alla quantificazione di AF e del suo derivato, l'acido 9,10-deidrofusarico (ADF) negli estratti organici. Le determinazioni sono state condotte mediante cromatografia liquida ad alta pressione (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e dell'Ambiente, Università degli Studi di Napoli "Federico II", sotto

la supervisione del Prof. Antonio Evidente, utilizzando per l'AF uno standard acquistato dalla Sigma-Aldrich, mentre per l'ADF è stato utilizzato uno standard purificato presso lo stesso laboratorio da filtrati colturali di *Fusarium nygamai* Burgess & Trimboli (Capasso et al., 1996).

Il metodo e le condizioni sperimentali utilizzate per le analisi sono quelli descritti nel lavoro di Amalfitano et al. (2002). E' stato utilizzato un sistema HPLC (Perkin–Elmer, Norwalk, CT, USA) dotato di pompa 410 LC, rivelatore spettrofotometrico UV (LC 90) ed un integratore LCI.

Le separazioni sono state eseguite mediante una colonna a fase inversa (Macherey–Nagel, Duren, Germania) C18 100-5 Nucleosil (250 x 4,6 mm, 5 µm), con eluizione in gradiente. Le fasi mobili impiegate sono state: metanolo (eluente C), acqua distillata di grado HPLC (eluente D), 1 % *di*-potassio fosfato in acqua, corretto a pH 7.35 mediante aggiunta di alcune gocce di acido fosforico 85% (eluente E). L'eluizione è stata inizialmente condotta con la miscela C:D:E (50:10:40), successivamente trasformata, secondo un gradiente lineare di oltre 20 minuti a C:D:E (75:10:15); le condizioni iniziali sono state ristabilite secondo un gradiente lineare di oltre 5 minuti e la colonna è stata riequilibrata in queste condizioni per 10 minuti, prima di eseguire la successiva separazione cromatografica. La velocità del flusso è stata di 1 ml/min ed aliquote di 20 µl dei campioni sono state iniettate nella colonna per le analisi. La rilevazione spettrofotometrica è stata condotta alla lunghezza d'onda di 268 nm in quanto entrambi i metaboliti secondari manifestano un assorbimento massimo a tale lunghezza d'onda.

La quantificazione di AF e DFA è stata effettuata integrando l'area dei picchi del cromatogramma corrispondenti alle due sostanze (tempo di ritenzione di AF= 8,80±0,5 min e di ADF= 5,90±0,5 minuti).

2.8. INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI *T. HARZIANUM* TH908 DA PARTE DELL'ACIDO FUSARICO

A seguito della rilevazione della presenza di AF negli estratti organici dei due isolati di *F. oxysporum*, si è proceduto alla valutazione dell'attività inibitoria della crescita di Th908 da parte di questo metabolita.

Il saggio è stato condotto su substrato agarizzato (PDA), a cui sono state aggiunte diverse concentrazioni (750, 375, 187 e 93 µg/g) di AF puro (Sigma-Aldrich). Il metodo e le condizioni sperimentali adottati sono quelli descritti nel paragrafo 2.6.4. L'AF è stato aggiunto al substrato agarizzato alla temperatura di 55 °C in soluzione etanolica, in modo tale che la concentrazione finale del solvente nel substrato fosse l'1% (vol/vol). Si è quindi proceduto alla determinazione dell'inibizione percentuale della crescita di Th908 (I%) dopo 48 e 72 h di incubazione.

2.9 OTTENIMENTO DI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* TH908 DOTATI DI RESISTENZA A METABOLITI DI *F. OXYSPORUM*

Per ottenere mutanti del ceppo di Th908 resistenti ai metaboliti antifungini prodotti da *F. oxysporum* (ceppi FoFT2 e Fo2797) è stata utilizzata la tecnica di mutagenesi mediante irraggiamento con luce ultravioletta a onde corte (UV-C) .

2.9.1 MESSA A PUNTO DELLE CONDIZIONI DI MUTAGENESI

Allo scopo di mettere a punto il metodo di mutagenesi mediante UV-C, conidi di Th908 sono stati esposti ad irraggiamento per intervalli di tempo compresi tra 1 e 120 minuti, andando successivamente a determinare la percentuale di mortalità dei conidi per individuare un tempo di esposizione tale da determinare l'80-85% di mortalità.

Aliquote di 1,1 ml di una sospensione conidica di Th908 contenente 10^6 conidi/ml sono state dispensate nei pozzetti di una piastra per colture cellulari a 24 pozzetti (Sterilin, Bargoed, UK). Dopo aver rimosso il coperchio della piastra, i conidi sono stati esposti agli UV-C per diversi tempi: 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, e 120 minuti. L'irraggiamento con UV-

C (λ= 254 nm) è stato effettuato mediante una lampada germicida (Sylvania, Danvers, MA, USA), con potenza di 15 Watt, posta a 15 cm dalla piastra ed opportunamente riscaldata per 10 minuti prima dell'utilizzo.

Allo scadere dei vari tempi di esposizione, è stato prelevato dal pozzetto 1 ml della sospensione conidica, che è stato diluito in 9 ml di acqua sterile. Si è quindi proceduto alla preparazione di tre successive diluizioni decimali. 100 µl di ciascuna diluizione decimale sono stati piastrati su piastre di PDA contenente lo 0,025 % (vol/vol) di Igepal 630 (Sigma-Aldrich) per rallentare la crescita delle colonie. Nello stesso modo sono state preparate delle piastre di controllo, con conidi non esposti a UV-C. Le piastre sono state poste in incubatore a 25 °C, alla luce. Le prove sono state condotte in triplicato.

Dopo 3-5 giorni, si è proceduto alla determinazione del numero di unità formanti colonie (Colony Forming Units, CFU) nelle piastre seminate con i conidi esposti a UV-C e nelle piastre di controllo. La percentuale di mortalità dei conidi di Th908, dovuta alla durata dell'esposizione, è stata calcolata utilizzando la formula:

% mortalità conidi = (nCFU testimone– nCFU trattato)/ nCFU testimone x 100

Dove:

nCFU testimone**=** numero di CFU nelle piastre seminate con i conidi non esposti agli UV-C;

nCFU trattato **=** numero di CFU nelle piastre seminate con i conidi esposti agli UV-C.

2.9.2 SELEZIONE DEI MUTANTI RESISTENTI

Una volta standardizzate le condizioni di mutagenesi, i mutanti di Th908 sono stati selezionati per la resistenza nei confronti dei metaboliti antifungini prodotti dall'isolato *F. oxysporum* FoFT2.

100 µl di una sospensione di conidi di Th908 esposti per 2 minuti agli UV-C, sono stati piastrati su AA (10 ml) con l'aggiunta del 5% (vol/vol) di

estratto organico di FoFT2. Le piastre sono state incubate a 25°C per 24 h. Le piastre sono state quindi osservate sotto uno stereomicroscopio allo scopo di individuare i primi conidi germinati, ovvero i più resistenti ai metaboliti antifungini presenti nel substrato. I conidi germinati sono stati prelevati e trasferiti su piastre di PDA contenente il 5% (vol/vol) di estratto di FoFT2. Le piastre sono state incubate a 25 °C e quotidianamente, per tre giorni, è stato misurato l'accrescimento diametrale (mm) delle colonie dei mutanti, confrontandolo con quello di colonie derivanti da conidi non irradiati posti nelle medesime condizioni.

In alternativa all'uso di PDA addizionato con l'estratto di FoFT2, piastre per antibiogramma 120 x 120 cm, contenenti 40 ml di AHA, sono state ricoperte con un foglio di cellophane sterile (Scotch, Cergy-Pontoise, Francia) ed inoculate in 9 diversi punti con dischetti micelici (diametro 6 mm) di FoFT2, prelevati dal bordo di una coltura in attivo accrescimento su PDA.

Dopo 4 giorni di incubazione, tempo necessario alla produzione e al rilascio dei metaboliti bioattivi nel substrato, il cellophane è stato rimosso e le piastre sono state inoculate con singoli conidi di Th908, precedentemente esposti al trattamento mutageno e posti a germinati su AA + 5% (vol/vol) di estratti di FoFT2. Le piastre sono state incubate alla temperatura di 25 °C, ed è stato misurato l'accrescimento diametrale (mm) delle colonie dei mutanti e del ceppo naturale (wild type, Th908-wt).

Dopo un primo isolamento, i mutanti selezionati sono stati sottoposti ad un'ulteriore verifica della resistenza acquisita nei confronti dei metaboliti bioattivi prodotti da FoFT2, ponendoli nuovamente su PDA + 5% (vol/vol) di estratto organico di FoFT2 oppure su AHA e misurando l'accrescimento diametrale (mm).

I mutanti selezionati sono stati successivamente valutati per la resistenza ai metaboliti antifungini presenti negli estratti organici di Fo2797 e all' AF (Sigma-Aldrich). Sono state preparate come descritto nel paragrafo 2.6.4 delle piastre Petri di 5 cm di diametro contenenti 4 ml di PDA con il 5% (vol/vol) di estratto di FoFT2, il 2.5% (vol/vol) di estratto

di Fo2797 o 120 µg/g di AF. Le piastre sono state inoculate con singoli conidi germinati dei ceppi mutanti e si è misurato l'accrescimento diametrale (mm) delle colonie mutanti e di Th908-wt, dopo 24, 48 e 72 h.

La stabilità della mutazione nei mutanti resistenti è stata saggiata mediante 4 successive subculture su PDA, seguite da un trasferimento su PDA addizionato con gli estratti organici dei due isolati di *F. oxysporum* o con AF (Hatvani et al., 2006).

2.10 INTERAZIONE IN VITRO TRA I CEPPI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* TH908 E *F. OXYSPORUM* (COLTURA DUALE)

Analogamente a quanto fatto con il ceppo selvatico (Th908-wt), i due mutanti Th908-5 e Th908-81, resistenti a metaboliti antifungini di *F. oxysporum*, sono stati saggiati in coltura duale con i due isolati di *F. oxysporum*, FoFT2 e Fo2797.

Il saggio è stato condotto con le modalità descritte nel paragrafo 2.5.1, con alcune modifiche. In questo caso, la prova è stata condotta su tre substrati diversi: PDA, AHA e MDP. Inoltre, al fine di consentire la produzione e il rilascio nel substrato dei metaboliti bioattivi di *F. oxysporum*, i due funghi non sono stati inoculati nello stesso momento. I dischetti micelici di FoFT2 o Fo2797 sono stati inoculati ad 1 cm di distanza dal bordo della capsula e lasciati crescere per tre giorni prima di procedere all'inoculazione dei ceppi di *T. harzianum* (Th908-5,Th908-81, e Th908-wt come testimone).

Quotidianamente si è misurato l'accrescimento radiale degli isolati di *T. harzianum* sia verso il bordo della capsula, sia verso FoFT2 o Fo2797 sui 3 diversi substrati impiegati e in tre repliche. E' stata, quindi, calcolata l'inibizione percentuale della crescita e valutato il tipo di interazione verificatasi tra i miceli dei funghi posti a confronto, come descritto nel paragrafo 2.5.1.

2.11 VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE FISIOLOGICHE DEI MUTANTI: COMPETENZA PER LA RIZOSFERA

Per valutare la capacità di colonizzare la rizosfera (competenza per la rizosfera) da parte di Th908-wt e dei mutanti Th908-5 e Th908-81, si è utilizzato il metodo messo a punto da Ahmad e Baker (1987), con alcune modifiche. Come sistema modello sono state impiegate piante di pomodoro.

Tubi da centrifuga da 15 ml in polipropilene sono stati tagliati longitudinalmente in due metà speculari. Ciascuna metà è stata riempita con 9 g di terreno sterile, successivamente portato alla capacità idrica di campo (31,8%) con acqua distillata sterile. Il terreno impiegato nella prova proveniva da un campo ubicato ad Altamura (Bari) e presentava le seguenti caratteristiche: materia organica 2,52 %, Azoto (N) 1,23 µg/g, Potassio (K) 218,0 µg/g, Fosforo (P) 8,73 µg/g.

Semi di pomodoro della cv. Marmande, preventivamente sterilizzati con ipoclorito di sodio (come descritto nel paragrafo 2.3) sono stati inoculati con i diversi ceppi di *T. harzianum* immergendoli in una sospensione conidica di densità 1 x 10^7 conidi/ml e mantenendoli in agitazione orbitale a 120 rpm per 1 h. Questo trattamento assicurava una densità di inoculo minima di 1 x 10^4 conidi (dati non mostrati). Un singolo seme così trattato è stato posizionato in una delle due metà del tubo da centrifuga riempito con il terreno, a circa 1 cm dall'orlo superiore. L'altra metà del tubo è stata fatta coincidere con la prima e le due metà sono state tenute insieme con degli elastici. I tubi sono stati infilati verticalmente in vermiculite sterile umidificata all'interno di vasi di plastica (diametro 10 cm). Per ogni tesi sono stati predisposti tre vasi, ciascuno contenente 6 tubi. I vasi sono stati chiusi in buste di plastica trasparente per limitare l'evaporazione e disposti in camera di crescita ad una temperatura diurna di 26 °C e notturna di 21 °C, con fotoperiodo 12 h luce/12 h buio ottenuto utilizzando lampade OSRAM HQIT 400W/N/SI di potenza 10000 LUX (Fig. 2.5.).

Fig. 2.5. Vasi contenenti vermiculite sterile in cui sono stati disposti 6 tubi, ciascuno contenente un seme di pomodoro inoculato con la sospensione conidica degli isolati di *T. harzianum* (Th908-wt, Th908-5, Th908-81). Ogni vaso è stato avvolto in una busta di plastica trasparente e posto in camera di crescita per 10 giorni.

Dopo 10 giorni di incubazione in camera di crescita i tubi sono stati aperti e le piantine sono state estratte dal terreno. La parte epigea è stata rimossa in corrispondenza del colletto e la radice di ogni singola pianta è stata suddivisa in tre segmenti: la parte prossimale (P.P.) di 1 cm di lunghezza, la parte distale (P.D.) anch'essa di 1 cm e la parte centrale (P.C.) di lunghezza variabile, alla cui misurazione si è proceduto (Fig. 2.6.).

Il materiale vegetale di ciascuna replica (6 tubi/replica), distinto nelle tre porzioni (P.P., P.C. e P.D.), è stato unito, pesato e trasferito in provette di vetro sterili contententi 1 ml di acqua distillata sterile. Le provette, sono stati poste in agitazione orbitale a 120 rpm per 1 h. Con queste sospensioni sono state poi preparate diluizioni decimali successive.

100 µl di ciascuna diluizione sono stati piastrati su TSM e le piastre sono state incubate a 25 °C per 4–5 giorni, dopodichè si è proceduto al conteggio delle CFU. Le CFU così determinate sono state rapportate alla lunghezza e al peso del segmento di radice, ricavando i valori di CFU/cm e CFU/g di segmento.

Il terreno, presente in una delle due metà-tubo di tre diversi tubi in ogni replica è stato suddiviso in tre porzioni (1°, 2° e 3°) di 3 cm di lunghezza (Fig. 2.6.). Ciascuna porzione di terreno è stata pesata, trasferita in un falcon sterile e sospesa in acqua distillata sterile (9 ml

acqua/g di terreno). Le provette, sono state poste in agitazione orbitale a 120 rpm per 1 h. A partire da queste sospensioni, sono state preparate diluzioni decimali successive e 100 µl di ciascuna sospensione sono stati seminati su TSM. E' stato determinato il numero di CFU/g di terreno umido di Th908-wt, e dei due mutanti Th908-5 e Th908-81. I valori ottenuti sono stati quindi rapportati al peso secco, correggendo i valori del peso umido in base al contenuto d'acqua del terreno (31,8%).

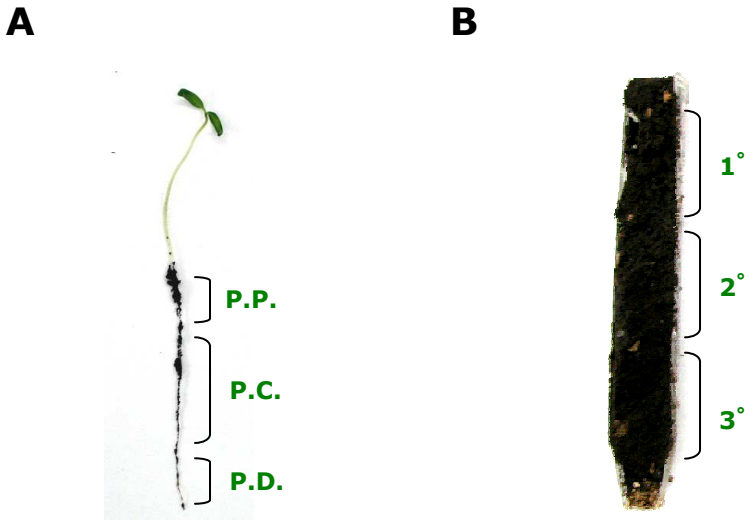


Fig. 2.6. Rappresentazione schematica della suddivisione applicata alle radici e al terreno da sottoporre alla determinazione delle CFU degli isolati di *T. harzianum* (Th908-wt, Th908-5 e Th908-81). **(A)** Piantina di pomodoro, la cui radice è stata suddivisa in tre segmenti: parte prossimale (P.P.), parte centrale (P.C.) e parte distale (P.D.). La P.P. e la P.D. avevano una lunghezza fissa di 1 cm, mentre la P.C aveva una lunghezza variabile, che è stata misurata. **(B)** Tubo di propilene riempito con terreno, suddiviso in tre differenti porzioni, ciascuna della lunghezza di 3 cm.

2.12 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTAGONISTICA DEI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* IN VIVO

Semi di pomodoro della cv. Marmande sono stati sterilizzati esternamente con ipoclorito di sodio e posti a germinare in capsule Petri, come descritto nel paragrafo 2.3. Successivamente, i semi sono stati inoculati con i ceppi antagonistici (Th908-wt, Th908-5 e Th908-81) mediante immersione in una sospensione conidica (1 x 10^7 conidi/ml) per 1 h, rimescolando costantemente la sospensione in agitatore orbitale a 120 rpm.

Gli inoculi di *F. oxysporum* sono stati preparati come descritto di seguito. Del substrato liquido AH è stato mescolato nel rapporto 1:1 con una sospensione conidica di *F. oxysporum* Fo2797 o FoFT2 in acqua sterile, in modo da ottenere una concentrazione finale di 2,5 x 10^2 conidi/ml. Contenitori Magenta® per colture tissutali (77 x 77 x 77 mm, Sigma) sono stati riempiti con 30 grammi di vermiculite sterile ai quali sono stati successivamente aggiunti 120 ml della sospensione conidica di *F. oxysporum* in AH. La densità di inoculo di *F. oxysporum* risultava così di 10^4 conidi/g di vermiculite.

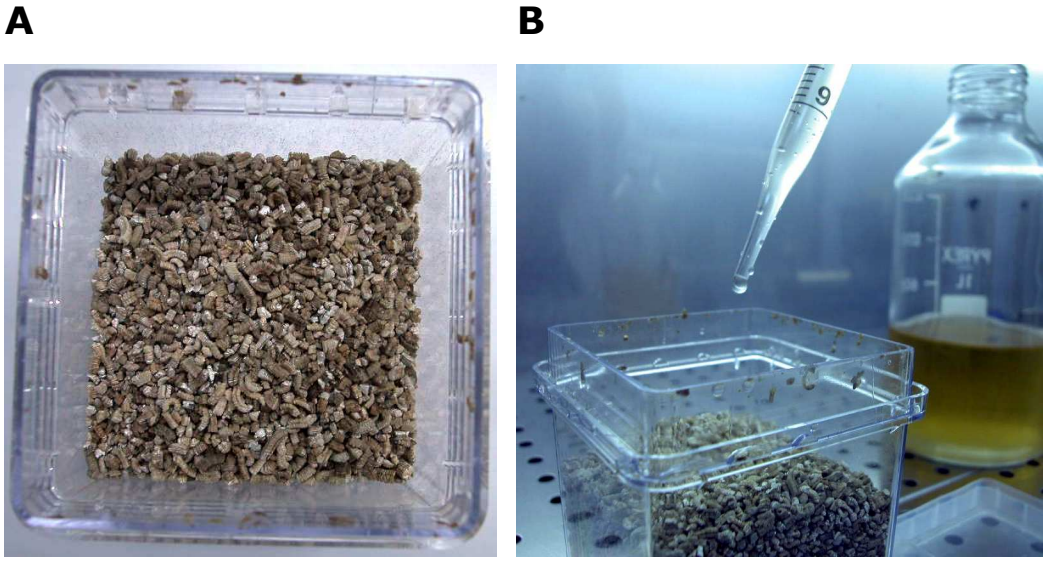


Fig. 2.7. (A) Contenitori Magenta® riempiti con 30 gr di vermiculite sterile. **(B)** La vermiculite è stata inumidita con 120 ml di substrato liquido AH (1/2 forza) contenente 2,5 x 10^2 conidi/ml di *F. oxysporum* (FoFT2 o Fo2797).

Quattro germinelli di pomodoro sono stati posizionati in ogni contenitore, a circa 1 cm di profondità. Per ciascuna tesi sono stati preparati 3 contenitori Magenta®. Oltre ai trattamenti con i tre ceppi di *T. harzianum* in vermiculite inoculata con uno o l'altro dei due isolati di *F. oxysporum*, è stato inoltre preparato un testimone negativo (semi sterili su terreno non inoculato), un testimone per ciascun isolato di *T. harzianum* (semi inoculati con le sopensioni degli antagonisti su terreno

non inoculato) ed un testimone positivo (semi sterili su terreno inoculato con le sospensioni di FoFT2 e Fo2797).

I vasi sono stati con avvolti in carta stagnola e disposti in camera di crescita ad una temperatura diurna di 26°C e notturna di 21°C, con fotoperiodo 12 h luce/12 h buio ottenuto utilizzando lampade OSRAM HQIT 400W/N/SI di potenza 10000 LUX. Le piante sono state esaminate quotidianamente e dopo l'emergenza sono stati somministrati a giorni alterni 10 ml di soluzione nutritiva di Knop [$Ca(NO_3)_2$ 0,8 g; KNO_3 0,2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; KH_2PO_4 0,2 g; $FeCl_2$ 0,005 g; acqua 1 L].

Allo stadio di V o VI foglia vera si è proceduto alla valutazione qualitativa (osservazione dei sintomi) ed al calcolo della percentuale di sopravvivenza delle piantine.

2.13 ANALISI DI ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELLA MULTI DRUG RESISTANCE (MDR) IN *T. HARZIANUM*

2.13.1 CONDIZIONI COLTURALI

Gli isolati di *T. harzianum* (Th908-wt, Th908-5 e Th908-81) sono stati inoculati su piastre di PDA ricoperte da un foglio di cellophane sterile. Dopo 6 giorni di crescita a 25°C e al buio, il micelio è stato raccolto per essere sottoposto ad estrazione di DNA.

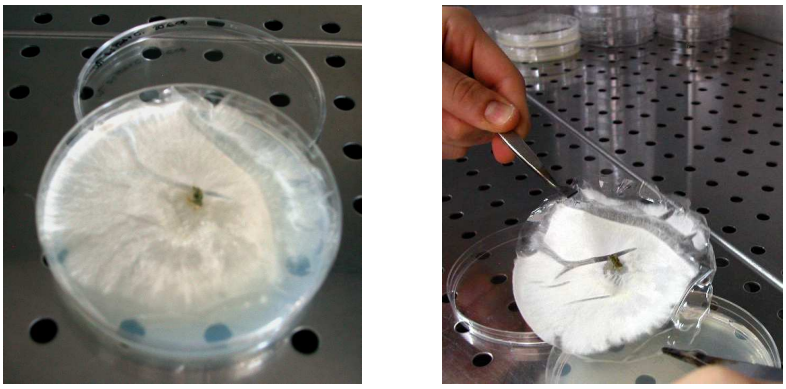


Fig. 2.8. Micelio fungino accresciuto su un foglio di cellophane in piastre di PDA.

Gli stessi isolati sono stati inoculati su piastre di PDA (testimone), su PDA contenente il 5% (vol/vol) di estratti organici di FoFT2 e su PDA contenente 120 µg/g di AF, ricoperte da un foglio di cellophane sterile. Dopo 4 giorni di crescita a 25°C e al buio, il micelio è stato raccolto e conservato a -80°C fino alla successiva fase di estrazione dell'RNA totale (Fig. 2.8).

2.13.2 ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Il DNA genomico è stato estratto da 100 mg di micelio fungino congelato e triturato in azoto liquido con mortaio e pestello. Per l'estrazione del DNA genomico è stato utilizzato il kit "*E.Z.N.A. Fungal DNA Kit*" (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, US), seguendo le istruzioni della casa produttrice. Al termine della procedura, il DNA estratto da ogni campione, eluito in acqua distillata sterile (100 µl), è stato conservato a 4°C fino alle applicazioni successive.

L'RNA totale è stato estratto da 100 mg di micelio fungino cresciuto nelle diverse condizioni sperimentali. Il materiale vegetale è stato prima triturato in azoto liquido con mortaio e pestello e poi sottoposto ad estrazione utilizzando il kit "*RNeasy Plant Minikit*" (Qiagen, Hilden, Germania), seguendo le istruzioni allegate. L'RNA estratto da ogni campione, eluito in 30 µl di acqua RNasi Free, è stato conservato a -80°C fino alle applicazioni successive.

L'analisi quantitativa degli acidi nucleici è stata condotta mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm (Nanodrop–Spectrophotometer-ND-1000), valutando la eventuale contaminazione da proteine a 280 nm.

L'analisi elettroforetica del DNA genomico è stata condotta su gel di agarosio allo 0,8% in TAE 1X ad un voltaggio di 70 V per 30 minuti.

L'analisi elettroforetica dell'RNA è stata condotta, in condizioni non denaturanti, su gel di agarosio (1,5%) in TBE 0,5X ad un voltaggio di 220 V per 10 minuti.

Il bromuro di etidio (5 µg/100ml di gel) è stato utilizzato come colorante nelle analisi elettroforetiche.

2.13.3 Retrotrascrizione (RT-PCR) e reazioni di amplificazioni

Le amplificazioni su DNA genomico e cDNA sono state condotte utilizzando le coppie di primer indicate in tabella 2.1. I primer sono stati disegnati con il software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) sulla base delle sequenze di geni putativamente codificanti proteine coinvolte nella resistenza agli antibiotici (MDR ProB, MDR BrefA e MDR Protein 2) oppure nei trasporti transmembrana (Hydro II, ThPTR2) in *T. harzianum* (Tab. 2.1). Inoltre, i primer sono stati sottoposti ad analisi BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) per verificare che gli stessi non fossero complementari ad altre sequenze geniche pubblicate in banca dati.

Tab. 2.1. Proteine transmembrana di *T. harzianum* che si ritiene essere coinvolte nella Multi Drug Resistance (MDR). Le coppie di primer utilizzate nello studio sono state disegnate sulla base delle corrispondenti sequenze nucleotidiche depositate in GenBank.

Proteina	GenBank (acc no.)	Sigla	Sequenze nucleotidiche dei primer
Multidrug resistance protein B	CK907073.1 [a]	*MDR proB*	For. **5'** GCCATGGCTTTCACTAAC **3'** Rev. **5'** CGGACGATTATAGACACCA **3'**
Multidrug resistance protein	CK907092.1 [a]	*MDR Protein 2*	For. **5'** GAACAACACGACACACCTG **3'** Rev. **5'** GCCAAGGATGAGATGTAGAC **3'**
Brefeldin A resistance protein	CK434041.1 [a]	*MDR BrefA*	For. **5'** GGCTGATATCTGGGAAGAC **3'** Rev. **5'** TCGAGTACATCTTGGACGA **3'**
Hydrophobin II precursor	CK907564.1 [a]	*HydroII*	For. **5'** TCATCACCACTCTCTTACACA **3'** Rev. **5'** ATCCATCCATTCCCAACTA **3'**
ThPTR2	CAI30793.1 [b]	*ThPTR2*	For. **5'** CAGTTCTTCGCCTACATCA **3'** Rev.**5'** GGGTTCAGGTTCTGGATAA **3'**
ß-tubulin 1	ABK27613.1 [c]	*ß-tubulina*	For. **5'** GAGCCTTATAACGCCACC **3'** Rev.**5'** GTTCTTGTTCTGGATGCTGC **3'**

a Liu e Yang, 2005
b Vizcaino et al., 2006
c Li e Yang, 2007

Il gene costitutivo della beta tubulina 1 di *T. harzianum* (Li e Yang, 2007) è stato utilizzato come controllo endogeno nelle reazioni di amplificazione da cDNA per escludere eventuali alterazioni che interessano la totale attività trascrizionale del fungo.

Prima della reazione di retro trascrizione i campioni di RNA sono stati trattati con RNAsi–free Dnasi I (Promega, Madison, WI, USA), per eliminare possibili contaminazioni da DNA genomico. Il primo filamento di cDNA è stato sintetizzato usando, per ogni campione, 2 µg di RNA totale, oligo $(dT)_{18}$ e la retrotrascrittasi SuperScript III RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a 50°C per 50 minuti. E' seguita la digestione con RNAsi H a 37°C per 30minuti.

Le reazioni su cDNA sono state effettuate in un volume finale di 30 µl, impiegando i seguenti reagenti:

- Buffer di amplificazione 10X contenente Mg^{2+} 1,5 mM;
- 200 µM di dNTPs;
- 0,3 µM di primer
- 1,5 U di Taq polimerasi

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite utilizzando un termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), alle condizioni di seguito riportate: una fase di denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, 35 cicli costituiti dalla fase di denaturazione a 94° (30 sec), appaiamento a 54°C (50 sec) ed estensione a 72°C (50 sec), seguiti al termine da una fase di estensione a 72°C per 5 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel e le dimensioni sono state stimate confrontandole con il marcatore di peso molecolare (100bp-2642bp) (marker XIV, Roche, Molecular Biochemicals, Basel, Svizzera).

2.13.4 SEQUENZIAMENTO E ANALISI DELLE SEQUENZE

I prodotti di PCR sono stati purificati dal gel di agarosio mediante il kit "*Nucleo Spin Extract II*" (Macherey–Nagel, Duren, Germania) e successivamente sequenziati.

Per l'analisi di sequenza è stato utilizzato il kit per marcatura *"Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction version 3.1"* (Applied Biosystem). La reazione è stata eseguita in un volume di 10 µl in presenza di 1,6 picomoli di primer, alle seguenti condizioni: 25 cicli costituiti dalla fase di denaturazione a 96°C per 10 secondi, di appaiamento a 54°C per 5 secondi e di estensione a 60°C per 2 minuti.

Le miscele di reazione sono state purificate attraverso gel filtrazione su Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich) e analizzate con il sequenziatore automatico Abi Prism 3100 (Applied Biosystem).

Le analisi di ricerca di similarità sono state condotte usando i programmi FASTA e BLAST presso i siti web EBI (European Bioinformatic Institute) e NCBI (National Center for Biotechnology) rispettivamente.

L'allineamento delle sequenze è stato effettuato tramite il metodo ClustalW disponibile in rete presso il sito web EBI.

2.14 STATISTICA

Le analisi statistiche sono state effettuate con l'ausilio del programma statistico InStat, versione 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. RISULTATI

3.1 SAGGIO DI PATOGENICITÀ DI ISOLATI DI *FUSARIUM* SU SEMI GERMINANTI DI POMODORO

La selezione di un isolato fitopatogeno di *Fusarium* particolarmente virulento su Pomodoro, da utilizzare nei diversi esperimenti, è stata effettuata utilizzando il metodo descritto da Sanchez et al. (1975).

Sebbene in diversa misura, tutti gli isolati di *F. oxysporum* e *F. solani* saggiati sono risultati fitopatogeni su germinelli di Pomodoro determinando la comparsa di sintomi sia a livello dell'ipocotile che della radichetta.

Dopo 7 giorni dall'inoculazione, alcuni isolati di *F. oxysporum* (ITEM 1586, ITEM 2793 e ITEM 2797) avevano già determinato la comparsa di sintomi, consistenti in un ridotto sviluppo del fusto, imbrunimento del colletto e comparsa di aree necrotiche sulle radichette (Fig. 3.1). I sintomi più evidenti si osservavano sulle piantine di pomodoro accresciute in presenza dell'isolato *F. oxysporum* ITEM 2797 (Fo2797).

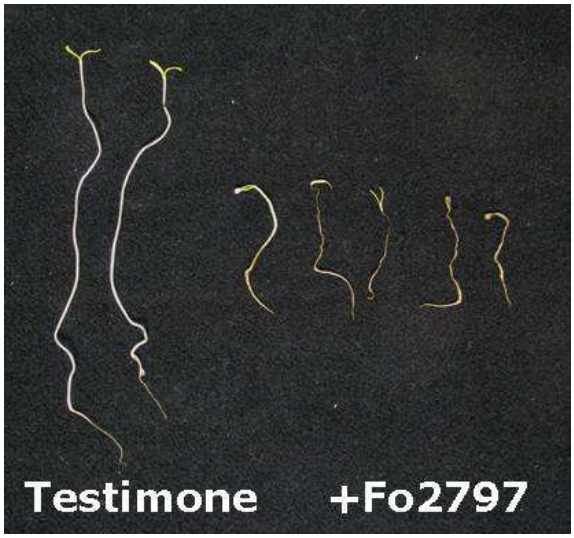


Fig. 3.1. Germinelli di pomodoro inoculati con l'isolato Fo2797 mostravano i seguenti sintomi: fusto con ridotto sviluppo, imbrunimento del colletto e necrosi radicale diffusa.

Dopo 10 giorni, i germinelli di pomodoro sono stati nuovamente osservati, attribuendo all'ipocotile e alla radichetta di ciascuna piantina una classe di gravità sintomatologica (0-5), ed è stato calcolato l'indice di McKinney. I valori degli indici di McKinney per le radichette e i fusticini inoculati con i diversi isolati di *Fusarium*, sono mostrati in Fig. 3.2.

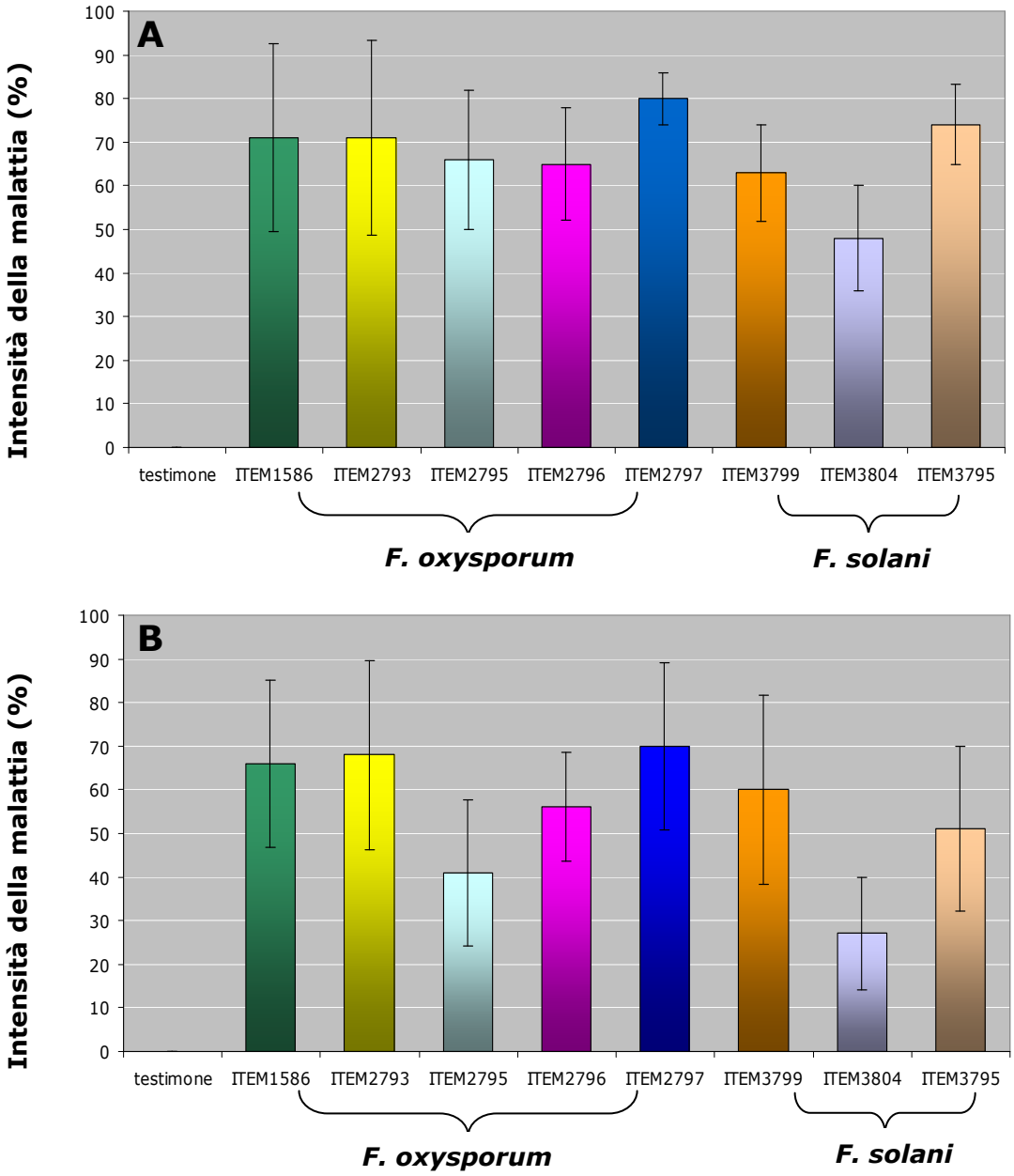


Fig. 3.2. Intensità media ponderata della malattia (Indice di McKinney) ± DS in germinelli di pomodoro inoculati con *F. oxysporum* e *F. solani* dopo 10 giorni dall'inoculo. **A**, radici; **B**, ipocotili.

Per tutti gli isolati in esame, i valori dell'indice di McKinney relativi alle radichette sono risultati leggermente superiori rispetto a quelli degli ipocotili. Infatti, i sintomi più evidenti, quali disseccamento completo o imbrunimento esteso per più di 1 cm, si riscontravano con maggiore frequenza e minore variabilità sulle radichette. I valori degli indici di intensità della malattia causata dagli isolati di *Fusarium* sulle radici e sui fusticini sono risultati statisticamente differenti dal testimone (p<0,0001). Non sono state invece trovate differenze di patogenicità statisticamente significative tra gli isolati testati. I valori più elevati dell'indice di McKinney (80% e 70%, rispettivamente su radice ed ipocotile) si sono riscontrati con l'isolato Fo2797, mentre i valori più bassi (48% e 27%, rispettivamente su radice ed ipocotile) con l'isolato *F. solani* ITEM 3804. I valori associati agli altri isolati erano compresi tra il 63 e il 74% per le radici e tra il 41 e il 68% per gli ipocotili.

3.2 INTERAZIONE TRA *T. HARZIANUM* TH908 E *F. OXYSPORUM*

3.2.1 INTERAZIONE IN VITRO (COLTURA DUALE)

Il tipo di interazione simbiotica intercorrente tra *T. harzianum* ITEM 908 (Th908) e gli isolati di *F. oxysporum,* FT2 (FoFT2) e Fo2797, è stata valutata in vitro mediante coltura duale su 3 diversi substrati (AHA, MDP, e RM).

Dopo 24 h di incubazione non si osservava ancora alcun tipo di interazione tra gli isolati posti a confronto. Nei rilievi effettuati dopo 48 h e 72 h di incubazione si è invece osservata la comparsa di una zona di mutua inibizione tra l'isolato di *Trichoderma* e i due isolati di *F. oxysporum*. Gli accrescimenti radiali delle colonie dei due funghi posti a confronto sui 3 substrati dopo 72 h sono stati utilizzati per il calcolo dell'inibizione percentuale della crescita (I%). I valori di I%, riportati in Tabella 3.1, indicano un chiaro effetto d'inibizione a carico di Th908 da parte di entrambi gli isolati di *F. oxysporum*, su tutti e tre i substrati utilizzati. Non vi erano differenze statisticamente significative tra i due

isolati di *F. oxysporum* per quanto riguarda l'inibizione di Th908. Su AHA, l' I% di Th908 causata da Fo2797 e FoFT2 è stata rispettivamente del 67,5% e del 56,2%. Situazione assai simile è stata osservata su MDP, con valori di I% di *T. harzianum* del 64,0% e del 58,7%. Su RM, l'inibizione di Th908 è risultata leggermente maggiore, con valori pari al 68,9 % ed al 65,9% rispettivamente. L'inibizione esercitata da Th908 nei confronti dei due isolati di *F. oxysporum* è stata, in generale, più bassa, con valori di I% di Fo2797 compresi tra 15,3 e 48,6 e valori di I% di FT2 compresi tra 14,5 e 40,9.

Tabella 3.1. Inibizione percentuale dell'accrescimento della colonia di Th908 (I_{908}) causata dagli isolati di FoFT2 e Fo2797, e di FoFT2 e Fo2797 causata da Th908 (I_{2797} e I_{FT2}, rispettivamente). La valutazione è stata effettuata su tre diversi substrati (AHA, MDP e RM), tre giorni dopo l'inoculo.

		F. oxysporum	
		Fo2797	**FoFT2**
***T. harzianum* Th908**	**AHA**	I_{2797} 35,0 I_{908} 56,2	I_{FT2} 40,6 I_{908} 67,5
	MDP	I_{2797} 48,6 I_{908} 58,7	I_{FT2} 40,9 I_{908} 64,0
	RM	I_{2797} 15,3 I_{908} 66,0	I_{FT2} 14,5 I_{908} 69,0

Dopo aver rilevato l'accrescimento radiale delle colonie per il calcolo dei valori di I%, le colture duali sono state poste nuovamente in incubatore ed esaminate dopo tre settimane per valutare la tipologia di interazione tra i due funghi. Sia su AHA che su MDP si osservava una zona di mutua inibizione di ampiezza ≤ 3 mm tra Th908 e gli isolati di *F. oxysporum* (interazione di tipo 3). Su RM, invece, si riscontrava la

sovracrescita degli isolati di *F. oxysporum* sulla colonia di Th908, con conseguente arresto della crescita dell'isolato di *Trichoderma* (interazione di tipo 2) (Fig.3.3).

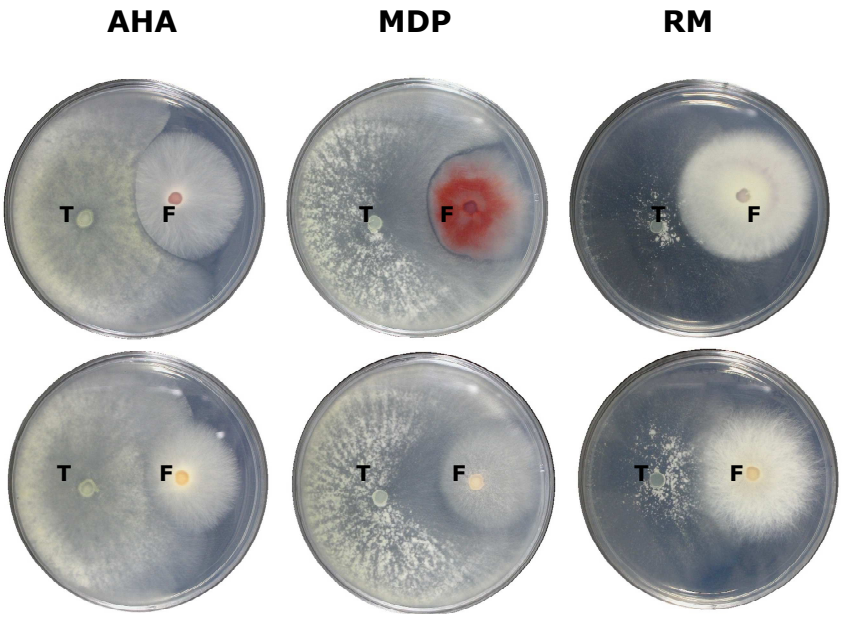


Figura. 3.3. Colture duali di *T. harzianum* Th908 (T) e *F. oxysporum* (F), su 3 differenti substrati (AHA, MDP, RM) dopo tre settimane dall'inoculo. **In alto:** Th908 *vs*. FoFT2. **In basso:** Th908 *vs*. Fo2797.

3.2.2 INTERAZIONE IN VIVO SU GERMINELLI DI POMODORO

La capacità antagonistica di Th908 nei confronti del ceppo fitopatogeno Fo2797 è stata valutata in vivo su germinelli di pomodoro. E' stata determinata l'intensità media ponderata della malattia (Indice di McKinney) sui germinelli dopo 10 giorni dal trattamento con il patogeno e l'antagonista.

Rispetto al testimone (germinelli non trattati), sui germinelli sottoposti ai tre diversi trattamenti (Th908, Fo2797, Th908+Fo2797) è stato osservato un generale effetto fitopatogeno da parte degli isolati. Tale effetto ha riguardato indistintamente radice ed ipocotile ($p<0,001$) (Fig.3.4). I sintomi più gravi, quali necrosi diffusa e conseguente disseccamento della pianta, sono stati registrati sulle piantine inoculate

con Fo2797, il cui indice di malattia su radice ed ipocotile è risultato rispettivamente del 93,3% e del 96%. L'isolato Th908 ha determinato la comparsa di zone di imbrunimento >1 cm sulle porzioni in esame.

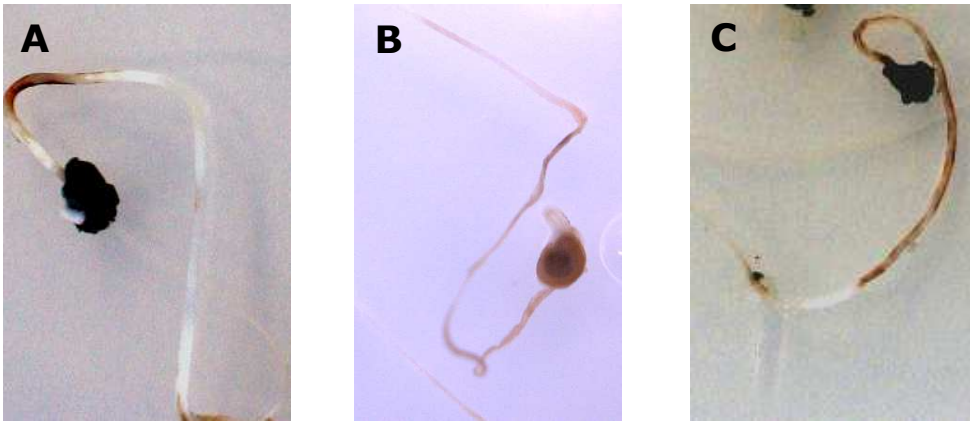


Fig. 3.4. **(A)** Imbrunimento a livello dell'ipocotile e della radichetta in germinelli di pomodoro trattati con Th908; **(B)** Sintomi sui germinelli inoculati con Fo2797: si osserva una necrosi diffusa e il disseccamento del germinello; **(C)** Germinelli di pomodoro trattati simultaneamente con Fo2797 e Th908: si osserva la riduzione dei sintomi sulle radichette grazie all'attività antagonistica di Th908.

Nell'interazione tra Th908 e Fo2797, Th908 è risultato in grado di ridurre in modo significativo l'effetto fitopatogeno dell'isolato Fo2797 sulle radichette (p<0,01). La co-inoculazione dell'isolato antagonista ha determinato, infatti, una riduzione del 17,3% della gravità della malattia ($IMcK_{2797}$ = 93,3%, $IMcK_{908+2797}$ = 76%). Al contrario, a livello dell'ipocotile, Th908 non ha determinato una significativa riduzione delle lesioni sui germinelli inoculati con Fo2797 (Fig. 3.5).

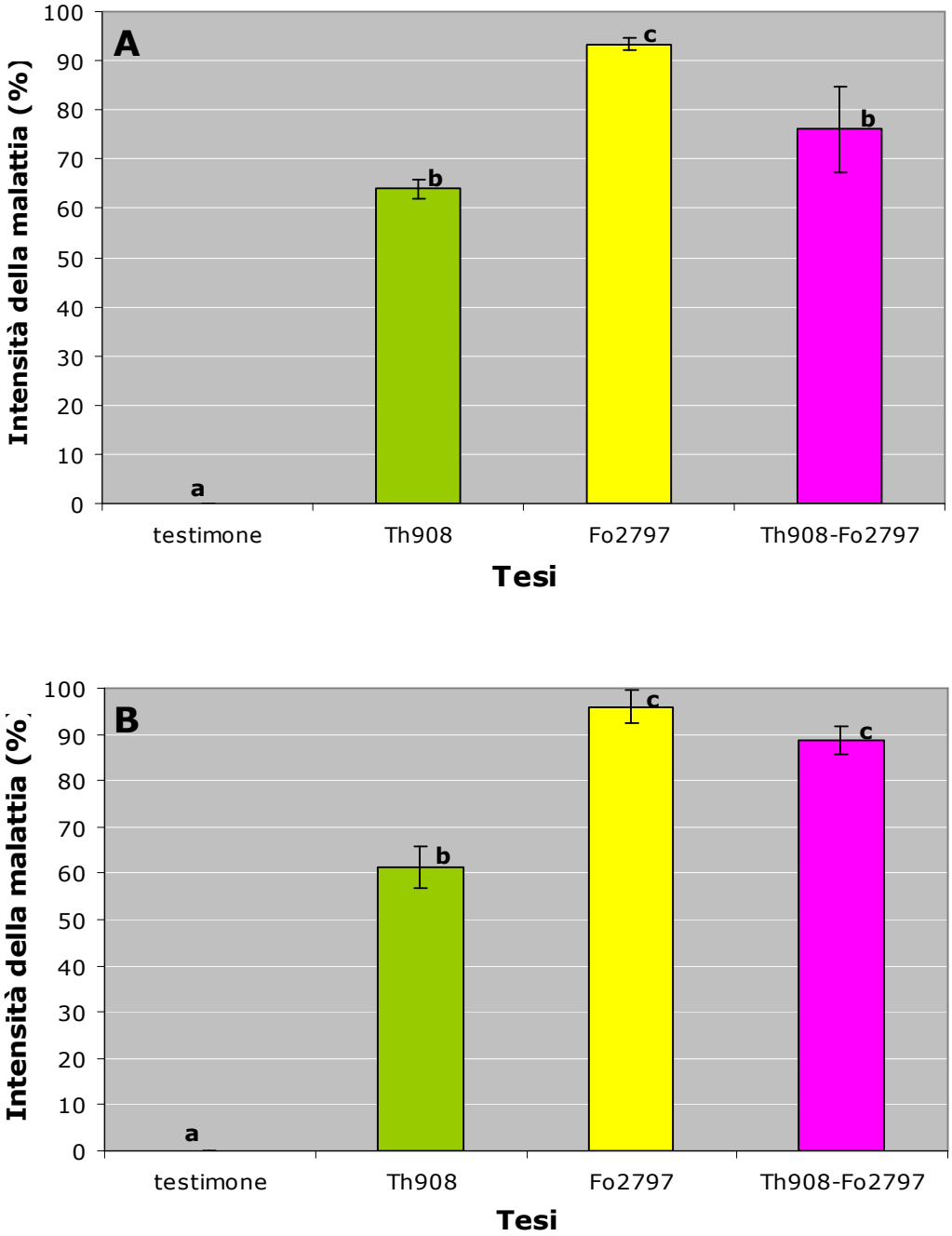


Fig. 3.5. Intensità media ponderata della malattia (Indice di McKinney) ± DS sulle radici **(A)** e sugli ipocotili **(B)** di germinelli di pomodoro inoculati con Th908, Fo2797, o entrambi i funghi. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente diversi (p<0,001) in base al test di Tuckey.

3.3. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI COLTURALI DI *F. OXYSPORUM*

3.3.1 SAGGIO DI ATTIVITA' ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI DI FOFT2 E FO2797 SU *GEOTRICHUM CANDIDUM*

L'attività antifungina degli estratti organici e delle fasi acquose esauste ottenute dai filtrati colturali di *F. oxysporum* FoFT2 è stata valutata misurando la zona di inibizione della crescita di *G. candidum* intorno a dischetti di cellulosa imbevuti con 20 µl di estratto o intorno a pozzetti praticati nel substrato agarizzato e riempiti con 200 µl di fase acquosa.

Il saggio degli estratti organici di FoFT2 ha evidenziato la produzione di metaboliti con attività antifungina da parte di questo isolato (Fig. 3.6).

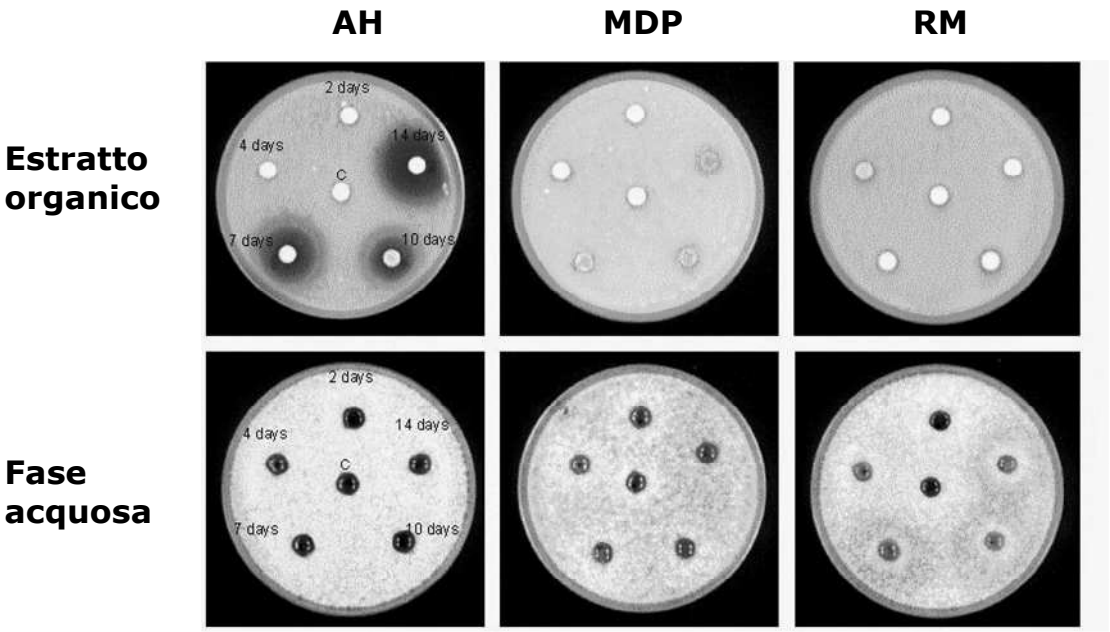


Fig. 3.6. Saggio di attività antifungina degli estratti colturali di *F. oxysporum* FoFT2 su tre diversi substrati liquidi (AH, MDP e RM). Colture liquide di FoFT2 di 2, 4, 7, 10 e 14 giorni sono state estratte con cloruro di metilene e l'attività antifungina degli estratti è stata saggiata sul fungo *G. candidum.* C = controllo negativo (substrato non inoculato).

La produzione di sostanze antifungine è risultata dipendere dal substrato di coltura utilizzato. Infatti, attività antifungina è stata riscontrata solo negli estratti da colture cresciute su AH e non in quelli di colture su MDP e RM. La presenza di sostanze con attività antifungina si è riscontrata già in colture di 7 giorni, ma il livello massimo di attività antifungina è stato riscontrato negli estratti da colture di 14 giorni (tabella 3.3). Il saggio su *G. candidum* dei brodi colturali esausti dopo estrazione con cloruro di metilene non ha evidenziato alcuna attività antifungina, indistintamente per i tre substrati impiegati e per i diversi prelievi effettuati (Fig. 3.6).

Tab. 3.2. Diametro dell'alone di inibizione della crescita di *G. candidum* intorno a dischetti di cellulosa (diametro 6 mm) imbevuti con 20 µl di estratto organico di colture di FoFT2 coltivato per 2, 4, 7, 10 e 14 giorni su tre diversi substrati (AH, MDP, RM).

Substrato	Diametro dell'alone di inibizione (mm) ± DS				
	2gg	4gg	7gg	10gg	14gg
AH	0	0	20±1.00	12±1.00	23±0.50
MDP	0	0	0	0	0
RM	0	0	0	0	0

Sulla base dei risultati relativi all'attività antifungina dei filtrati colturali di FoFT2, la valutazione della produzione di metaboliti con attività antifungina da parte dell'isolato Fo2797 è stata condotta impiegando solo il substrato AH e facendo crescere le colture per 14 giorni. Il saggio su *G. candidum* è stato condotto utilizzando tre diverse quantità di estratto colturale: 10, 20 e 30 µl/dischetto.

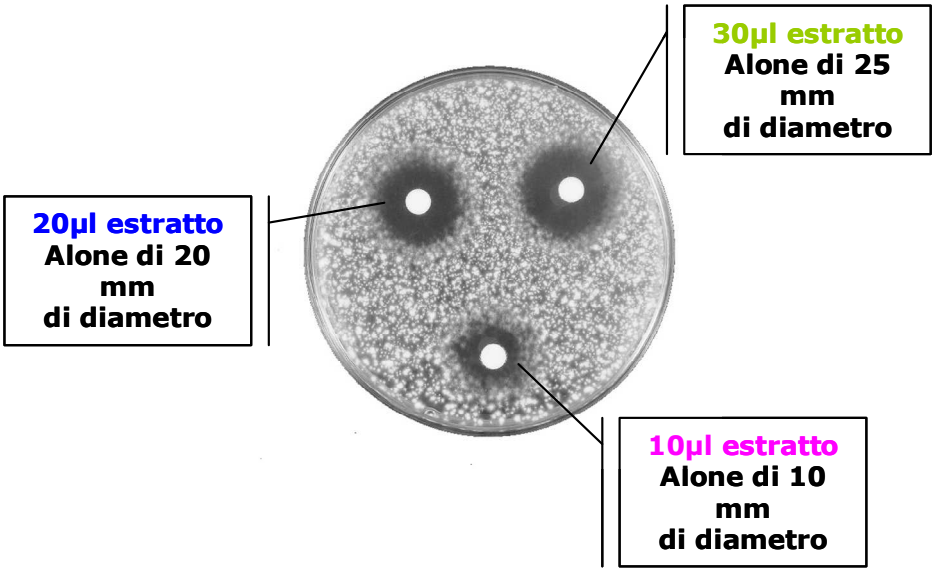


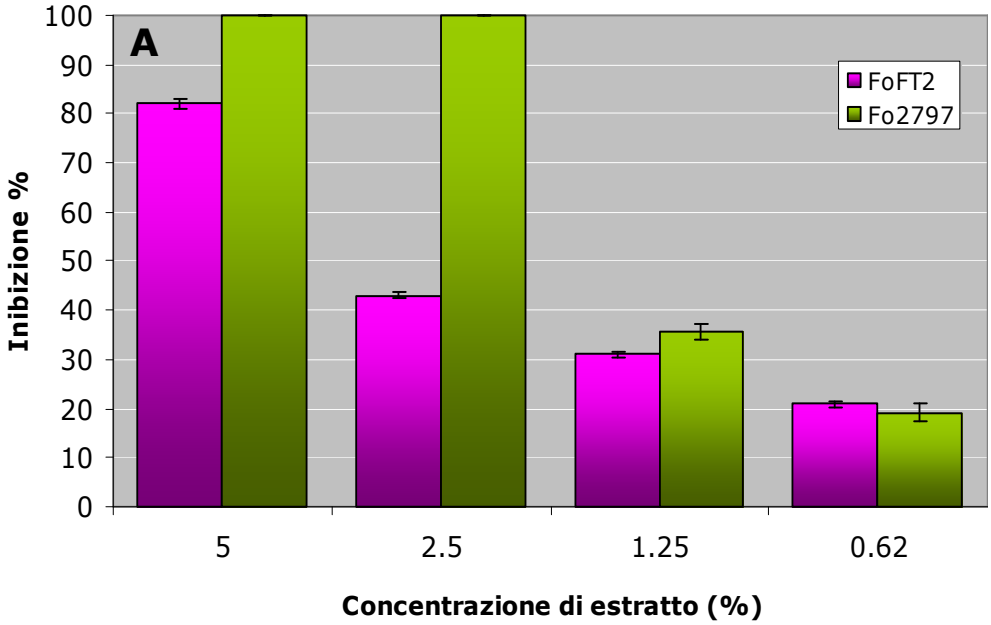
Fig. 3.7. Saggio di inibizione di *G. candidum* condotto con estratti organici di *F. oxysporum* Fo2797 coltivato su AH per 14 giorni.

Anche l'estratto colturale di Fo2797 ha mostrato attività antifungina nei confronti di *G. candidum*, determinando la comparsa di aloni d'inibizione intorno ai dischetti di cellulosa (Fig. 3.7). I diametri degli aloni di inibizione determinati da 10, 20 e 30 µl di estratto erano rispettivamente di 10, 20 e 25 mm.

3.3.2 Inibizione della crescita di *T. harzianum* Th908 da parte di metaboliti prodotti da *F. oxysporum* FoFT2 e Fo2797

L'inibizione di Th908 da parte di metaboliti con attività antifungina prodotti da FoFT2 e Fo2797 è stata valutata facendo crescere l'isolato di *Trichoderma* su PDA contenente 4 diverse concentrazioni (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% vol/vol) dell'estratto di ciascun isolato di *F. oxysporum*. L'effetto degli estratti è stato valutato mediante determinazione della percentuale di inibizione dell'accrescimento diametrale della colonia di Th908 (I%) rispetto a colonie non esposte all'azione degli estratti colturali.

I valori di I% di Th908 determinati dalle varie concentrazioni di estratti sono mostrati in Figura 3.8.



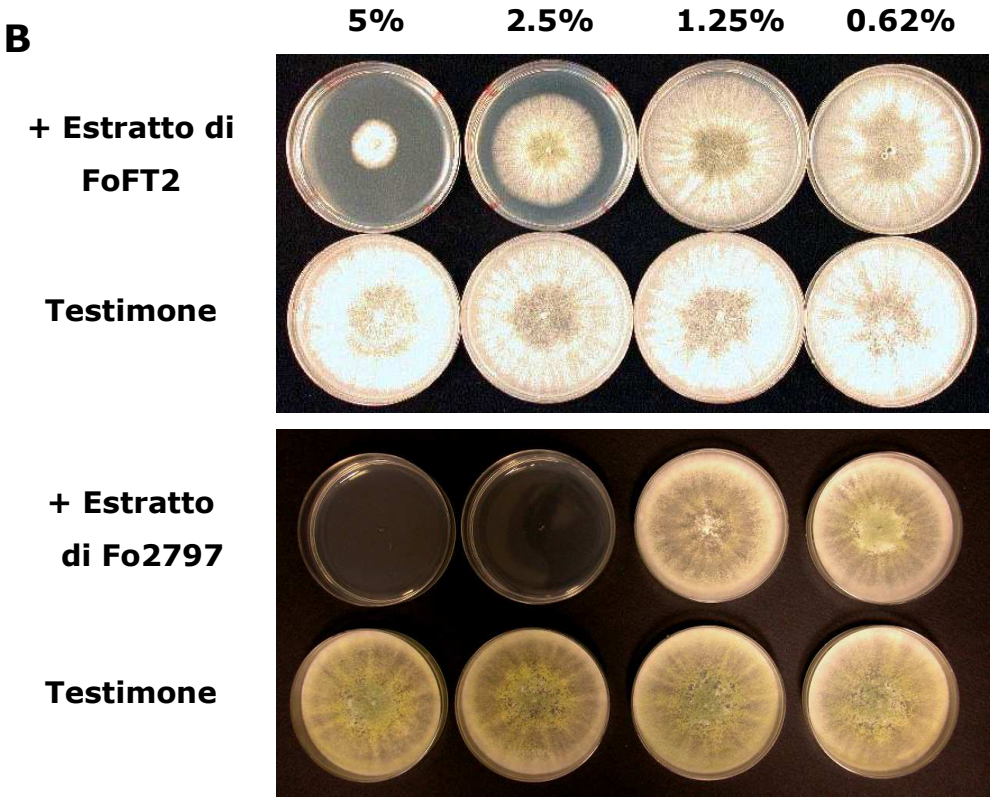


Fig. 3.8. Inibizione della crescita di Th908 in presenza di estratti organici degli isolati FoFT2 e Fo2797. **(A)** Inibizione percentuale (I%) ± DS della crescita di colonie di Th908 su PDA in presenza di diverse concentrazioni (5, 2,5, 1,25, 0,62%) di estratto organico. **(B)** Colonie di Th908 tre giorni dopo l'inoculazione su PDA contenente 5, 2,5, 1,25, o 0,62% di estratto di FoFT2 o Fo2797.

Dall'analisi dei dati di I% si rileva una maggiore attività antifungina da parte dell'estratto organico di Fo2797 (isolato fitopatogeno), rispetto a FoFT2 (isolato micoerbicida) (Fig. 3.8). Infatti, l'estratto di Fo2797, già alla concentrazione del 2,5% determinava la totale inibizione (I% = 100%) di Th908. Alla stessa concentrazione (2,5%), l'inibizione determinata dall'estratto di FT2 è risultata del 42% e alla concentrazione del 5% era dell'83%. A concentrazioni inferiori (1,25% e 0,62%) non è stata riscontrata una differenza significativa nell'effetto degli estratti dei due isolati di *F. oxysporum*, con valori di I del 31% e 21% per l'estratto di FoFT2 e di 36% e 19% per Fo2797 (Fig. 3.8).

3.4. IDENTIFICAZIONE DEI METABOLITI BIOATTIVI PRODOTTI DA *F. OXYSPORUM* FOFT2 E FO2797

Avendo rilevato un'attività antifungina da parte degli estratti organici di *F. oxysporum* FoFT2 e Fo2797, si è indagato sulla eventuale produzione di tre metaboliti bioattivi ad ampio spettro di azione da parte di questi isolati: enniatina (EN) (Gaumann et al., 1947), beauvericina (BEA) (Hamill et al., 1969) e acido fusarico (AF) (Gaumann, 1957),.

3.4.1 ANALISI CROMATOGRAFICA DI ENNIATINA E BEAUVERICINA

Gli estratti organici degli isolati FoFT2 e Fo2797 sono stati analizzati per la presenza di EN e BEA, mediante TLC.

A seguito dell'esposizione della lastra cromatografica a vapori di iodio e utilizzando come riferimento soluzioni standard di EN e BEA, si è potuto escludere, con un limite di rilevabilità di 1 µg/ml, la presenza di entrambi i composti negli estratti in esame (Fig. 3.9).

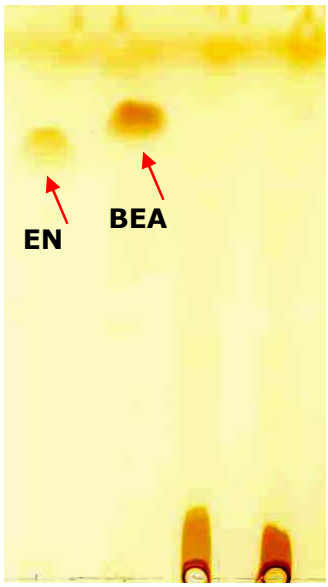


Fig. 3.9. TLC degli estratti organici degli isolati FoFT2 e Fo2797. Si può osservare l'assenza di EN e BEA nei campioni in esame. Le macchie indicate dalle frecce corrispondono alle sostanze pure utilizzate come standard.

3.4.2 ANALISI DI ACIDO FUSARICO MEDIANTE TLC

L'esame cromatografico degli estratti organici di FoFT2 e Fo2797 ha evidenziato la produzione di AF da parte di entrambi gli isolati.

In figura 3.10 è mostrata la separazione cromatografica degli estratti con i due diversi solventi di sviluppo utilizzati. In entrambi i sistemi è stata osservata la presenza di un composto avente Rf e caratteristiche di emissione di fluorescenza uguali allo standard di AF.

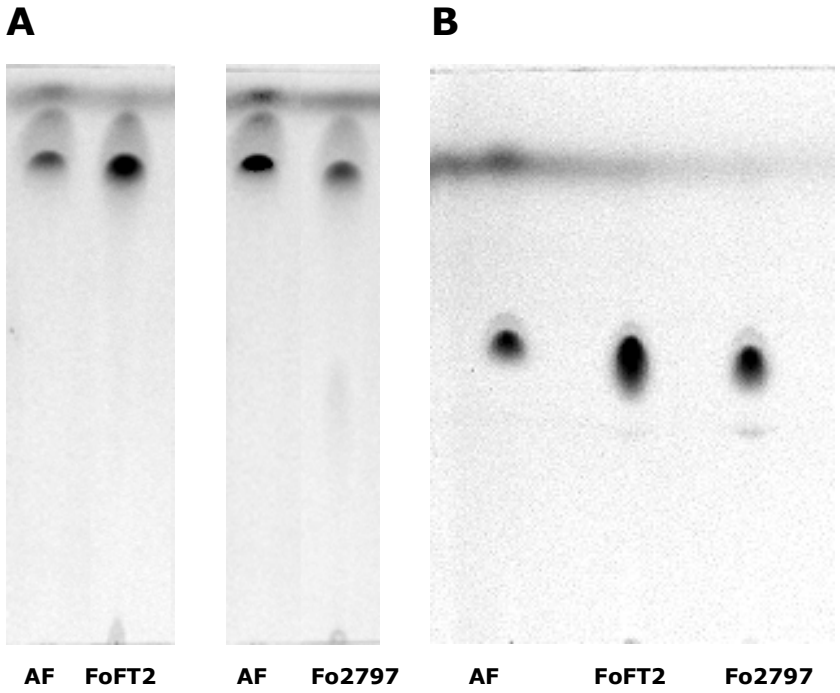


Fig. 3.10. TLC degli estratti organici degli isolati FoFT2 e Fo2797. Lastre HPTLC con indicatore di fluorescenza sviluppate con solvente A (sinistra) e solvente B (destra). AF fluoresce sotto luce UV (λ=254 nm). Gli estratti sono posti a confronto con uno standard di acido fusarico (AF).

3.4.3 QUANTIFICAZIONE DI ACIDO FUSARICO E ACIDO 9,10-DEIDROFUSARICO

Le determinazioni quantitative di AF e del suo analogo ADF negli estratti organici degli isolati FoFT2 e Fo2797 sono state effettuate mediante HPLC.

L'analisi ha confermato la presenza di entrambi i metaboliti negli estratti organici dei due isolati di *F. oxysporum*. L'AF era presente negli estratti organici di FoFT2 e Fo2797 in concentrazioni di 51 e 46 mg/ml,

rispettivamente. Le concentrazioni di ADF sono invece risultate pari a 34 e 151 mg/ml, rispettivamente. (Fig.3.11).

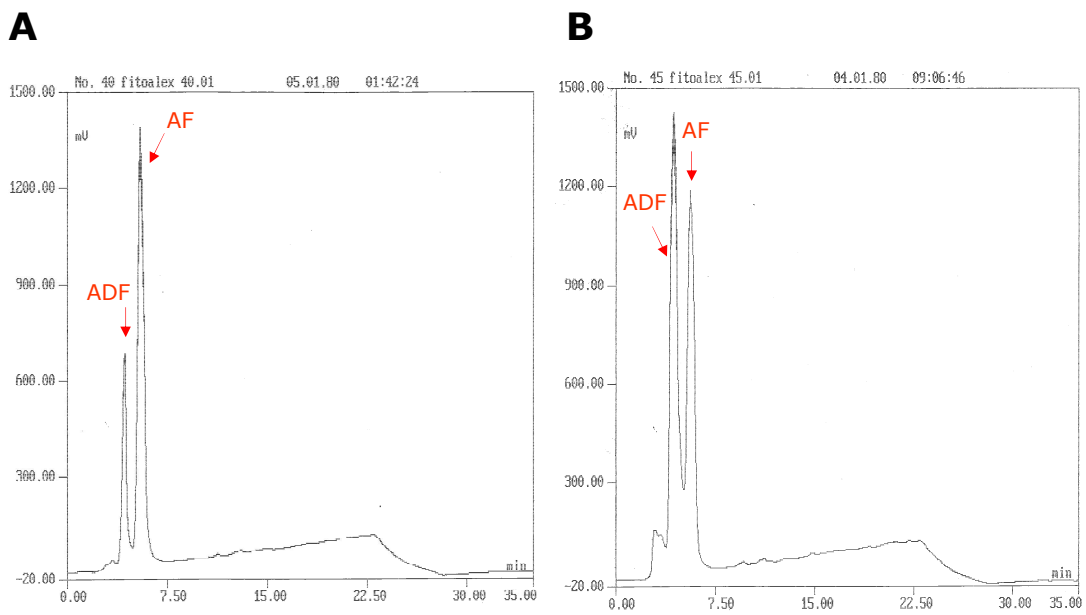


Fig. 3.11. Cromatogrammi HPLC degli estratti organici degli isolati **(A)** FoFT2 e **(B)** Fo2797. Le frecce indicano i picchi corrispondenti all'ADF e all'AF, aventi un tempo di ritenzione rispettivamente di 5,90 e 8,80 minuti.

3.5 INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI *T. HARZIANUM* TH908 DA PARTE DELL'ACIDO FUSARICO

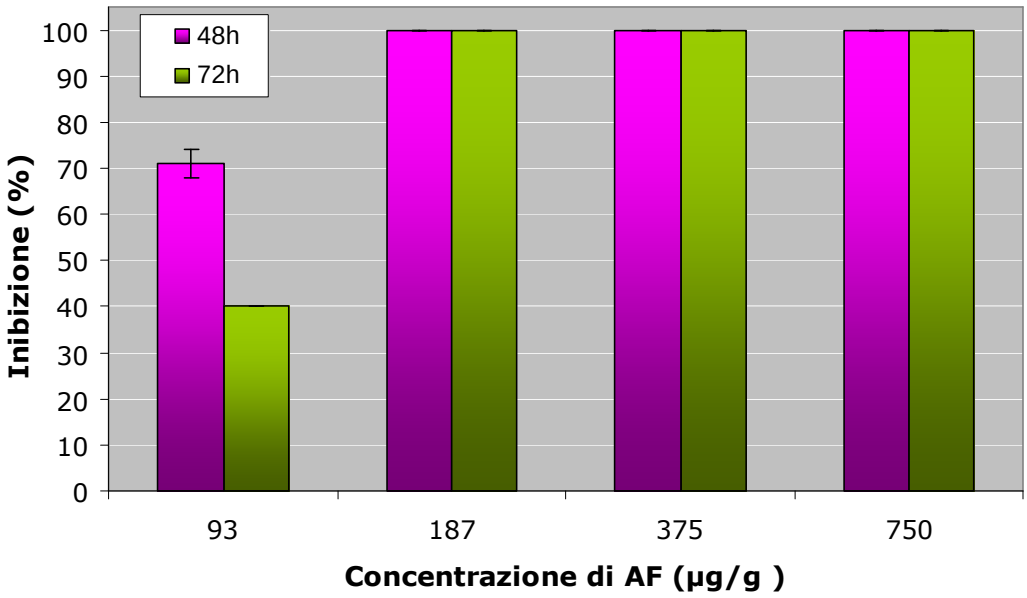
L'attività antifungina dell'AF nei confronti di Th908 è stata saggiata facendo crescere l'isolato su un substrato agarizzato contenente 4 diverse concentrazioni (750, 375, 187 e 93 µg/g) della sostanza pura. L'effetto dell'AF è stato valutato mediante determinazione della percentuale di inibizione dell'accrescimento diametrale della colonia di Th908 (I %) rispetto a colonie non esposte all'azione del metabolita.

I valori di I% di Th908 determinati dalle varie concentrazioni di AF sono mostrati in figura 3.12.

Nel corso della prova, AF testato alle concentrazioni di 187, 375 e 750 µg/g ha determinato la totale inibizione (I%=100%) della crescita di Th908. Invece, l'inclusione nel substrato di 93 µg/g di AF ha determinato

valori di I % di Th908 pari al 71% e 40 %, rispettivamente dopo 48 e 72 h dall'inoculazione.

A



B

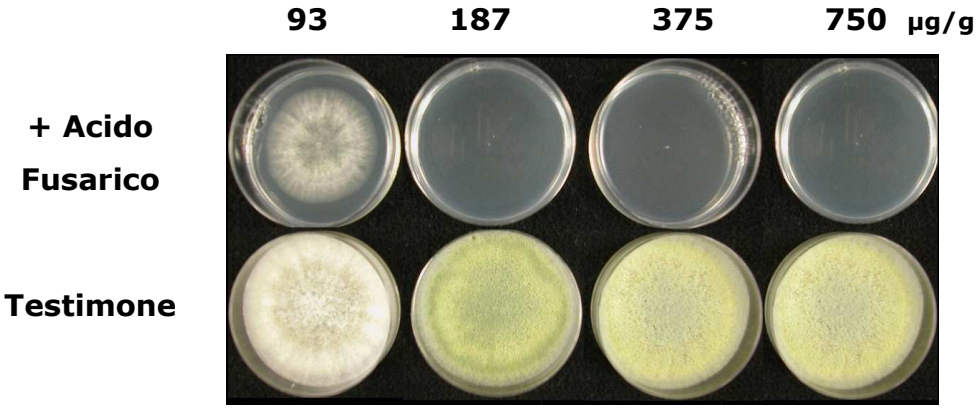


Fig. 3.12. Inibizione della crescita di Th908, in presenza di diverse concentrazioni di AF. **(A)** Inibizione percentuale (I%) ± DS della crescita di colonie di Th908 su PDA in presenza di diverse concentrazioni (93, 187, 375 e 750 µg/g) di AF, dopo 48 e 72 h. **(B)** Colonie di Th908 tre giorni dopo l'inoculazione su PDA contenente AF (93, 187, 375 e 750 µg/g).

3.6 OTTENIMENTO DI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* TH908 DOTATI DI RESISTENZA A METABOLITI DI *F. OXYSPORUM*

3.6.1 MESSA A PUNTO DELLE CONDIZIONI DI MUTAGENESI

Il tempo di esposizione agli UV-C tale da indurre la mutazione dei conidi è stato individuato esponendo ad irraggiamento i conidi di Th908 per intervalli di tempo compresi tra 1 e 120 minuti.

Le percentuali di mortalità delle spore di Th908 causate dai diversi tempi di esposizione agli UV-C sono mostrate in figura 3.13. L'esposizione per 1, 2, 5 e 10 minuti ha determinato rispettivamente il 30%, l'85%, il 95% ed il 98% di mortalità delle spore. Tempi di esposizione più prolungati (da 20 a 120 minuti) hanno determinato la morte del 100% dei conidi.

Sulla base di questi risultati, nei successivi esperimenti di mutagenesi è stato utilizzato un tempo di esposizione dei conidi agli UV-C pari a 2 minuti.

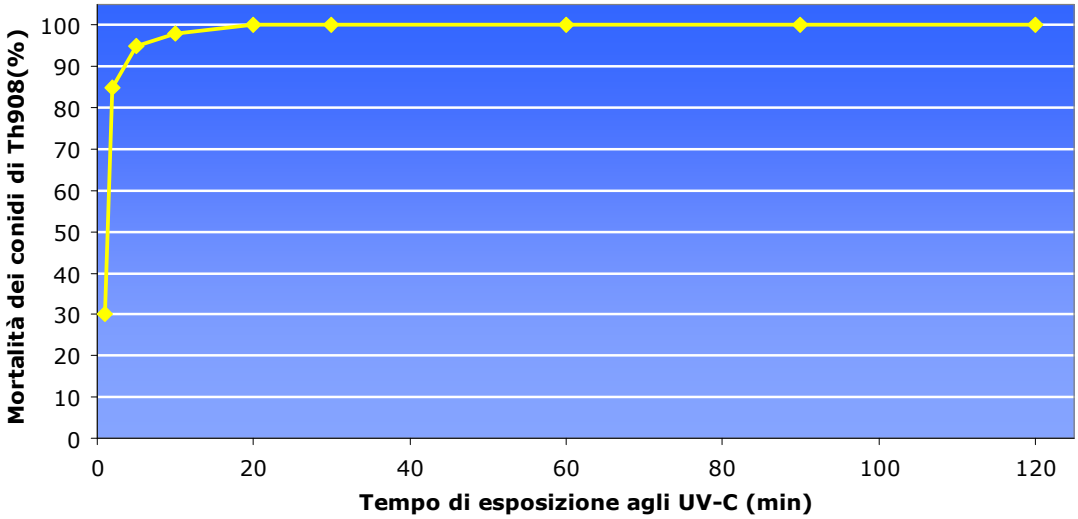


Fig. 3.13. Mortalità (%) dei conidi di Th908 in funzione dei diversi tempi di esposizione agli UV-C (1, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 minuti).

3.6.2 SELEZIONE DEI MUTANTI RESISTENTI

Dopo essere stati esposti agli UV-C per 2 minuti, i conidi di Th908 sono stati selezionati per la resistenza sviluppata nei confronti dei metaboliti antifungini prodotti dall'isolato FoFT2. A questo scopo, è stato valutato l'accrescimento radiale delle colonie dei possibili mutanti su piastre di PDA contenenti il 5 % (vol/vol) di estratto organico di FoFT2 e su piastre contenenti AHA sul quale erano state fatte crescere per 4 giorni colonie di FoFT2 in modo da consentire la diffusione dei metaboliti bioattivi nel substrato. Per individuare i mutanti resistenti, la crescita delle colonie originate da conidi sottoposti a trattamento UV è stata confrontata con quella del ceppo selvatico (Th908-wt) (Fig. 3.14.).

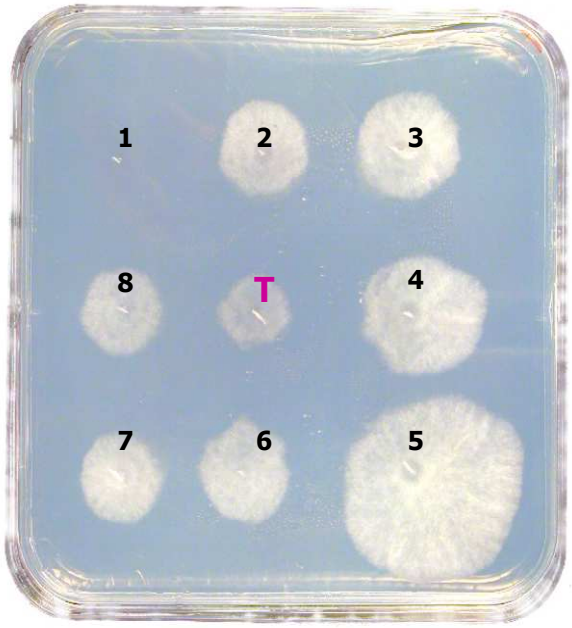


Fig. 3.14. Piastra di AHA sulla quale è stato fatto crescere per 4 giorni FoFT2 in modo da consentire la diffusione dei metaboliti bioattivi nel substrato. Singoli conidi germinati di Th908, esposti agli UV-C per 2 minuti, sono stati inoculati in 8 diversi punti. La selezione si è basata sul confronto dell'accrescimento radiale dei nuovi biotipi (1-8) con quello del testimone (T), Th908-wt.

Da piastre di AA con l'aggiunta del 5% (vol/vol) di estratto organico di FoFT2 sono stati isolati complessivamente 300 presunti mutanti. Tra questi, in seguito ad una ulteriore verifica della resistenza acquisita su PDA oppure su AHA, sono stati selezionati 25 mutanti, i quali presentavano una velocità di crescita sul substrato arricchito con metaboliti di FoFT2 superiore rispetto a Th908-wt (Fig. 3.15).

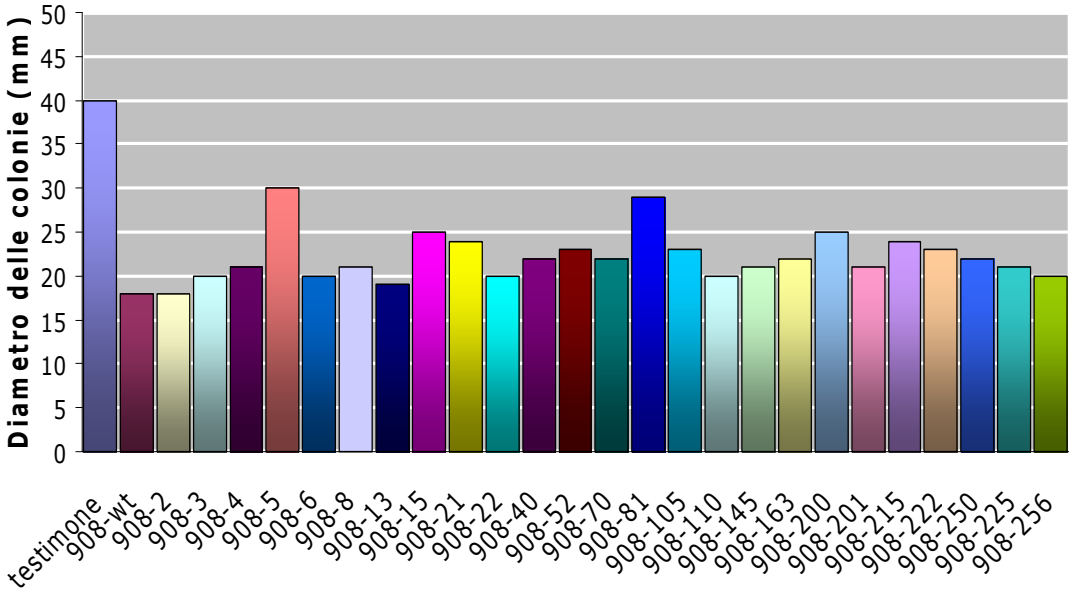
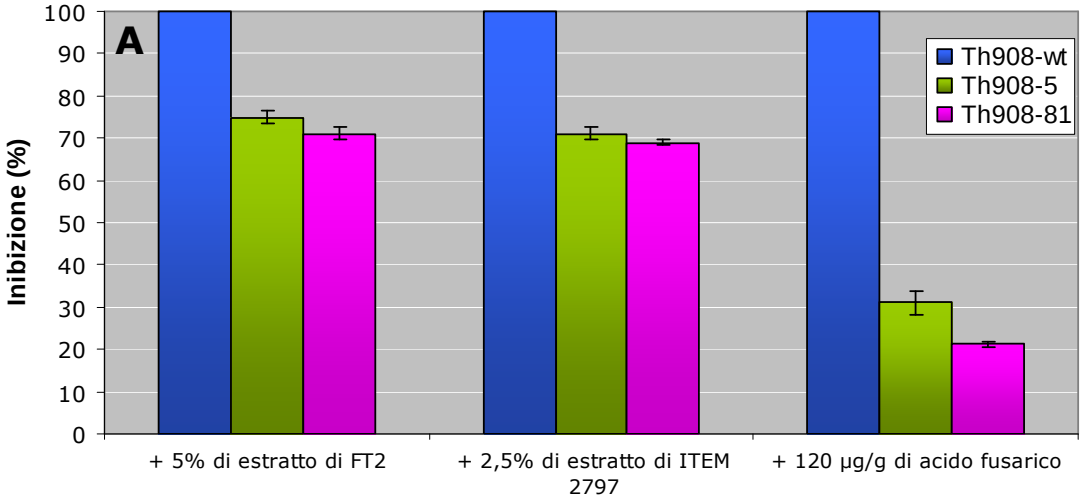


Fig. 3.15. Valutazione della resistenza di 25 presunti mutanti a metaboliti con attività antifungina di FoFT2. Accrescimento diametrale (mm) delle colonie dei mutanti in confronto a quello del ceppo selvatico Th908-wt.

Dopo questa prima fase di screening, i 25 mutanti selezionati sono stati valutati per la resistenza nei confronti degli estratti organici di FoFT2 e Fo2797, e dell'AF. Questa ulteriore fase di valutazione ha condotto alla selezione di 2 mutanti, il mutante 5 (Th908-5) ed il mutante 81 (Th908-81), dotati di più elevata resistenza all'azione inibente dei metaboliti di *F. oxysporum* (Fig. 3.16). La crescita di Th908-wt su PDA contenente il 5% di estratti organici di FoFT2, il 2,5% di Fo2797 o 120 µg/g di AF è stata completamente inibita (I%=100%). Al contrario, in presenza degli estratti organici di FoFT2 e Fo2797, la crescita di Th908-5 è stata inibita

del 75 e del 71%, rispettivamente, mentre la crescita di Th908-81 del 71 e del 69%.



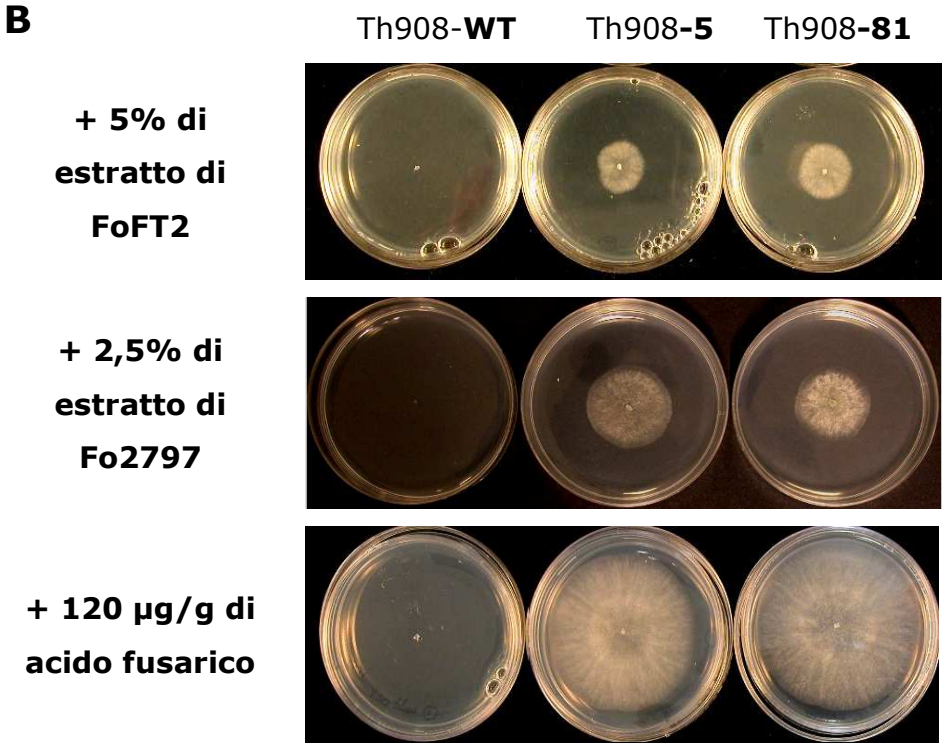


Fig. 3.16. Inibizione della crescita di Th908-wt e dei mutanti Th908-5 e Th908-81 in presenza di estratti organici degli isolati FoFT2 e Fo2797, e di AF. **(A)** Inibizione percentuale (I%) ± DS della crescita delle colonie su PDA in presenza del 5% (vol/vol) di estratto di FoFT2, del 2,5% (vol/vol) di estratto di Fo2797 e di 120 µg/g di AF. **(B)** Colonie dei 3 biotipi su PDA contenente estratti colturali di FoFT2 o Fo2797, o AF dopo tre giorni dall'inoculazione.

Valori di inibizione ancora inferiori sono stati registrati in presenza di 120 µg/g di AF. In questo caso l'inibizione è risultata del 31,5% per Th908-5 e del 21,3% per Th908-81 (Fig. 3.16).

3.7 INTERAZIONE IN VITRO TRA I CEPPI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* TH908 E *F. OXYSPORUM* (COLTURA DUALE)

La resistenza dei mutanti Th908-5 e Th908-81 ai metaboliti con attività antifungina prodotti da *F. oxysporum* (isolati FoFT2 e Fo2797) è stata testata in vitro mediante coltura duale su 3 diversi substrati (PDA, AHA e MDP). La resistenza acquisita è stata valutata mediante determinazione dell'inibizione percentuale dell'accrescimento radiale (I%) delle colonie di *T. harzianum* e osservazione del tipo di interazione tra i miceli dei funghi posti a confronto.

3.7.1 INIBIZIONE DELL'ACCRESCIMENTO DELLE COLONIE DI *T. HARZIANUM*

Dopo 24 h dall'inoculazione delle capsule, le colonie erano ancora troppo distanti per poter apprezzare alcun tipo di interazione. Dopo 72 h dall'inoculazione le colonie avevano raggiunto la massima crescita diametrale consentita dalla dimensione delle capsule e pertanto non era più possibile apprezzare l'inibizione della crescita. Pertanto, i rilievi sono stati effettuati dopo 48 h dall'inoculazione. I risultati di questa prova sono sintetizzati in tabella 3.3.

Nel confronto con FT2, gli isolati Th908-wt, Th908-5 e Th908-81 sono risultati inibiti in egual misura su PDA e MDP. Su AHA, dove la produzione di metaboliti antifungini da parte di *F. oxysporum* è maggiore (vedi paragrafo 3.3.1), è stata osservata una differenza statisticamente molto significativa ($p<0,001$) tra l'inibizione subita da Th908-wt (I = 28,1%) e quella subita dal mutante Th908-5 (I = 9,3%). Il mutante Th908-81 non è invece cresciuto su AHA.

Risultati analoghi sono stati ottenuti nel confronto del ceppo selvatico e dei due mutanti con Fo2797 su PDA e MDP. Su AHA, a causa della sovrapposizione delle colonie dei due funghi al momento del rilievo, non è

stato possibile misurare l'accrescimento radiale e, di conseguenza, calcolare i valori di inibizione percentuale corrispondenti.

Tab. 3.3. Inibizione percentuale (I%) dell'accrescimento radiale delle colonie di Th908-wt, Th908-5 e Th908-81 per effetto di FoFT2 e Fo2797 in colture duali. Dati rilevati dopo due giorni dall'inoculo utilizzando tre diversi substrati (PDA, AHA e MDP).

	F. oxysporum FoFT2			*F.oxysporum* Fo2797		
	PDA	AHA	MDP	PDA	AHA	MDP
Th908-wt	19,3	28,1	26	43,3	nc	53,1
Th908-5	25,6	9,3*	22,8	44,2	nc	50,2
Th908-81	18,7	-	34,1	39,6	-	45,9

***** Differenza statisticamente significativa ripetto ad Th908-wt ($p<0,001$)
nc Valori di inibizione percentuale non calcolati a causa della sovrapposizione delle colonie dei due funghi posti a confronto.
- L'isolato non cresceva su questo substrato.

3.7.2 INTERAZIONE MICELICA DEI FUNGHI POSTI A CONFRONTO

Le colture duali sono state esaminate dopo tre settimane per valutare il tipo di interazione tra le colonie dei funghi posti a confronto, in accordo con Whipps (Whipps, 1987). I risultati sono mostrati in tabella 3.4.

In questa prova si è osservato un comportamento differenziato dei ceppi di *T. harzianum* in relazione all'isolato di *F. oxysporum* (FoFT2 o Fo2797) con cui sono stati posti a confronto (Tab. 3.4).

Tab. 3.4. Tipo di interazione[(a)] che osservava tra le colonie di *T. harzianum* (Th908-wt, Th908-5, Th908-81) e di *F. oxysporum* (FoFT2 o Fo2797). Dati rilevati dopo 3 settimane dall'inoculo utilizzando tre diversi substrati (PDA, AHA e MDP).

	F. oxysporum FoFT2			*F.oxysporum* Fo2797		
	PDA	AHA	MDP	PDA	AHA	MDP
Th908-wt	1	4	2	2	2	2
Th908-5	1	3	1/2	2	3	3
Th908-81	1	1/2	1/2	3	2/1	2/1

[(a)] **1**= *F. o.* si arresta e *T. h.* cresce su *F. o.*; **1/2** = *T. h.* cresce su *F. o.*, ma *F. o.* continua a crescere; **2/1** = *F. o.* cresce su *T. h.*, ma *T. h.* continua a crescere; **2 =** *T. h.* si arresta e *F. o* cresce su *T. h.*; **3** = Lieve inibizione reciproca (zona di inibizione tra le colonie di circa 2 mm); **4** = Forte inibizione reciproca (zona di inibizione tra le colonie maggiore di 4 mm) (Whipps, 1987).

Confronto con FoFT2 (Fig. 3.16). Su PDA, sia il ceppo selvaggio che i due mutanti di *T. harzianum* hanno mostrato la capacità di sovrastare FoFT2 e, conseguentemente, bloccarne la crescita (interazione tipo 1). Su MDP, Th908-wt ha subíto l'effetto di FoFT2 (interazione tipo 2), il quale, sovrastandolo, ne ha interrotto la crescita. Al contrario, i due mutanti non hanno risentito dell'azione inibitoria di FoFT2 e hanno continuato ad accrescersi, senza peraltro mai bloccare lo sviluppo miceliare dell'isolato di *F. oxysporum* (interazione tipo ½). Su AHA, l'interazione tra Th908-wt e FoFT2 era caratterizzata dalla formazione di una zona di mutua inibizione dell'ampiezza di 4 mm (interazione tipo 4). Un'inibizione reciproca più lieve (ampiezza della zona di inibizione pari a 2 mm) è stata invece osservata nel confronto con il mutante Th908-5 (interazione di tipo 3). Il mutante Th908-81, che dopo 48 h dal'inoculazione non era ancora cresciuto su AHA (Tab. 3.3), una volta entrato in contatto con il micelio di FoFT2 ha cominciato ad accrescersi e a sporificare su di esso (interazione tipo ½).

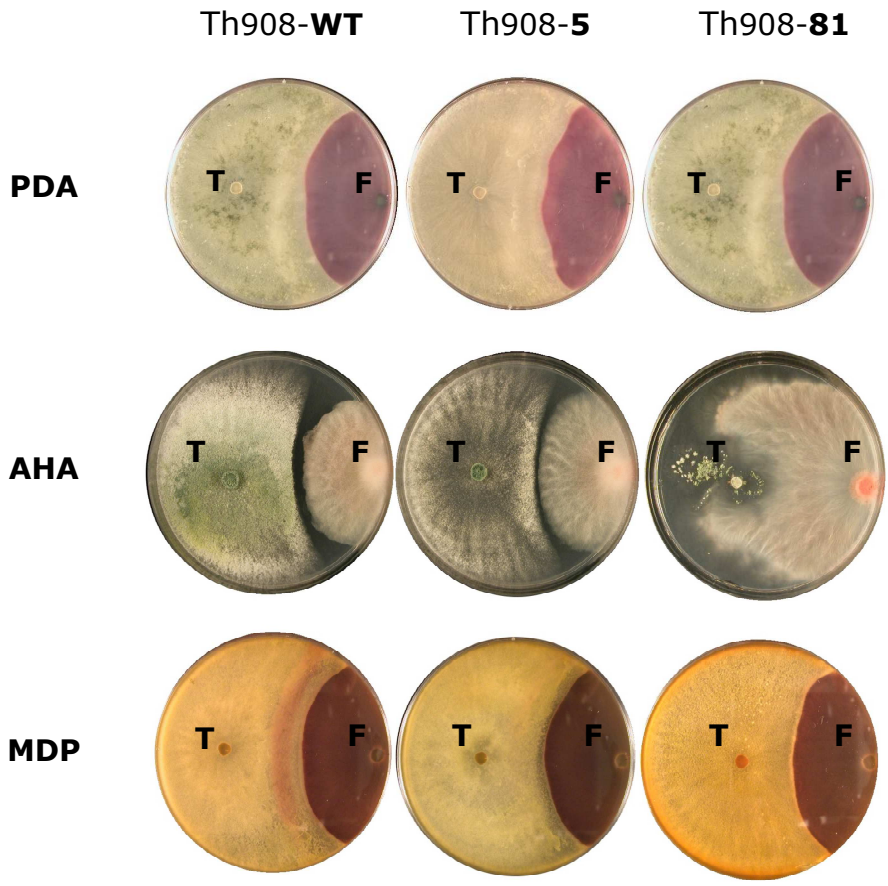


Fig. 3.16. Colture duali di *T. harzianum* (**T**) Th908-wt, Th908-5 e Th908-81 con *F. oxysporum* (**F**) FoFT2, su 3 differenti substrati (PDA, AHA, MDP) dopo tre settimane dall'inoculo.

Confronto con Fo2797 (Fig. 3.17). Su tutti e tre i substrati impiegati, si è assistito all'arresto di Th908-wt a causa della sovracrescita del micelio dell'isolato patogeno di *F. oxysporum* sull'antagonista (interazione tipo 2). Per il ceppo mutante Th908-5, su PDA si è osservato una situazione analoga a quella di Th908-wt (interazione tipo 2), mentre su AHA e MDP è stata riscontrata la presenza di una zona di mutua inibizione di ampiezza inferiore a 2 mm (interazione tipo 3). Per quanto riguarda il ceppo mutante Th908-81, su PDA è stata riscontrata una lieve inibizione reciproca (interazione tipo 3), mentre su MDP e AHA, la colonia del mutante, pur essendo sovrastata dal micelio dell'isolato patogeno non ha arrestato la sua crescita (interazione tipo 2/1).

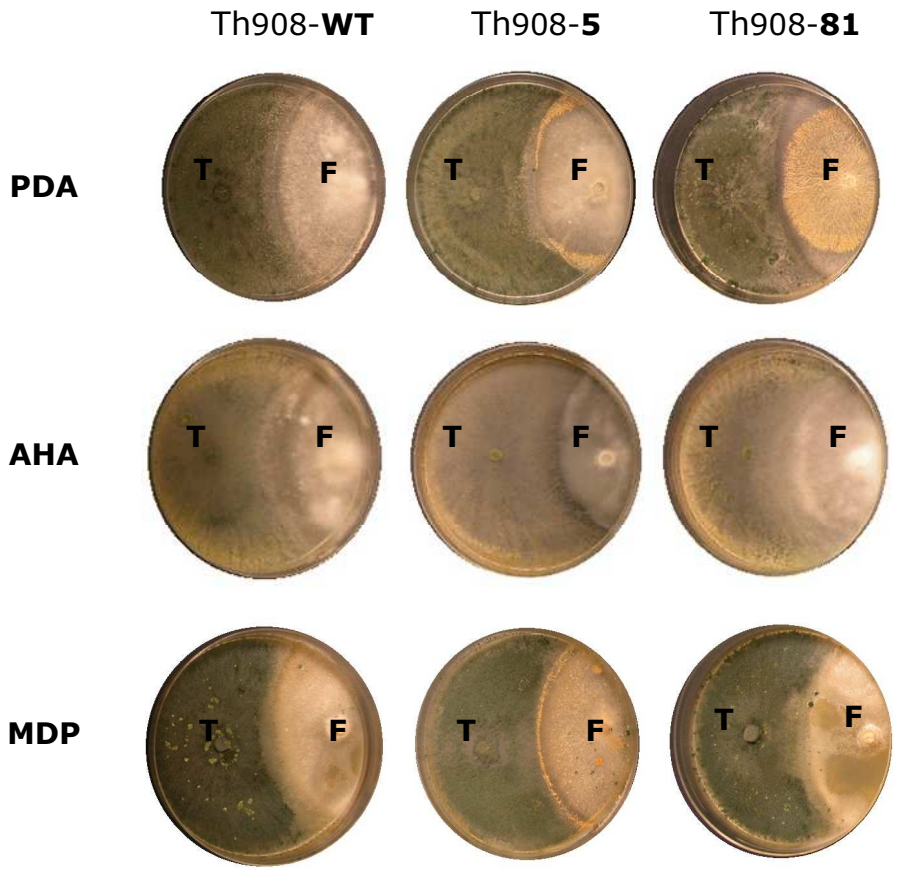


Fig. 3.17. Colture duali di *T. harzianum* (**T**) Th908-wt, mutante Th908-5 e mutante Th908-81 con *F. oxysporum* (**F**) Fo2797, su 3 differenti substrati (PDA, AHA, MDP) dopo tre settimane dall'inoculo.

3.8. VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE FISIOLOGICHE DEI MUTANTI: RHIZOSPERE COMPETENCE

La competenza per la rizosfera dei ceppi mutanti di *T. harzianum*, Th908-5 e Th908-81 è stata valutata con il metodo descritto da Ahmad & Baker (1987), utilizzando come sistema modello piantine di pomodoro.

Dopo 10 giorni dalla semina, le radichette delle piantine di pomodoro estratte dai tubi di polipropilene presentavano una lunghezza compresa tra 3,5 e 4,5 cm. Non si osservavano differenze significative nello sviluppo radicale delle piantine trattate con il ceppo selvaggio o con i ceppi mutanti.

La capacità dei tre isolati di *T. harzianum* di colonizzare in tutta la sua interezza l'apparato radicale delle piantine di pomodoro è stata valutata mediante determinazione delle CFU per cm di radice.

La distribuzione del ceppo selvaggio e dei due mutanti lungo le tre porzioni in cui è stata suddivisa la radice, valutata mediante determinazione delle CFU/cm, è risultata simile. In tutti e tre i casi si è riscontrato una maggiore densità nella parte di radice prossimale, seguíta da un significativo decremento nella parte centrale (p<0,01) e una stabilizzazione nella porzione distale (Fig. 3.18-A).

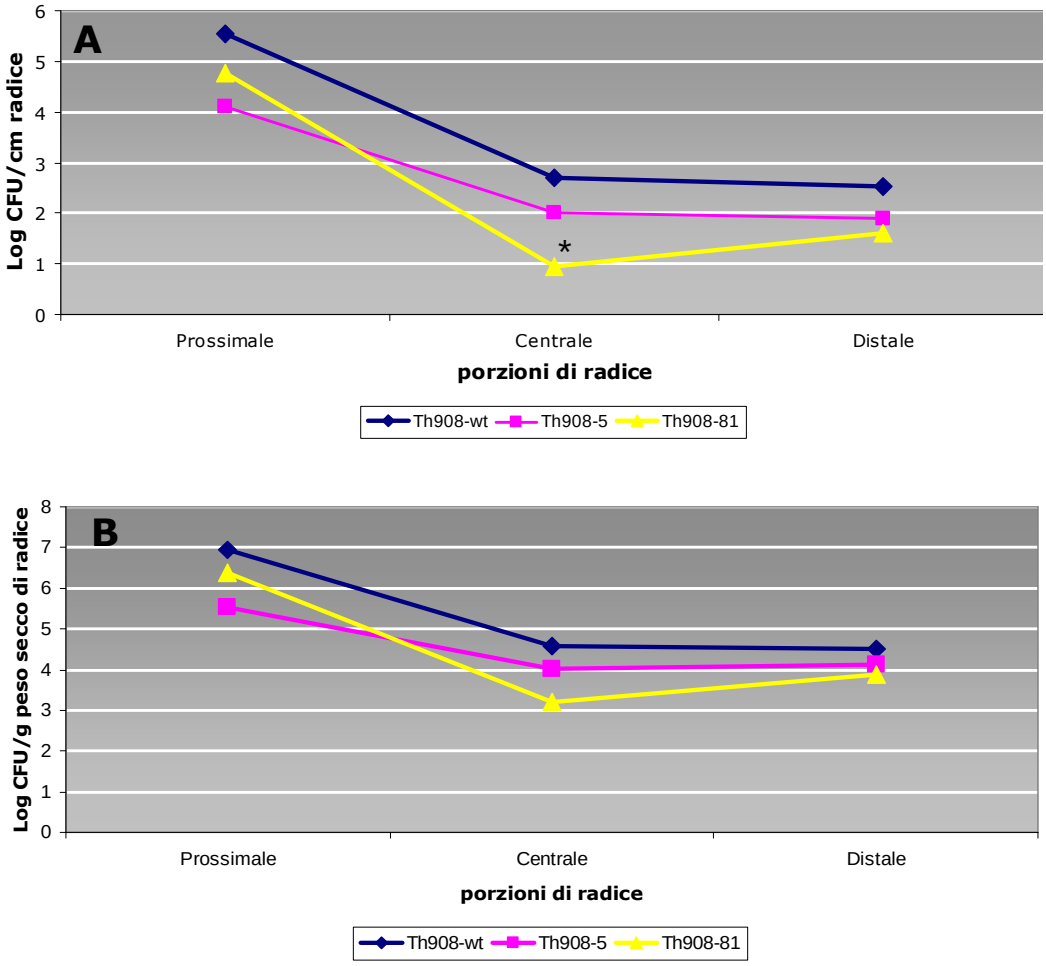


Fig. 3.18 (A) Densità di popolazione (Log CFU/cm radice) di Th908-wt, Th908-5 e Th908-81 lungo le tre porzioni in cui è stata suddivisa la radice: porzione prossimale, porzione centrale e porzione distale. L'asterisco (*) corrisponde ad un valore di CFU/cm significativamente differente (p<0,05) da quelli degli altri due ceppi nella stessa porzione di radice. **(B)** Densità di popolazione (Log CFU/g radice) di Th908-wt, di Th908-5 e Th908-81 per biomassa vegetale delle tre porzioni di radice: prossimale, centrale e distale.

In termini quantitativi, si è osservata una differenza nella densità del ceppo mutante Th908-81 nella porzione centrale delle radici, che è risultata significativamente ($p<0,05$) inferiore a quella degli altri due isolati.

Risultati analoghi sono stati ottenuti rapportando la densità di popolazione dei tre isolati di *T. harzianum* alla biomassa delle radichette (Fig.3.18-B).

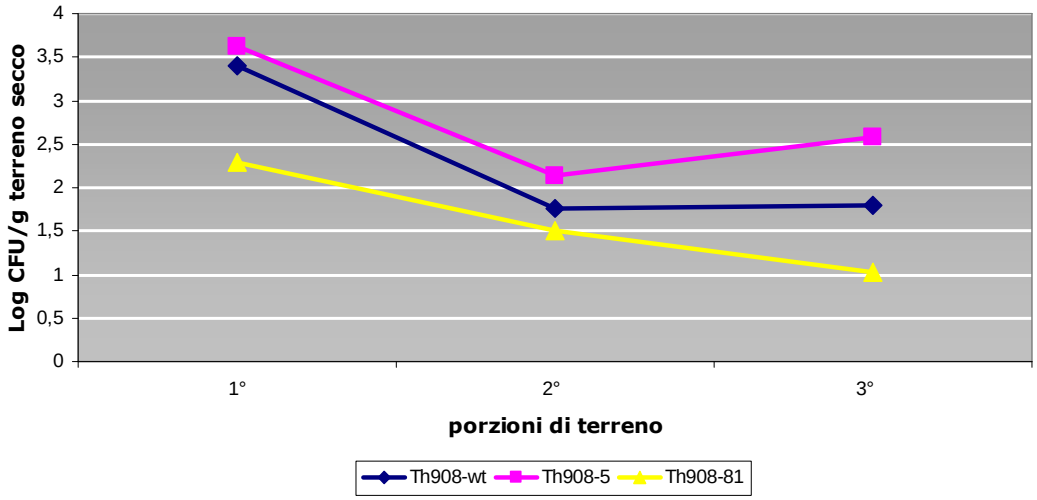


Fig. 3.19 Densità di popolazione (Log CFU/g terreno secco) di Th908-wt, del mutante Th908-5 e del mutante Th908-81 rilevata nelle tre porzioni (1°, 2°, 3°) in cui è stato suddiviso il terreno contenuto nei tubi di polipropilene.

Gli isolati di *T. harzianum* sono risultati in grado di colonizzare anche il terreno intorno alle radichette, diffondendosi nel terreno non direttamente a contatto con esse. Le popolazioni dei tre funghi nel terreno hanno mostrato un andamento simile a quello osservato sulle radichette, sebbene con valori di CFU inferiori (Fig. 3.19).

3.9 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTAGONISTICA DEI MUTANTI DI *T. HARZIANUM* IN VIVO

L'attività antagonistica dei mutanti di *T. harzianum* è stata saggiata in semenzai di pomodoro coltivati su vermiculite sterile contaminata con *F. oxysporum*.

Sin dai primi rilievi le piantine del testimone positivo Fo2797 hanno manifestato evidenti sintomi di fusariosi (Fig. 3.20-A).

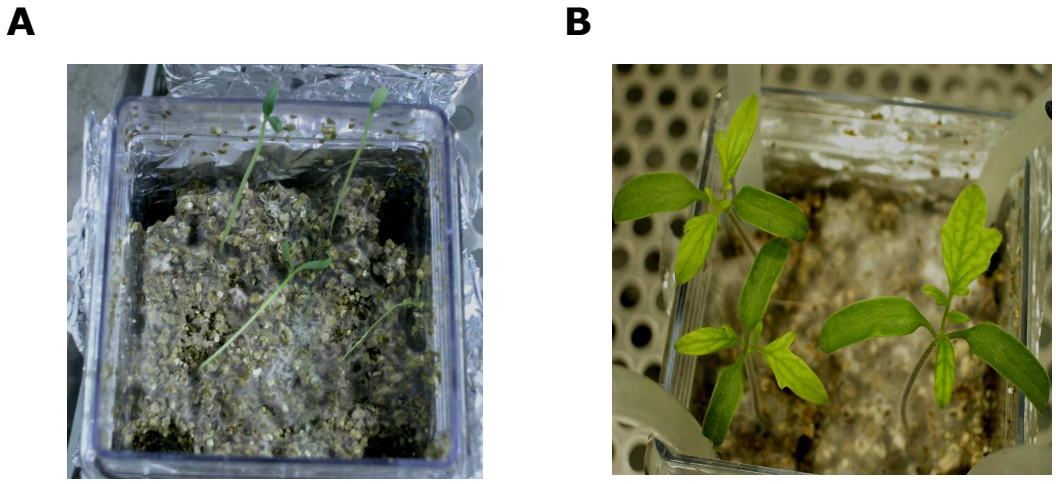
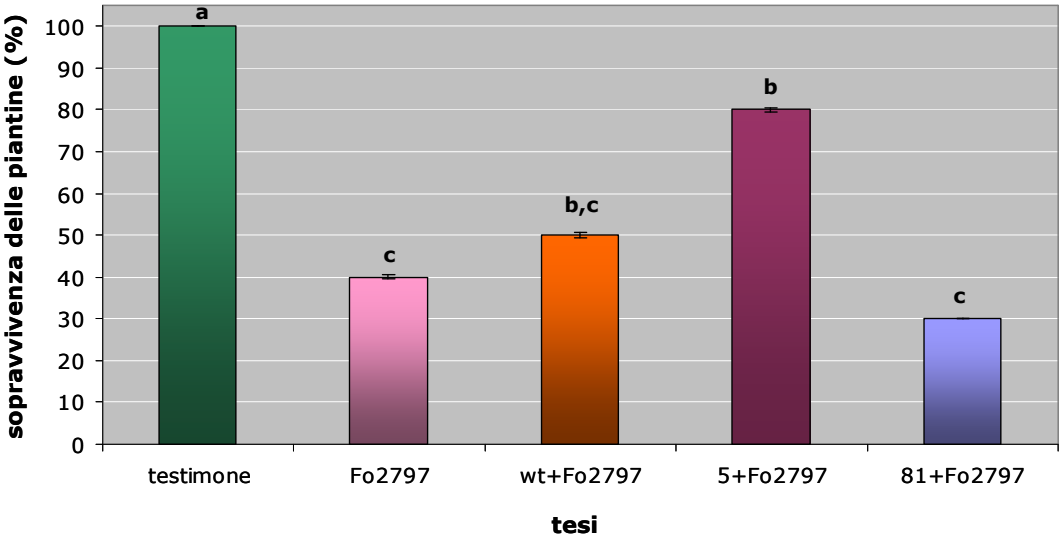


Fig. 3.20 Effetto fitopatogeno degli isolati di *F. oxysporum* (Fo2797 e FoFT2) su piantine di pomodoro coltivate su vermiculite inoculata con una sospensione conidica dei due isolati fungini, dopo 21 giorni di incubazione. **(A)** Ridotto o mancato sviluppo dei germogli causati dall'azione dell'isolato Fo2797. **(B)** Segni di clorosi internervale sulle foglie più giovani delle piantine in presenza del micoerbicida FoFT2.

Dopo 60 giorni dalla semina, nel testimone positivo si registrava una riduzione del 60% della sopravvivenza delle piantine di pomodoro, rispetto al testimone negativo (Fig. 3.21). Il trattamento con gli isolati Th908-wt e Th908-5 ha determinato un incremento della sopravvivenza delle piantine, rispettivamente del 10% e del 40% (Fig. 3.21). Al contrario, l'isolato Th908-81 ha causato un'ulteriore riduzione della sopravvivenza (10%) (Fig. 3.21).

A



B

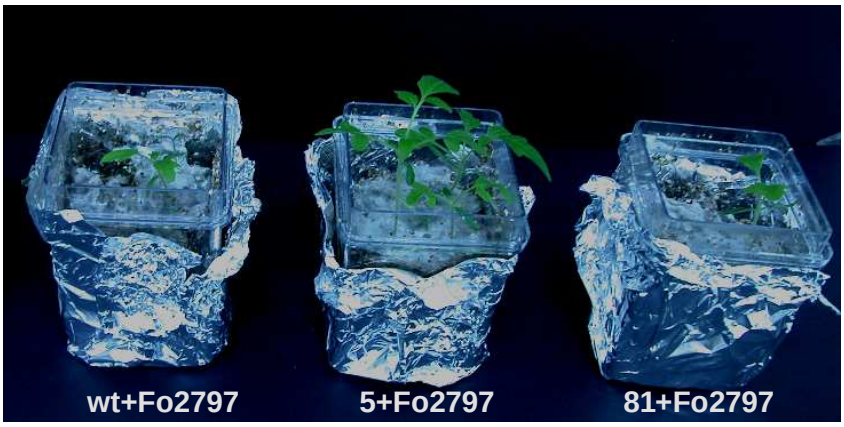
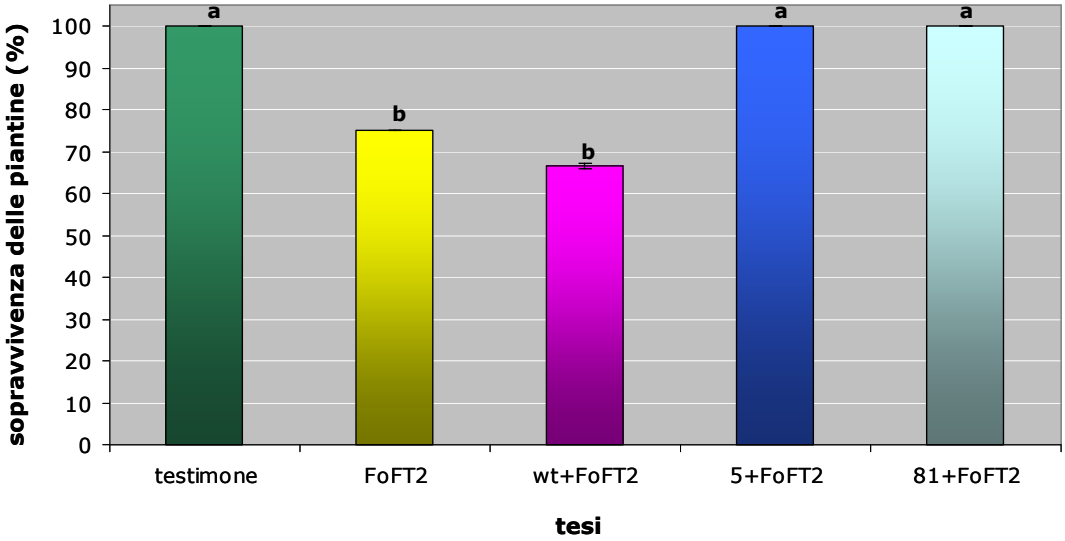


Fig. 3.21 (A) Sopravvivenza in vermiculite contaminata con Fo2797 di piantine di pomodoro trattate con gli isolati Th908-wt (wt), Th908-5 (5), e Th908-81 (81). A lettere diverse corrispondono valori statisticamente diversi (p<0,05) in base al test di Tuckey.**(B)** Aspetto delle piantine dopo 60 giorni di incubazione in camera di crescita.

Anche l'isolato micoerbicida FoFT2 ha mostrato una certa fitopatogenicità, sebbene moderata (Fig. 3.20-B). Nel testimone positivo FoFT2 si è infatti riscontrato una mortalità del 25% delle piantine di pomodoro (Fig. 3.22). Un'ulteriore riduzione dell' 8,4% nella percentuale di piantine vitali è stata registrata a seguito del trattamento con il ceppo

selvatico di *T. harzianum* (Th908-wt). Viceversa, il trattamento con i due mutanti (Th908-5 e Th908-81) ha portato in entrambi i casi ad un incremento del 25% della sopravvivenza delle piantine (Fig. 3.22).



A

B

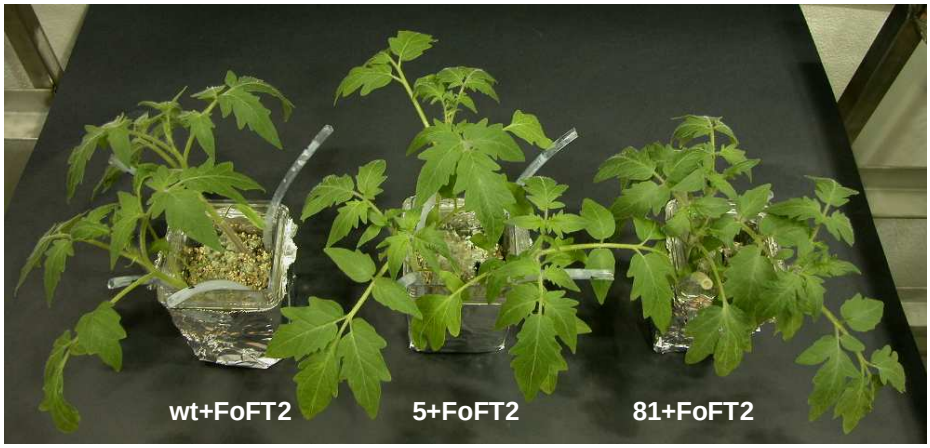


Fig. 3.22 (A) Sopravvivenza in vermiculite contaminata con FoFT2 di piantine di pomodoro trattate con gli isolati Th908-wt (wt), Th908-5 (5), e Th908-81 (81). A lettere diverse corrispondono valori statisticamente diversi (p<0,001) in base al test di Tuckey,. **(B)** Aspetto delle piantine dopo 60 giorni di incubazione in camera di crescita.

E' infine da osservare che, in assenza di *F. oxysporum*, anche gli isolati Th908-wt e Th908-81 hanno mostrato una certa fitopatogenicità, da lieve a moderata, causando una riduzione della sopravvivenza delle piantine rispettivamente del 33,4% e 16,7% (dati non mostrati). Al contrario, il trattamento con il mutante Th908-5 ha dato un esito del 100% di sopravvivenza delle piantine, analogamente al testimone negativo (Fig. 3.23).

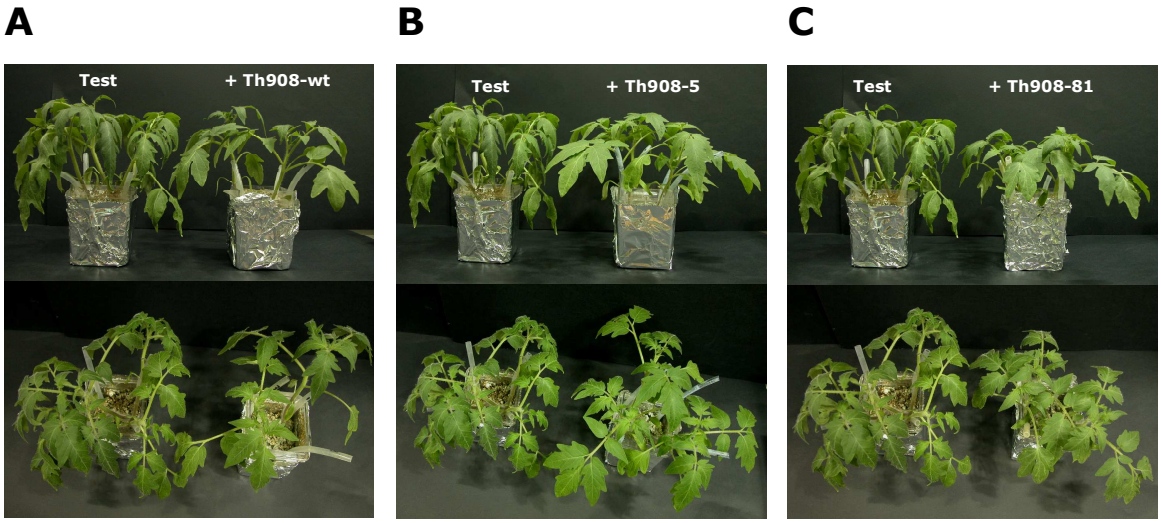


Fig. 3.23 Piantine di pomodoro derivanti da semi inoculati con sospensioni conidiche degli isolati **(A)** Th908-wt, **(B)** Th908-5, e**(C)** Th908-81, allevate in vermiculite sterile. Si osservano lievi-moderati effetti fitopatogeni da parte dei ceppi Th908-wt e Th908-81. Test = semi non inoculati in vermiculite sterile**.**

3.10 ANALISI DI ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELLA MULTI DRUG RESISTANCE (MDR) IN *T. HARZIANUM*

I due mutanti di *T. harzianum* (Th908-5 e Th908-81), risultati resistenti ai metaboliti antifungini prodotti dagli isolati di *F. oxysporum* (FoFT2 e Fo2797), sono stati sottoposti ad ulteriori indagini di tipo molecolare, per valutare la presenza e l'espressione di geni potenzialmente coinvolti nei meccanismi di polichemioresistenza (Multi Drug Resistance, MDR).

A tal fine, sono stati presi in considerazione geni putativamente codificanti proteine coinvolte nella resistenza agli antibiotici (MDR ProB,

MDR BrefA e MDR Protein 2) oppure nei trasporti transmembrana (Hydro II) in *T. harzianum*. Tali geni sono stati identificati a partire da una collezione di ESTs (Expressed Sequence Tags o sequenze parziali di cDNA) sulla base della loro potenziale funzione biologica determinata per similarità a geni omologhi di origine microbica (Liu e Yang, 2005). E' stata analizzata anche l'espressione di un gene di *T. harzianum* caratterizzato da Vizcaino et al. (2006) e codificante per ThPTR2, una proteina transmembrana coinvolta nei processi di micoparassitismo. Il gene costitutivo della beta tubulina 1 di *T. harzianum* (Li e Yang, 2007) è stato utilizzato come controllo endogeno nelle reazioni di amplificazione da cDNA per escludere eventuali alterazioni che interessano la totale attività trascrizionale del fungo.

Le sequenze nucleotidiche a disposizione hanno permesso di individuare i domini funzionali caratteristici delle proteine corrispondenti, sulla cui base sono stati disegnati i primer utilizzati in questo studio.

3.10.1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO E REAZIONI DI AMPLIFICAZIONE

Il DNA genomico, estratto dal micelio fresco degli isolati di *T. harzianum* (Th908-wt, Th908-5 e Th908-81), è stato sottoposto a dosaggio spettrofotometrico e corsa elettroforetica su gel che hanno permesso di stabilirne purezza ed integrità (Fig. 3.24).

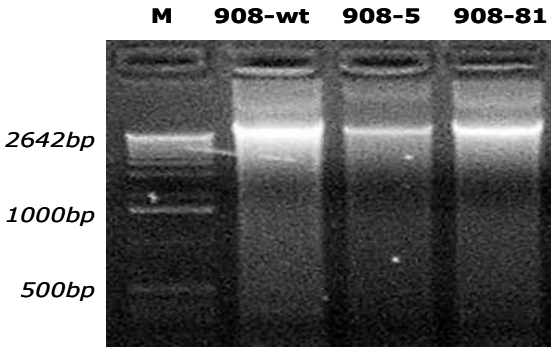


Fig. 3.24 Corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8% del DNA genomico di Th908 wt, mutante Th908-5 e mutante Th908-81. Corsia 1: marcatore di peso molecolare; corsia 2: Th908-wt; corsia 3: mutante Th908-5; corsia 4: mutante Th908-81.

La presenza nel genoma dei tre isolati fungini analizzati dei geni in esame è stata confermata dalle reazioni di amplificazione e dalle successive analisi elettroforetiche.

Gli ampliconi ottenuti, infatti, presentavano tutti la lunghezza attesa, determinata tramite confronto con il marcatore di peso molecolare. Inoltre, dopo estrazione dal gel, il sequenziamento ha permesso di accertare la loro corrispondenza con i geni considerati (Fig. 3.25).

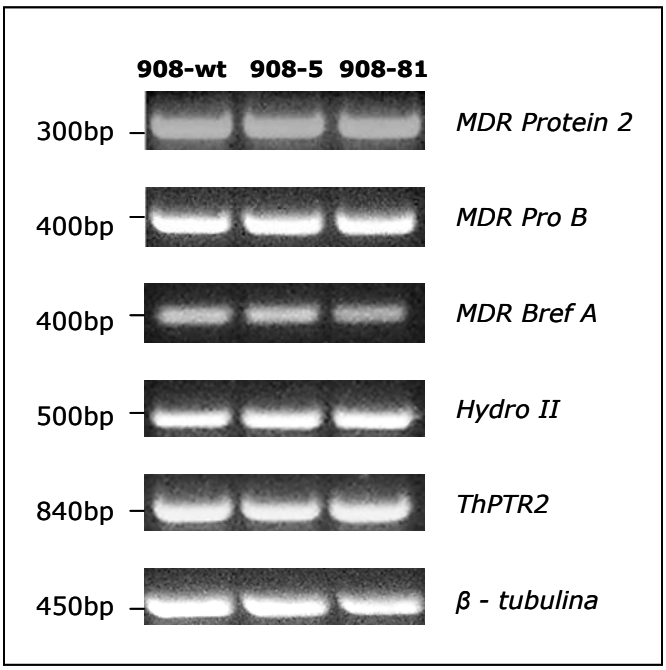


Fig. 3.25 Corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione relativi ai geni *MDR Protein 2*, *MDR ProB*, *MDR BrefA*, *Hydro II*, *ThPtr2*. Le amplificazioni sono state condotte a partire dal DNA genomico degli isolati Th908-wt, Th908-5 e Th908-81. I prodotti di amplificazione del gene della ß-tubulina 1 del ceppo selvatico (Th908-wt) e di entrambi i mutanti (Th908-5 e Th908-81) sono stati utilizzati come controllo endogeno nelle reazioni di amplificazione.

3.10.2 ESTRAZIONE DELL'RNA, RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR) E REAZIONI DI AMPLIFICAZIONI

L'espressione differenziale dei geni in esame è stata valutata attraverso l'analisi dei trascritti dei tre isolati, posti a crescere in tre diverse

condizioni colturali: su PDA (testimone), in presenza del 5% (vol/vol) di estratto di FoFT2 (+ FoFT2) ed in presenza di 120 µg/g di AF (+ AF).

Nella fase di prelievo del micelio da sottoporre all'estrazione dell'RNA totale, la germinazione dell'isolato Th908-wt è risultata totalmente inibita in presenza di AF, contrariamente a quel che succedeva nelle altre condizioni colturali. Per le altre tesi, invece, non sono state osservate differenze significative in termini di velocità di crescita e quantità di micelio.

L'RNA totale, estratto dal micelio dei campioni in esame, è stato sottoposto a dosaggio spettrofotometrico e ad analisi elettroforetica (Fig. 3.26).

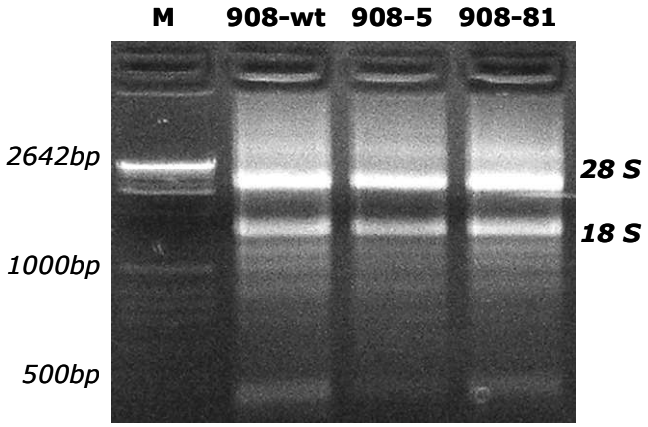


Fig. 3.26 Corsa elettroforetica su gel di agorosio allo 1,5% (condizioni non denaturanti) dell'RNA estratto dal micelio di Th908-wt, del mutante Th908-5 e del mutante Th908-81 prelevato da colture di 4 giorni su PDA .

In seguito, l'RNA è stato sottoposto a retrotrascrizione ed il cDNA ottenuto è stato utilizzato come stampo nelle reazioni di amplificazione dei geni codificanti le proteine MDR Protein 2, MDR BrefA, Hydro II, ThPTR2 e MDR ProB. L'osservazione della corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione ha permesso la valutazione qualitativa del profilo di espressione dei tre isolati fungini posti nelle diverse condizioni colturali (Fig. 3.27).

I geni codificanti le proteine MDR Protein 2, MDR BrefA e HydroII risultavano espressi nel ceppo Th908-wt e nei due mutanti in tutte le condizioni colturali testate, cioè sia in presenza che in assenza di estratto di FoFT2 e di AF, senza che riscontrassero differenze significative nei livelli di trascrizione. Un risultato completamente differente è stato ottenuto per il gene *ThPTR2* che non sembra essere espresso in alcuna delle condizioni sperimentali adottate.

In figura 3.28 è rappresentato il profilo di espressione del gene codificante per MDR ProB nelle condizioni analizzate. Il gene risulta espresso nei tre isolati fungini sia in assenza che in presenza di estratto di FoFT2. Nel ceppo wild type e nel mutante Th908-81 si è però osservato un ridotto livello di trascrizione del gene in presenza di FoFT2, contrariamente a quanto osservato per il mutante Th908-5.

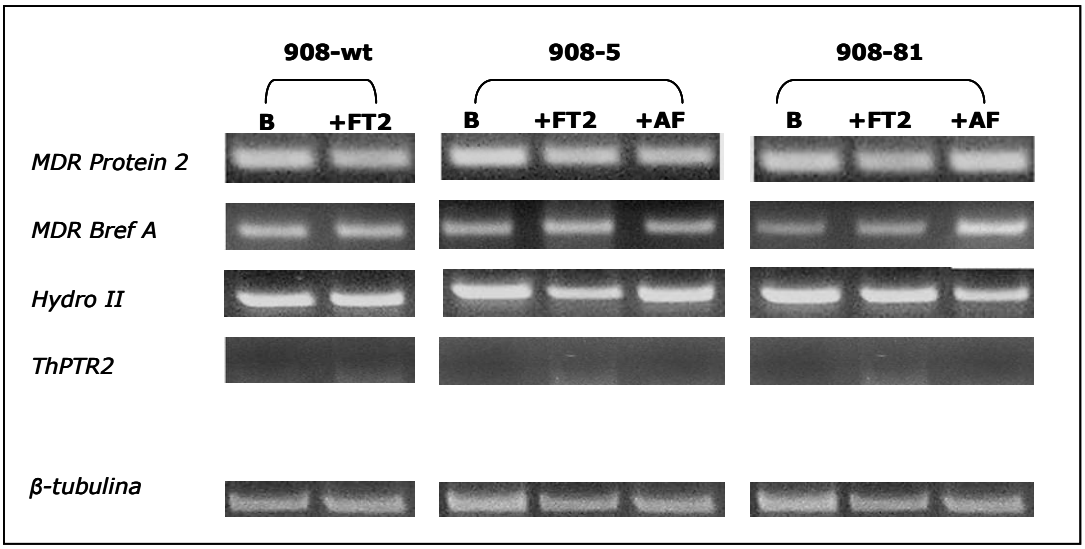


Fig. 3.27 Analisi di espressione tramite RT-PCR dei geni *MDR Protein 2*, *MDR Bref A*, *Hydro II* e *ThPTR2* e *ß-tubulina* (controllo) in Th908-wt, mutante Th908-5 e mutante Th908-81, cresciuti in presenza e in assenza di estratto di FoFT2 e di AF.

In presenza di AF il gene veniva espresso nel mutante Th908-81, anche se con un livello di espressione inferiore rispetto a quando AF era

assente dal mezzo di coltura. Al contrario, nel mutante Th908-5 la presenza di AF sembrava inibire l'espressione di *MDR ProB*. Nel ceppo selvatico (Th908-wt), non è stato possibile valutare l'espressione del gene, poichè la crescita dell'isolato è risultata completamente inibita dal metabolita antifungino nel substrato di crescita.

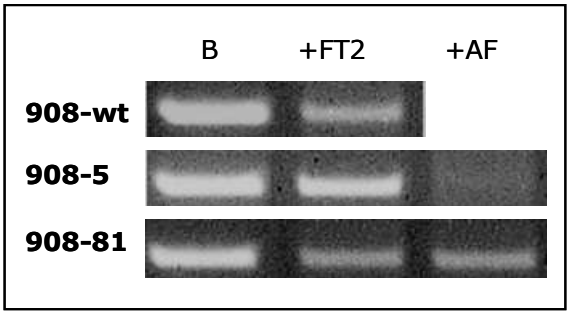


Fig. 3.28 Analisi di espressione tramite RT-PCR del gene *MDR ProB* in Th908-wt, mutante Th908-5 e mutante Th908-81, cresciuti in presenza e in assenza di estratto di FoFT2 e di AF.

Le analisi di ricerca di similarità in banca dati condotte sulle sequenze derivanti dal sequenziamento automatico dei prodotti di amplificazione hanno confermato la corrispondenza con i geni in esame, mostrando una percentuale di similarità pari al 100%.

4. DISCUSSIONE

L'impiego di funghi antagonisti è un utile mezzo di difesa delle colture da agenti fitopatogeni fungini. Le potenzialità di funghi del genere *Trichoderma* come agenti di biocontrollo sono note da tempo (Weindling, 1932). In particolare, diversi isolati della specie *T. harzianum* si sono rivelati efficaci nel contrastare l'azione di funghi fitopatogeni terricoli, come *P. ultimum*, *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia* spp. e *Fusarium* spp. (Harman et al., 2004).

F. oxysporum, nelle sue diverse forme speciali, è considerato il principale agente di malattie parenchimatiche e vascolari (tracheomicosi) su una vasta gamma di colture economicamente importanti (Matta, 1996; Leslie e Summerell, 2006). Una delle poche misure ritenute efficaci per il controllo di tali malattie è l'uso di varietà resistenti al fungo, se disponibili. Altri tipi di interventi, quali la sterilizzazione dei semi e la rotazione colturale, hanno un'efficacia limitata a causa dell'estrema diffusione e della persistenza del fungo nell'ambiente (Agrios, 1997). Negli ultimi anni sono stati ottenuti risultati incoraggianti con il controllo biologico attuato con microrganismi antagonisti, come isolati non patogeni di *F. oxysporum* (Agrios, 1997; Fravel et al., 2003). Il controllo biologico di *F. oxysporum* ff.ss. mediante isolati antagonistici di *T. harzianum* è stato oggetto di numerosi studi, dai quali è emersa un'efficacia variabile, ma in generale non esaltante, a seconda del ceppo antagonistico impiegato e delle condizioni sperimentali (Nel et al., 2006; Dubey et al., 2007). Ciò è probabilmente dovuto alla molteplicità e complessità dei meccanismi che governano l'interazione tra antagonista e patogeno (Whipps, 2001). Sivan e Chet (1989) hanno descritto il ruolo della competizione per nutrienti nell'attività di biocontrollo esercitata da *T. harzianum* nei confronti di *F. oxysporum*. Infatti nel terreno in condizioni nutritive limitanti, come basse concentrazioni di glucosio, di asparagina o di essudati radicali, la germinazione delle clamidiospore di *F. oxysporum* nella rizosfera di piante di melone, cotone e pomodoro è risultata completamente inibita a seguito del trattamento del seme o del

terreno con *T. harzianum*. Al contrario, in condizioni di adeguata disponibilità di risorse nutritive, l'inibizione della germinazione e il biocontrollo non si verificavano. Vaijna (2008) ha invece descritto l'abilità di *F. oxysporum* di micoparassitizzare diverse specie di *Trichoderma* attraverso avvolgimento, penetrazione, invasione e conseguente distruzione delle loro ife. Whipps (1987) ha descritto un fenomeno di mutua inibizione tra isolati di *T. harzianum* e di *F. oxysporum* in coltura duale, dovuto alla produzione di sostanze antimicrobiche da parte di entrambi gli isolati posti a confronto. Del resto, la capacità di entrambe le specie fungine di produrre metaboliti bioattivi è ampiamente documentata in letteratura (Verma et al., 2007; Leslie e Summerell, 2006). In *F. oxysporum* tali molecole, oltre ad essere implicate nei rapporti di competizione tra microrganismi, possono essere fattori di virulenza che rivestono un ruolo importante nella genesi e nell'evoluzione delle tracheofusariosi (Gauman, 1957; Davis, 1969; Bacon et al., 1996).

Obiettivo di questo lavoro di tesi è stato il miglioramento della tolleranza del fungo antagonista *T. harzianum* ITEM 908 (Th908), per il quale è in corso la registrazione europea come biopesticida, all'azione tossica di metaboliti di *F. oxysprorum*. Ciò al fine di migliorare le prestazioni antagonistiche del ceppo Th908 nei confronti di forme fitopatogene di *F. oxysporum* e allo stesso tempo rendere possibile un uso combinato del ceppo Th908 con ceppi non fitopatogeni di *F. oxysporum* impiegati come agenti di biocontrollo. Lo studio ha preso avvio da un'attenta considerazione delle relazioni intercorrenti in vitro e in vivo tra l'isolato Th908 e due isolati di *F. oxysporum*, di cui uno (Fo2797) fitopatogeno e l'altro (FoFT2) utilizzato come micoerbicida. Applicando il metodo della coltura duale, sono emerse scarse abilità competitive da parte di Th908 nei confronti di entrambi gli isolati di *F. oxysporum*. Si è infatti osservato un chiaro effetto di inibizione sullo sviluppo miceliare di Th908, causato sia dal ceppo fitopatogeno, sia dal ceppo micoerbicida, mentre gli isolati di *F. oxysporum* hanno subìto in misura inferiore l'azione inibitoria esercitata da Th908. Tali risultati sono in accordo con quanto descritto in precedenza da diversi autori che hanno segnalato una scarsa

capacità di contrasto di *F. oxysporum* da parte di isolati di *T. harzianum* (Whipps, 1987; Sivan e Chet, 1989). Il tipo di interazione tra gli isolati posti a confronto è risultato dipendente dal substrato di coltura. E' noto, infatti, che fattori quali temperatura, ph, potenziale idrico e composizione del substrato possono influenzare l'espressione di determinate capacità metaboliche e competitive da parte dei funghi (Whipps, 1987; Knudsen et al., 1997). Nel nostro caso, la presenza di una zona di mutua inibizione sui substrati AHA e MDP, indicava l'implicazione di sostanze con attività antifungina nell'interazione tra i due funghi (Papavizas e Lewis, 1983; Whipps, 1987; Knudsen et al., 1997). A una prima valutazione in vitro dell'efficacia antagonistica di Th908, è seguìta una verifica in vivo, condotta su germinelli di pomodoro. E' infatti noto che non sempre l'attività antagonistica che si osserva in coltura duale viene confermata in un sistema più complesso, che vede la presenza della pianta come terzo soggetto dell'interazione, e in condizioni non controllate (Knudsen et al., 1997). La patogenicità dell'isolato Fo2797 in assenza dell'antagonista si è manifestata appieno, dando luogo a estese necrosi e dissecamento completo delle piantine. Gli stessi sintomi sono stati descritti da Fravel et al. (2003) e Amusa (2006) e posti in relazione con la produzione in vivo di metaboliti tossici da parte di isolati *F. oxysporum*. Il trattamento con Th908 ha determinato la comparsa di limitate zone di imbrunimento a livello dell'ipocotile e della radichetta. Tale effetto, già altre volte descritto con riferimento ad isolati antagonistici di *Trichoderma*, si ritiene sia legato alla capacità di attivare una risposta di difesa nella pianta, caratterizzata dalla produzione e dall'accumulo di composti fenolici e fitoalessine, con il risultato di limitare successivi attacchi da parte di agenti fitopatogeni (Yedidia et al., 1999; Howell et al., 2000; Yedidia et al., 2003; Harman et al., 2004). Th908, quando co-inoculato con Fo2797, ha mostrato una limitata efficacia antagonistica, poiché è stato in grado di ridurre significativamente la malattia solo a livello della radichetta (riduzione del 18,5% dell'intensità media ponderata della malattia), mentre le lesioni a livello dell'ipocotile non sono state ridotte in modo significativo.

La mutua inibizione tra Th908 e Fo2797 o FoFT2 osservata in coltura duale ha indotto ad ipotizzare la produzione di metaboliti con attività antifungina da parte di *F. oxysporum* e un loro possibile ruolo nell'interazione competitiva tra *T. harzianum* e *F. oxysporum*. La produzione di sostanze antifungine potrebbe infatti conferire non pochi vantaggi ai funghi fitopatogeni, in termini di competitività nell'ambito delle biocenosi del terreno (Karlowsky, 2008). Pertanto, sono state avviate delle indagini volte a verificare la capacità di produrre sostanze biologicamente attive, inibitorie nei confronti di Th908, da parte degli isolati Fo2797 e FoFT2 e alla loro successiva identificazione.

Entrambi gli isolati di *F. oxysporum* in esame hanno prodotto metaboliti con attività antifungina in coltura liquida. Prevedibilmente, la composizione nutritiva del mezzo di crescita influiva notevolmente sulla capacità di biosintetizzare i metaboliti attivi da parte di Fo2797 e FoFT2 (Notz et al., 2002). In adeguate condizioni colturali, gli isolati di *F. oxysporum* erano in grado di produrre un'elevata attività antifungina dopo soli 7 giorni dall'inoculazione. L'attività antifungina è stata estratta esaustivamente dai brodi colturali con cloruro di metilene. Quando inglobati nel substrato di crescita, gli estratti organici di Fo2797 e FoFT2 sono risultati attivi nei confronti di Th908, inibendo la crescita delle colonie rispettivamente in misura del 100 e del 42%, già alla concentrazione del 2,5%. In letteratura è riportata la produzione di due metaboliti con attività antifungina da parte *F. oxysporum*, l'enniatina (EN) e la beauvericina (BEA) (Herrmann et al., 1996; Logrieco et al., 1998). Queste due sostanze, chimicamente e biologicamente molto simili, sono esadepsipeptidi ciclici dotata di attività antimicrobica ad ampio spettro. In particolare è stata dimostrata l'attività antifungina di EN nei confronti di alcuni funghi fitopatogeni tra cui *Eutypa armeniacae*, patogeno dell'albicocco (Bishop e Ilsley, 1978) e di BEA nei confronti di isolati aggressivi di *Cearocystis ulmi*, l'agente della grafiosi dell'olmo (Gemma et al., 1985). Nessuna di queste sostanze è stata tuttavia rilevata dall'analisi mediante cromatografia su strato sottile (TLC) negli estratti organici degli isolati in esame. L'analisi chimica degli estratti colturali è stata pertanto

estesa ad un altro metabolita bioattivo di *F. oxysporum*, l'acido fusarico (AF). L'AF è una fitotossina la cui implicazione nella patogenesi dell'avvizzimento di piante di pomodoro causato da *F. oxysporum* è da tempo nota (Gaumann, 1957; Davis, 1969). Nella piante, l'azione della tossina, dopo la penetrazione nella cellula, sembrerebbe avere come target i mitocondri, ove agisce inibendo la respirazione, riducendo la concentrazione di ATP e distruggendo l'integrità di membrana (Bacon et al., 2006). L'analisi TLC ha dimostrato la presenza di AF negli estratti organici di entrambi gli isolati di *F. oxysporum* esaminati. L'identificazione dell'AF è stata successivamente confermata dall'analisi condotta mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). L'analisi mediante HPLC ha altresì permesso di identificare un altro metabolita secondario ad azione fitotossica, l'acido 9,10-deidrofusarico (ADF). La simultanea produzione di AF e di ADF da parte degli isolati di *F. oxysporum* è stata più volte segnalata (Gaumann, 1957; Amalfitano et al., 2002; Abouzied et al., 2004). Tali molecole sono estremamente simili nella struttura e si ritiene che l'ADF derivi dalla sintesi incompleta dell'AF (Gaumann, 1957). L'analisi quantitativa mediante integrazione dei picchi cromatografici ha messo in luce come la produzione di AF da parte di Fo2797 e FoFT2 fosse pressoché equivalente, mentre i due ceppi differivano notevolmente per quanto riguarda la produzione di ADF. Infatti, la concentrazione di ADF nell'estratto del ceppo patogenico Fo2797 è risultata circa cinque volte superiore a quella dell'isolato micoerbicida FoFT2. Una maggiore produzione di ADF rispetto ad AF da parte di isolati altamente virulenti di *F. oxysporum* è stata osservata anche da Abouzeid et al. (2004).

Quando saggiato in forma pura, l'AF ha mostrato una forte attività inibitoria sulla crescita miceliare di *T. harzianum*. Infatti, AF ha determinato la totale inibizione di Th908 (effetto fungicida) alla concentrazione di 187 µg/g, mentre alla concentrazione di 93 µg/g, si è osservato un effetto fungistatico, con il rallentamento della crescita di Th908 in misura del 71% dopo 48 di esposizione. Un approfondimento sull'attività biologica dell'ADF nei confronti dell'isolato Th908, in analogia a quanto fatto con AF, sarebbe stato opportuno. Infatti, l'eventuale

attività antifungina di ADF potrebbe spiegare perché, a parità di concentrazione di AF negli estratti grezzi di Fo2797 e FoFT2, gli estratti del ceppo fitopatogeno risultano molto più attivi di quelli del micoerbicida. Alla luce della correlazione positiva tra virulenza degli isolati di *F. oxysporum* e la quantità di ADF da essi prodotti, di cui si è già detto (Amusa, 2006; Kern, 1970), si potrebbe ipotizzare una correlazione positiva anche con l'attività antifungina esercitata da *F. oxysporum* nei confronti di altri funghi del terreno. Tuttavia non è stato possibile purificare ADF in quantità sufficienti per condurre questo studio e tale composto, a differenza dell'AF, non è disponibile commercialmente.

L'attività antifungina di AF non è stata mai riportata, mentre è nota la capacità dell'AF di inibire la crescita ed il metabolismo di isolati batterici, soprattutto agenti di biocontrollo (Landa et al., 2002; Notz et al., 2002; Bacon et al., 2006). E' stato dimostrato che la produzione di AF da parte di isolati di *F. oxysporum* altera l'attività di biocontrollo di *Pseudomonas fluorescens* attraverso l'inibizione dell'espressione del gene coinvolto nella produzione del metabolita antimicrobico 2,4-diacetilfluoroglucinolo (DAPG), rendendo questo batterio inefficace (Schnider-Keel et al. 2000; Notz et al. 2002). Altri studi hanno, poi, attestato la sensibilità verso l'AF non solo di batteri agenti di biocontrollo come *Paenibacillus macerans* e specie di *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. atrophaceus*, *B. licheniformis*, *B. vallismortis*, *B. mojavensis*) ma anche di altre specie batteriche come *Ruminococcus albus* e *Methanobrevibacter ruminantium* (May et al., 2000).

Avendo dimostrato la produzione da parte di *F. oxysporum* di metaboliti in grado di inibire la crescita di *T. harzianum*, e poiché di alcuni di questi metaboliti (AF e ADF) è nota la produzione in vivo (Davis, 1969; Bacon et al., 1996; Bacon et al, 2006), si è ipotizzato che essi possano avere la funzione di assicurare a *F. oxysporum* un vantaggio competitivo nell'interazione con *T. harzianum* nella rizosfera. Se così fosse, una maggiore resistenza dei ceppi di *T. harzianum* all'azione dei metaboliti conferirebbe loro anche una maggiore competitività nei confronti di *F. oxysporum* e una maggiore efficacia antagonistica. Alla luce di tali

considerazioni, la successiva fase di questo lavoro di tesi è consistita nella messa a punto di una strategia di miglioramento genetico del ceppo Th908 basata sull'ottenimento e la selezione di nuovi biotipi varianti, con elevata resistenza alle sostanze antifungine prodotte da *F. oxysporum*. Finora il miglioramento della tolleranza di isolati di *T. harzianum* nei confronti di metaboliti secondari bioattivi prodotti da altri microrganismi che occupano la stessa nicchia ecologica non era mai stato studiato come possibile mezzo di "strain improvement" nell'ambito delle associazioni competitive nel terreno.

La manipolazione genetica dei microrganismi allo scopo di migliorare determinate caratteristiche metaboliche o fisiologiche è una metodologia che trova larga applicazione in diversi settori biotecnologici, tra cui la produzione di antibiotici e di enzimi e alcuni processi fermentativi industriali. Questo approccio metodologico è stato sperimentato anche sui BCA, allo scopo di migliorare l'efficacia del biocontrollo o altri tratti genetici desiderabili, come la competenza per la rizosfera o la tolleranza ad alcuni fungicidi (Stasz, 1990; Sumeet e Mukerjii, 2000; Spadaro e Gullino, 2005). Dall'analisi della letteratura sulla manipolazione genetica di *T. harzianum* e altre specie antagonistiche di *Trichoderma*, emerge il prevalente impiego di tecniche di mutagenesi rispetto a più avanzate tecniche di ingegneria genetica basate sulla tecnologia del DNA ricombinante, come la trasformazione genica. Infatti, sebbene le tecnologie del DNA ricombinante potrebbero aprire enormi possibilità di miglioramento dell'efficacia dei ceppi antagonistici, la loro applicazione richiede un elevato grado di conoscenza delle basi genetiche delle funzioni da esprimere o sovra esprimere (Parekh et al., 2000). La non disponibilità di un intero genoma sequenziato ed annotato per *T. harzianum* o altre specie di *Trichoderma*, il numero limitato di geni di biocontrollo noti e clonati e le ridotte conoscenze relative ai meccanismi molecolari implicati nell'interazione con altri microrganismi e con la pianta, limitano l'applicazione di tali metodiche nello "strain improvement" di isolati antagonistici di *Trichoderma* spp. Inoltre, nella scelta di una strategia di miglioramento di un BCA vi sono importanti

aspetti normativi che vanno tenuti in debita considerazione. Come è noto, nell'Unione Europea è vietata l'immissione in natura di microrganismi geneticamente manipolati (MOGM). Pertanto, eventuali ceppi antagonistici migliorati, ottenuti mediante tecniche di manipolazione genetica, non potrebbero essere né registrati come biopesticidi né tantomeno utilizzati nei Paesi facenti parte dell'Unione Europea. Questa restrizione non comprende, tuttavia, ceppi migliorati ottenuti mediante mutagenesi UV che, ai sensi della Direttiva 2001/18/CE recepita in Italia dal Decreto Legislativo 224/2003, non sono considerati MOGM.

In *Trichoderma* spp. la mutagenesi mediante agenti chimici oppure radiazioni ultraviolette è stata utilizzata con successo per migliorare le prestazioni antagonistiche e la tolleranza di alcuni isolati ai pesticidi benomyl, carbendazim, tebuconazole, prochloraz e bromuconazole (Papavizas, 1987; Figueras-Roca et al., 1996; Jayaraj e Radhakrishnan, 2003; Hatvani et al., 2006). La resistenza al benomyl acquisita da alcuni mutanti di *T. harzianum* è risultata anche associata ad una migliorata competenza per la rizosfera (Ahamad e Baker, 1988). Inoltre, la mutagenesi mediante irraggiamento con UV è stata utilizzata per la creazione di mutanti di *T. harzianum* con la capacità di sovraprodurre metaboliti extracellulari come antibiotici ed enzimi degradativi della parete cellulare che intervengono nelle interazioni antagonista-patogeno (Graeme-Cook e Faull, 1991; Szekeres et al., 2004). Per gli stessi scopi, è stata anche utilizzata la mutagenesi chimica mediante nitrosoguanidina (Rey et al., 2001; Zaldívar et al., 2001). Un'altra caratteristica per cui sono stati ottenuti biotipi migliorati di *T. harzianum* è la resistenza a stress ambientali, come basse temperature e ph estramamente acido (Besoain et al., 2007); questi stessi autori, associando mutagenesi UV e fusione di protoplasti, hanno ottenuto biotipi più efficaci del ceppo selvatico nell'inibire l'azione di *Pyrenochaeta lycopersici* Schneider & Gerlach su piante di pomodoro.

Nel presente lavoro di dottorato sono stati ottenuti mediante mutagenesi con UV-C dei biotipi di Th908 dotati di migliorata tolleranza all'azione tossica di metaboliti antifungini prodotti da *F. oxysporum*.

Attraverso un processo di selezione condotto su oltre 300 mutanti UV, si è arrivati a selezionare due mutanti (Th908-5 e Th908-81), che sono risultati capaci di crescere in presenza di concentrazioni degli estratti organici di FoFT2 e Fo2797 (5% e 2,5% rispettivamente) che inibivano completamente la crescita del ceppo selvatico (Th908-wt). La maggiore resistenza dei due mutanti ai metaboliti con attività antifungina prodotti da *F. oxysporum* è risultata evidente anche quando esposti all'azione dell'AF. Infatti, le colonie di Th908-5 e Th908-81, sebbene rallentate nella crescita (rispettivamente del 31,5% e del 21,3%), sono state in grado di svilupparsi su un substrato contenente un'elevata concentrazione (120 µg/g) di AF, sul quale Th908-wt non riusciva a crescere. La mutazione dei mutanti selezionati è risultata stabile nel tempo, come evidenziato da 4 successive subculture su PDA, seguite da un trasferimento su PDA contenente gli estratti organici dei due isolati di *F. oxysporum* o AF.

I due mutanti selezionati, oltre a mostrare una maggiore tolleranza ai metaboliti antifungini di *F. oxysporum*, hanno manifestato anche una maggiore competitività nei confronti degli isolati di *F. oxysporum* in coltura duale. In particolare, ciò è risultato evidente su AHA, ovvero il substrato su cui era stata dimostrata in precedenza la produzione di metaboliti secondari bioattivi di *F. oxysporum*, tra cui l'AF. Su questo substrato il mutante Th908-5 ha subito per effetto di FoFT2 un'inibizione inferiore di circa il 70% rispetto a quella subita dal ceppo selvatico (Th908-wt). Da questo saggio è inoltre emerso che i due mutanti differiscono per quanto riguarda le necessità metaboliche. Si può ipotizzare che la mutagenesi UV abbia determinato una forma di auxotrofia nel mutante Th908-81. Questo mutante non è infatti stato in grado di crescere su AHA (un substrato a composizione definita a base di glucosio e sali minerali) fino a quando FoFT2 non ha raggiunto con le sue ife il dischetto micelico del mutante, fornendogli sostanze di crescita essenziali. Sugli altri due substrati utilizzati (PDA e MDP), entrambi a composizione complessa e contenenti estratti naturali, questo fenomeno non si verificava. Un'ulteriore prova di ciò è data dal fatto che aggiungendo al substrato AH un 20% (vol/vol) di succo vegetale (V8), la

crescita del mutante Th908-81 avveniva in modo del tutto regolare (dati non presentati). Che mutanti con determinate esigenze nutrizionali possano crescere solo in risposta al rilascio di vitamine o altre sostanze da parte di organismi prototrofi è stato precedentemente riportato da Strauss (1958) e da Cassiolato e Soares de Melo (1999). Lo stesso fenomeno non si è invece verificato nella combinazione con l'isolato fitopatogeno, probabilmente perché Fo2797 è in grado di produrre e diffondere nel mezzo di coltura i fattori di crescita richiesti dal mutante.

I due mutanti sono stati successivamente sottoposti ad indagini eco-fisiologiche allo scopo di escludere eventuali alterazioni peggiorative di importanti caratteristiche quali la competenza per la rizosfera e la capacità di diffusione nel terreno per effetto della mutazione. Infatti, come mostrato da Hatvani et al. (2006), l'uso della mutagenesi mediante UV potrebbe comportare la perdita di importanti funzioni biologiche nei nuovi biotipi, e pertanto limitare il loro impiego come BCA. Secondo numerosi autori la capacità di un BCA di colonizzare la rizosfera in via di sviluppo dell'ospite vegetale, meglio definita come competenza per la rizosfera, è una caratteristica importantissima ai fini dell'efficace controllo biologico di agenti fitopatogeni radicali (Schmidt, 1979; Sivan e Chet, 1989; Sivan e Harman, 1991; McLean et al., 2005; Hatvani et al., 2006). La proliferazione lungo le radici da parte dell'antagonista, oltre ad indurre effetti benefici nella pianta stessa, come il miglioramento della crescita e lo sviluppo dell'apparato radicale, è fondamentale per prevenire molte infezioni e malattie radicali (Sivan e Harman, 1991; Howell, 2003). La competenza per la rizosfera è strettamente collegata, e fortemente soggetta, a influenze ambientali come la disponibilità di nutrienti e la competizione con altri microrganismi della rizosfera (Cook e Baker, 1983; Harman, 1992). L'utilizzo da parte dell'antagonista di fonti di energia e di azoto provenienti dagli essudati radicali o dalle cellule che si distaccano dalle parti senescenti delle radici, sembrerebbe essere un fattore chiave in questo fenomeno (Sivan A., Chet I. 1989). Le porzioni di radici vicino agli apici rappresentano la principale fonte di tali nutrienti e i microrganismi capaci di raggiungere, colonizzare e stabilirsi su queste

parti di radice, risulterebbero anche i più efficenti nell'esplicare la propria attività di biocontrollo (Sivan e Harman, 1991). Non tutti gli isolati di *T. harzianum* possiedono competenza per la rizosfera (Papavizas et al., 1982) e in passato si è ricorso alla mutagenesi mediante UV o alla fusione di protoplasti allo scopo di ottenere isolati antagonistici dotati di questa caratteristica (Ahamad e Baker, 1987; Ahamad e Baker, 1988; Sivan e Harman, 1991; Melo et al., 1997). Nel presente studio, l'isolato Th908-wt ha mostrato la capacità di colonizzare in tutta la sua interezza l'apparato radicale di piantine di pomodoro. La medesima abilità è stata riscontrata anche nei due mutanti, Th908-5 e Th908-81, senza che si osservassero significative variazioni nella velocità di crescita e nella densità di popolazione dei mutanti rispetto al ceppo selvatico. Ciò permette di escludere che il trattamento con UV-C abbia apportato alterazioni peggiorative di tipo fisiologico nei nuovi biotipi. La distribuzione del ceppo selvatico e dei due mutanti lungo la radice ha seguìto lo stesso andamento descritto in precedenza per altri isolati di *T. harzianum* definiti competenti per la rizosfera (Ahamad e Baker, 1987; Ahamad e Baker, 1988; Sivan e Harman, 1991; Melo et al., 1997). Le curve di densità di popolazione a forma di "C", indice di una maggiore colonizzazione delle parti prossimale e distale della radice rispetto alla porzione centrale, ne sono la riprova. Inoltre, gli isolati in esame sono risultati in grado di diffondersi nel terreno intorno alle radichette, colonizzando anche il terreno non direttamente a contatto con il rizoplano.

Il mutante Th908-5, oltre ad essere resistente nei confronti dei metaboliti antifungini di *F. oxysporum*, si è dimostrato anche un efficace agente di biocontrollo. Quando saggiato su piante di pomodoro in condizioni di elevata densità d'inoculo dell'agente fitopatogeno Fo2797, Th908-5 ha mostrato la capacità di ridurre significativamente (del 40%) la mortalità delle piantine. L'isolato micoerbicida FoFT2 ha mostrato una certa fitopatogenicità, sebbene moderata. Anche in questo caso il mutante Th908-5 ha ridotto significativamente (del 25%) l'incidenza della malattia. Il ceppo selvatico Th908-wt non è risultato privo di effetti avversi a carico

delle piantine trattate. La possibilità che ceppi antagonistici di *Trichoderma* spp. in talune circostanze, quali ad esempio condizioni altamente restrittive oppure artificiali, possano avere dei deboli effetti fitopatogeni è stata più volte riportata (Bailey e Lumsden, 1998; Naseby et al., 2000). Va a questo riguardo sottolineato che il mutante Th908-5, a differenza del ceppo selvatico, non ha mostrato alcun effetto negativo sulla sopravvivenza delle piantine trattate.

Questi risultati rappresentano un importante presupposto per la candidatura del mutante Th908-5 quale BCA da impiegare da solo oppure in associazione con isolati di *F. oxysporum* agenti di biocontrollo, al fine di aumentare l'efficacia e lo spettro di attività del consorzio microbico. Per esempio, oltre al possibile impiego combinato di Th908-5 e FoFT2 su pomodoro e altre colture ortive per la lotta biologica contro malattie radicali e piante parassite del genere *Orobanche*, potrebbe ipotizzarsi la combinazione di Th908-5 con il ceppo *F. oxysporum* Fo47 (un noto agente di biocontrollo di diverse forme fitopatogene della sua stessa specie (Lemanceau et al., 1993)), o altri isolati antagonistici di *F. oxysporum* (Minuto et al., 1997; Larkin e Fravel, 1998; Fravel et al., 2003). L'altro mutante selezionato (Th908-81) non è risultato ugualmente efficace. Sebbene sia risultato anch'esso compatibile con FoFT2, al contrario di Th908-wt, Th908-81 non ha mostrato la capacità di contrastare efficacemente l'azione dell'isolato fitopatogeno Fo2797. La scarsa efficacia antagonistica del mutante Th908-81 è probabilmente legata all'auxotrofia di questo ceppo, che è difettivo per funzioni metaboliche presumibilmente legate alla biosintesi di fattori di crescita. Tuttavia, il mutante Th908-81 potrebbe essere un utile strumento di indagine per future ricerche di base sulla fisiologia di *T. harzianum*. Infatti, attraverso lo studio delle mutazioni nella sequenza genomica o dell'espressione genica di questo mutante si potrebbero acquisire importanti conoscenze relative ai geni codificanti per enzimi coinvolti nelle vie metaboliche di *T. harzianum*.

Recenti studi hanno dimostrato la capacità di alcuni funghi di tollerare alte concentrazioni di tossine e composti xenobiotici, tra cui gli antibiotici prodotti da altri microrganismi, composti antimicrobici di

origine vegetale e fungicidi di sintesi (Hayashi et al., 2001; Pane et al., 2008; Stefanato et al., 2009; Ruocco et al., 2009). Tale capacità è risultata strettamente collegata alla presenza di meccanismi in grado di detossificare le cellule e pertanto bloccare l'azione di tali molecole (De Waard, 1997). La base molecolare di tali meccanismi di resistenza è stata parzialmente elucidata con la identificazione di alcune proteine transmembrana in grado di detossificare il citoplasma delle cellule attraverso un trasporto attivo delle molecole tossiche (Del Sorbo et al., 2000). I trasportatori di membrana implicati in tale fenomeno sembrerebbero appartenere principalmente a due famiglie proteiche, la famiglia dei trasportatori ABC (ATP binding cassette) e la superfamiglia MFS (Major Facilitator Superfamily), detta anche famiglia uniporto-simporto-antiporto (Del Sorbo et al., 2000). Per gli ABC si parla di un trasporto attivo primario dei composti attraverso l'idrolisi di ATP, mentre per gli MFS di un trasporto secondo gradiente di concentrazione. Non possedendo alta specificità di substrato ed essendo in grado di trasportare sostanze chimiche diverse, a tali permeasi di membrana è stato attibuito il ruolo di fattori di polichemioresistenza (Multi Drug Resistance, MDR) (Pane et al., 2008). Ad esempio, il trasportatore BcatrB è risultato attivo non solo nel proteggere *B. cinerea* dall'azione di fungicidi di sintesi (Vermeulen et al., 2001) e dalle fitoalessine prodotte dalla vite come reazione di difesa all'invasione fungina (Schoonbeek et al., 2001), ma anche dagli antibiotici sintetizzati da *Pseudomonas* nel corso dell'interazione antagonista-patogeno (Schoonbeek et al., 2002). Alcuni geni codificanti per proteine coinvolte nel meccanismo MDR sono noti, ma la loro identificazione e la successiva caratterizzazione sono state conseguite quasi esclusivamente in specie patogene fungine come *Aspergillus* spp. (Andrade et al.,2000), *Penicillium digitatum* (Nakaune et al., 2002), *Magnaporthe grisea* (Urban et al., 1999), *Mycosphaerella graminicola* (Stergiopulos et al., 2003); *Giberella pulicaris* (Fleissner et al., 2002); *Botrytis cinerea* (Vermeulen et al., 2001; Del Sorbo, 2008) e *Monilinia fructicola* (Schnabel et al., 2003). Molto poco, invece, si conosce circa il meccanismo di MDR in isolati fungini agenti di biocontrollo, tra cui

Trichoderma, e l'eventuale implicazione di geni dalla MDR nella resistenza di questi funghi a sostanze tossiche (Ruocco et al., 2009).

Alla luce di queste considerazioni e potendo disporre di mutanti di *T. harzianum* resistenti ai metaboliti di *F. oxysporum* con attività antifungina, come ultima parte di questo lavoro di ricerca è stato condotto uno studio molecolare preliminare volto ad indagare la presenza e l'espressione di geni potenzialmente implicati nella MDR in *T. harzianum*. Non essendo disponibili dati in letteratura sull'argomento, sono state prese in esame alcune sequenze EST (Expressed Sequence Tags o sequenze parziali di cDNA) identificate in *T. harzianum* (Liu e Jang, 2005), che sulla base della loro similarità a geni noti di altre specie microbiche, potrebbero corrispondere a geni putativamente codificanti proteine coinvolte nella resistenza agli antibiotici (MDR ProB, MDR BrefA e MDR Protein 2) oppure nei trasporti transmembrana (Hydro II). Le sequenze EST, derivanti dal sequenziamento di librerie di cDNA ottenuto dalla retro trascrizione dell'RNA messaggero, corrispondono a brevi frammenti di geni espressi e sono quindi più corte dei trascritti completi. Nonostante l'incompletezza e la ridotta accuratezza delle sequenze EST, dovuta al sequenziamento automatico in una sola direzione, esse vengono normalmente utilizzate come sonde per l'identificazione dei corrispondenti geni interi. Inoltre, è stato preso in considerazione anche il gene *ThPTR2*, recentemente caratterizzato in *T. harzianum* e codificante per una proteina transmembrana, la cui attività è risultata essere associata ai processi di micoparassitismo (Vizcaino et al., 2006). Il profilo di trascrizione di questi geni è stato valutato nei tre isolati di *T. harzianum* presi in esame in questo lavoro (Th908-wt, Th908-5 e Th908-81) in presenza dell'estratto organico di FoFT2 e AF. A differenza degli altri geni che sono risultati espressi sia in presenza che in assenza dei metaboliti bioattivi, e del gene *ThPTR2*, non trascritto in alcuna delle condizioni sperimentali adottate, il gene *MDR ProB* ha presentato un differente profilo di espressione nei tre ceppi. Infatti, mentre in presenza dell'estratto organico di FoFT2 il gene sembra essere trascritto sia nel ceppo selvatico che in entrambi i mutanti, in presenza di AF, che inibisce

completamente la crescita di Th908-wt, il gene è risultato espresso nel mutante ITEM 908-81, ma non nel mutante ITEM 908-5.

I risultati ottenuti da queste analisi preliminari permettono di avanzare alcune ipotesi, come ad esempio che l'AF possa inibire la trascrizione del gene *MDR ProB* nell'isolato Th908-5. Ai fini di una conferma della correlazione dell'espressione del gene in questione con l'azione tossica di AF, sarebbe utile valutare i livelli di espressione genica in presenza di differenti concentrazioni del metabolita. La presenza del trascritto del gene *MDR ProB* nel mutante Th908-81 suggerisce invece l'altra interessante ipotesi che il gene possa essere coinvolto nel meccanismo di resistenza in questo isolato nei confronti dell'AF. E' questa una ipotesi che certamente necessita di ulteriori indagini per poter essere avvalorata. In particolare la caratterizzazione del gene e la produzione di mutanti difettivi per esso potrebbero essere interessanti sviluppi di questa ricerca, che potrebbero aiutare a comprendere meglio la funzione e l'eventuale ruolo svolto dal gene *MDR ProB* nei meccanismi di resistenza di *T. harzianum* a metaboliti tossici.

5. CONCLUSIONI

Jackson R. M. in un suo lavoro del 1965 si è così espresso: "l'antibiosi, in una forma o in un'altra, riveste un ruolo cruciale nell'ecologia microbica". Oggi, alla luce di tutte le più recenti ricerche tale affermazione appare incontrovertibile. In particolare, per quel che concerne le interazioni fungine è sempre più evidente che sostanze antibiotiche possono essere prodotte anche da molti funghi fitopatogeni, allo scopo di acquisire un vantaggio competitivo nell'ambito delle biocenosi del terreno (Karlowsky, 2008).

Nel presente lavoro di tesi è stato dimostrato il ruolo rivestito dalla produzione di metaboliti bioattivi da parte di *F. oxysporum* nell'interazione con *T. harzianum*. Entrambi gli isolati di *F. oxysporum* utilizzati in questo lavoro, un isolato fitopatogeno e un micoerbicida, sono risultati possedere la capacità di produrre metaboliti con attività antifungina in grado di inibire la crescita di un isolato antagonista di *T. harzianum*. Uno di questi metaboliti è risultato essere l'acido fusarico (AF), di cui è ben nota l'attività fitotossica ma la cui attività antifungina non era mai stata segnalata prima d'ora. Le malattie causate da *F oxysporum* (tracheomicosi e marciumi radicali parenchimatici) sono di difficile controllo con i convenzionali mezzi di lotta chimica e agronomica. Essendo ampiamente documentata la produzione in vivo di AF e il suo ruolo di fattore di virulenza nelle malattie causate da *F. oxysporum*, l'impiego di isolati antagonistici capaci di resistere all'azione antifungina dell'AF e di altri metaboliti di *F. oxysporum* potrebbe consentire un più efficace contrasto di queste fitopatie.

La mutagenesi mediante irraggiamento con UV-C si è dimostrata un utile mezzo di "strain improvement" allo scopo di ottenere nuovi biotipi con migliorate caratteristiche fisiologiche e prestazioni antagonistiche. La sua applicazione ha, infatti, permesso di selezionare un mutante (Th908-5) del ceppo antagonista di *T. harzianum*, il quale ha mostrato non solo una maggiore resistenza nei confronti dei metaboliti tossici di *F. oxysporum* ma anche una notevole efficacia in termini di biocontrollo.

Nell'Unione Europea è vietata l'immissione in natura di microrganismi geneticamente manipolati (MOGM). Questa restrizione non comprende, tuttavia, ceppi migliorati ottenuti mediante mutagenesi UV, che non sono considerati MOGM (Direttiva 2001/18/CE, Decreto Legislativo 224/2003). Il ceppo Th908-5 è quindi un interessante candidato per lo sviluppo di biofungicidi da utilizzarsi contro *F. oxysporum* ff. sp. e allo stesso tempo compatibile con ceppi di *F. oxysporum* impiegati come BCA. La combinazione di due o più BCA con diversa modalità d'azione potrebbe essere una soluzione per aumentare il livello di controllo ottenibile con mezzi biologici, rendendo nel contempo la lotta biologica di più semplice attuazione.

6. ABBREVIAZIONI UTILIZZATE

ABC= trasportatori ABC (ATP Binding Cassette)

ADF= acido 9,10-deidrofusarico (9,10-Dehydrofusaric acid)

AF= acido fusarico (Fusaric Acid)

BCA= agente di biocontrollo (Biological Control Agent)

BEA= beauvericina (Beauvericin)

CWDE= enzimi degradativi della parete celleulare (Cell Wall Degradative Enzyme)

EN= enniatina (Enniatin)

FO2797= *F. oxysporum* ITEM 2797

FOFT2= *F. oxysporum* FT2

HR= risposta ipersensibile (Hypersensitivity Response)

ISR= resistenza sistemica indotta (Induced Systemic Resistance)

MDR= polichemioresistenza (Multi Drug Resistance)

PR PROTEINS= proteine legate alla patogenesi (Pathogenesis Related proteins)

ROS= specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species)

SAR= resistenza sistemica acquisita (Systemic Acquired Resistance)

TH908= *T. harzianum* ITEM 908

7. BIBLIOGRAFIA

Abbas H. K., Mirocha C. J., Gunther R. 1989. Mycotoxins produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from agricultural and non agricultural Arctic areas of Norway. Mycopathologia. 105: 143-152.

Abbas H. K., Mirocha C. J., Kommendahal T, Vesonder R. F., Golinski P. 1989. Production of trichothecene and non-trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species isolated from maize in Minnesota. Mycopathologia. 108: 55-58.

Abbas H. K., Mirocha C. J., Vesonder R. E., Gunther R. 1990. Acute toxic effects of an isolate of moniliformin-producing *Fusarium oxysporum* and purified moniliformin on rats. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 19(3): 433-436.

Abbas H. K., Boyette C. D., Hoagland R. E., Vesonder R. F. 1991. Bioherbicidal potential of *Fusarium moniliforme* and its phytotoxin, fumonisin. Weed Science. 39: 673-677.

Abouzeid M. A., Boari A., Zonno M. C., Vurro M., Evidente A. 2004. Toxicity profiles of potential biocontrol agents of *Orobanche ramosa*. Weed Science. 52: 326-332.

Adams P. M., Hanson R. 1972. Sesquiterpenoid metabolites of *Trichoderma polysporum* and *T. sporulosum*. Phytochemestry. 11: 423.

Agrios G. N. 1988. Plant Pathology, 3rd ed. Academic Press Inc., New York, US. 1-803.

Agrios G. N. 1997. Plant Pathology, 4th ed. Academic Press Inc., New York, US. 1-635.

Ahmad J. S., Baker R. 1987. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology. 77(2): 182-189.

Ahmad J. S., Baker R. 1988. Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum.* Canadian Journal of Microbiology. 34(3): 229-234.

Altomare C., Norvell W. A., Björkman T., Harman G. E. 1999. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Applied and Environmental Microbiology. 65 (7): 2926-2933.

Amalfitano C., Pengue R., Andolfi A., Vurro M., Zonno M. C., Evidente A. 2002. HPLC analysis of fusaric acid, 9,10-dehydrofusaric acid and their

methyl esters, toxic metabolites from weed pathogenic *Fusarium* species. Phytochemical Analysis. 13(5): 277–282.

Amusa N. A. 2006. Microbially produced phytotoxins and plant disease management. African Journal of Biotechnology. 5(5): 405-414.

Andrade A. C., Del Sorbo G., Van Nistelrooy J. C. M., De Waard M. A. 2000. The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates the resistance to all major classes of fungicides and soma natural toxic compounds. Microbiology. 146: 1987-1997.

Armstrong G. M., Armstrong J. K. 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. **In:** Nelson P. E., Toussoun T. A., Cook R. J. (ed.). *Fusarium* disease, biology and taxonomy. State University Press, University Park, PA, USA. 391-399.

Bacon C. W., Porter J. K., Norred W. P., Leslie J. F. 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. Applied and Environmental Microbiology. 62(11): 4039-4043.

Bacon C. W., Hinton D. M., Hinton J. 2006. Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. Journal of Applied Microbiology. 100: 185-194.

Bailey B. A., Lumsden R. D. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. **In:** Harman G. E., Kubicek C. P. (ed.) *Trichoderma* and *Gliocladium* vol. 2. Taylor&Francis Ltd, London, UK. 185-204.

Baker K. F., Cook R. J. 1974. Biological Control of Plant pathogens. Freeman & Co Publishing, San Francisco, USA. 1-433.

Balech B. 2008. An integrated molecular and morphological study to design a barcode discrimination protocol for *Fusarium* species involved in dry root rot disease of *Citrus*. Tesi di Master of Science in Integrated pest management of Mediterranean fruit tree crops. Istituto Agronomico Mediterraneo, Bari, IT.

Balmas V., Santori A., Corazza L. 2000. Le specie di *Fusarium* più comuni in Italia. Suggerimenti per il loro riconoscimento. Petria. 10(1): 1-60.

Baltz R. H. 1986. Mutagenesis in *Streptomyces* spp. **In:** Demain A. L., Solomon N. A. (ed.). Manual of industrial microbiology and biotechnology. The American Society for Microbiology, Washington, US. 184-190.

Berg G. 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agricolture. Applied Microbiology and Biotechnology. 84(1): 11-18.

Bell A. A., Wheeler M. H., Liu J., Stipanovic R. D., Puckhaber L. S., Orta H. 2003. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*: Potential targets for disease control. Pest Management Science. 59: 736-747.

Benhamou N., Garand C., Goulet A. 2002. Ability of non pathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Phytium ultimum* in cucumber. Applied and Environmental Microbiology. 68: 4044-4060.

Benitez T., Rincon A. M., Limon M. C., Codon A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7(4): 249-260.

Bergendorff O., Anke H., Dekeermendjian K., Nielsen M., Rudong S., Sterner O., Witt R. 1994. The affinity of cyclodepsipeptides to the brain chloride channel domain of the gabaA receptor in vitro. The Journal of Antibiotics. 47: 1560–1561.

Besoain X. A., Perez L. M, Araya A., Lefever L., Sanguinetti M., Montealegre J. R. 2007. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici*. Electronic Journal of Biotechnology. 10(4): 604-617.

Biles C. L., Martyn R. D. 1989. Local and systemic resistance induced in watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology. 79: 856–860.

Bishop G. C., Ilsley A. H. 1978. Production of enniatin as a criterion for confirming the identity of *Fusarium lateritium* isolates. Australian Journal of Biological Sciences. 31: 93-96.

Bissett J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma.* I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Canadian Journal of Botany. 62(5): 924–931.

Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma.* II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany. 69: 2357-2372.

Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Sect. Pachybasium. Canadian Journal of Botany. 69: 2373-2417.

Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany. 69: 2418-2420.

Bissett J. 1992. *Trichoderma atroviride*. IV. Canadian Journal of Botany. 70: 639-641.

Blok W. J., Zwankhuizen M. J., Bollen G. J. 1997. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. asparagi by applying non pathogenic isolates of *F. oxysporum*. Biocontrol Science and Technology. 7: 527-541.

Boari A., Vurro M. 2004. Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa)*. Biological Control. 30: 212-219.

Booth C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 1-237.

Boyette C. D., Abbas H. D., Connick W. J. 1993. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as a Potetial Bioherbicide for Sicklepod (*Cassia obtusifolia* L.), Coffee senna (*Cassia occidentalis)* and *Hemp sesbania* (*Sesbania exaltata*). Weed Science. 41: 678-681.

Bramel-Cox P. J., Stein I. S., Rodgers D. M., Claflin L. E. 1988. Inheritance of resistance to *Macrophomina phaseolina* Tassi Goid. and *Fusarium moniliforme* Sheldon in sorghum. Crop Science. 28: 37-40.

Brewer D., Mason F. G., Taylor A. 1987. The production of alamethicins by *Trichoderma* spp. Canadian Journal of Botany. 33: 619–625.

Brueckner H., Koenig W. A., Aydin M., Jung G. 1985. Trichotoxin A40. Purification by counter-current distribution and sequencing of isolated fragments. Biochimica et Biophysica Acta. 827: 51–62.

Burmeister H. R., Grove M. D., Peterson R. E., Weisleder D., Plattner R. D. 1985. Isolation and characterization of two new fusaric acid analogs from *Fusarium moniliforme* NRRL 13,163. Applied and Environmental Microbiology. 50(2): 311-314.

Capasso R., Evidente A., Cutignano A., Vurro M., Zonno M. C., Bottalico A. 1996. Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. Phytochemistry. 41: 1035-1039.

Cassiolato A. M. R., Soares de Melo I. 1999. Filtration enrichment method for isolation of auxotrophic mutants of *Trichoderma harzianum* Rifai. Revista de Microbiologia. 30:43-46.

Cerchiai S. 2005. Lotta Biologica alla Tracheofusariosi del garofano. Tesi di Laurea Specialistica in Biotecnologie Vegetali e Microbiche. Università di Pisa, Pisa, IT.

Chakraborty A., Gupta P. K. S. 1995. Factors affecting cross protection of *Fusarium* wilt of pigeon pea by soilborne nonpathogenic fungi. Phytoparasitica. 23: 323-334.

Chelkowski J., Zawadzki M., Zajkowski P., Logrieco A., Bottalico A. 1990. Moniliformin production by *Fusarium* species. Mycotoxin Research. 6: 41-45.

Chet I. 1987. *Trichoderma*: application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. **In:** Chet I. (ed.). Innovative Approaches to Plant Disease Control (Series and Ecological and Applied Microbiology). Wiley-Interscience, New York, US. 137-160.

Claydon N., Allan M., Hanson J. R., Avent A. G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Transactions British Mycological Society. 88: 503-513.

Cohen B. A., Amsellem Z., Lev-Yadun S., Gressel J. 2002. Infection of tubercles of the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* by mycoherbicidal *Fusarium* species. Annals of Botany. 90: 567-578.

Cohen B. A., Amsellem Z., Maor R., Sharon A., Gressel J. 2002. Transgenically enhanced expression of indole-3-acetic acid confers hypervirulence to plant pathogens. Phytopathology. 92: 590-596.

Cole R. J., Kirksey J. W., Cutler H. G., Doupnik B. L., Peckham J. C. 1973. Toxin from *Fusarium moniliforme*: Effects on plants and animals. Science. 179: 1324–1326.

Cook R. J., Baker K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society. St.Paul, MN, USA. 1-539.

Cook R. J. 1988. Biological control and holistic plant-health care in agriculture. American Journal of Alternative Agriculture. 3: 51-62.

Cook R. J., Granados R. R. 1991. Biological control: making it work. **In:** Macdonald M. J. F. (ed.). Agricultural Biotechnology at the Crossroads. National Agricultural Biotechnology Council, Ithaca, NY. 213–227.

Cooke R. C., Rayner A. D. M. 1984. Ecology of Saprotrophic Fungi. Longman Publishing, London, UK. 1-415.

Couteaudier Y., Alabouvette C. 1990. Quantitative comparison of *Fusarium oxysporum* competitiveness in relation with carbon utilization. FEMS Microbiology Ecology. 74: 261–268.

Couteaudier Y. 1992. Competition for carbon in soil and rhizosphere, a mechanism involved in biological control of *Fusarium* diseases. **In:** Tjamos E. C., Papavizas G. C., Cook R. J. (ed.). Biological control of plant diseases. Plenum Press, New York, US. 99-104.

Curir P., Guglieri L., Dolci M., Capponi A., Aurino G. 2000. Fusaric acid production by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* and its role in the lily basal rot disease. European Journal of Plant Pathology. 106: 849-856.

Davis D. 1969. Fusaric acid in selective pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology. 59: 1391-1395.

Davis R. F., Backman P. A., Rodríguez-Kábana R., Kokalis-Burelle N. 1992. Biological control of apple fruit diseases by *Chaetomium globosum* formulations containing cellulose. Biological Control. 2: 118-123.

De Bach P. 1964. Biological Control of Insect Pests and Weeds. Reinhold Publ. Co., New York, US. 1-844.

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

De Waard M. A. 1997. Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. Pesticide Science. 51: 271-275.

Deacon J. W. 1997. Modern mycology. 3rd ed. Blackwell Science Publ., Oxford, UK. 1-303.

Deacon J. W. 2006. Fungal Biology. 2nd ed. Blackwell Publishing, Malden, MA. 204–206.

Decreto Legislativo dell'8 Luglio 2003 n. 224. Attuazione della direttiva 2001/18/CE concernente l'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 194 del 22 Agosto 2003-Supplemento Ordinario n.138.

Deese D. C., Stahmann M. A. 1962. Pectic enzymes in *Fusarium*-infected susceptible and resistant tomato plants. Phytopathology. 52: 255-260.

Del Sorbo G., Schoonbeek H. G., De Waard M. A. 2000. Fungal transporter involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. Fungal Genetics and Biology. 30: 1-15.

Del Sorbo G., Ruocco M., Schoonbeek H. J., Scala F., Pane C., Vinale F., De Waard M. A. 2008. Cloning and functional characterization of *BcatrA*, a gene encoding an ABC transporter of the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Mycological Research. 112: 737-746.

Dhingra O. D., Sinclair J. B. 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 1-355.

Direttiva 2001/18/CE del 17 Aprile 2001 relativa all'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati (OGM). Pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale n. L 106 del 17 Aprile 2001.

Direttiva 91/414/CE del 15 Luglio 1991 relativa all'immissione in commercio di prodotti fitosanitari. Pubblicata sulla Gazzetta ufficiale n. L 230 del 19 Agosto 1991.

Djonović S., Vargas W. A., Kolomiets M. V., Horndeski M., Wiest A., Kenerley C. M. 2007. A Proteinaceous Elicitor Sm1 from the Beneficial Fungus *Trichoderma virens* Is Required for Induced Systemic Resistance in Maize. Plant Physiology. 145(3): 875–889.

Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London, UK. 1-860.

Dor E., Evidente A., Amalfitano C., Agrelli D., Hershenhorn J. 2007. The influence of growth conditions on biomass, toxins and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras*, a potential agent for broomrape bicontrol. Weed Research. 47: 345-352.

Dos Reis Almeida F. B., Cerqueira F. M., Silva R. D. N., Ulhoa C. J., Lima A. L. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. Biotechnology Letters. 29: 1189–1193.

Doutt R. L. 1964. Biological characteristics of entomophagous adults. **In:** De Bach P. (ed.). Biological control of insect pests and weeds. Reinhold Publ. Co., New York, US. 145-167.

Driessen A. J. M., Rosen B. P., Konings W. N. 2000. Diversity of trasport mechanisms: common structural principles. Trends in Biochemical Science. 25: 397-401.

Druzhinina I. S., Kopchinsky A. G., Komon M., Bissett J., Szakacs G., Kubicek C. P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology. 42: 813-828.

Druzhinina I. S., Kubicek C. P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea* from aggregate species to species clusters? Journal of Zhejiang University Science. 6B(2): 100-112.

Dubey S. C., Suresh M., Birendra S. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. Biological control. 40: 118-127.

Dubos B. 1987. Fungal antagonism in agrobiocenoses. **In:** Chet I. (ed.) Innovative approaches to plant disease control. Willy & Sons Publishing, New York, US. 107-135.

Duijff B. J., Pouhair D., Olivain C., Alabouvette C., Lemanceau P. 1998. Implication of system induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. European Journal of Plant Pathology. 104: 903-910.

Dunlop R. W., Simon A., Sivasithamparam K. 1989. An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. Journal of Natural Products. 52: 67-74.

Eged S., Srobarova A. 1994. Bioassay for selection of fusaric acid-producing and non producing strains of *Fusarium oxysporum* (Schlecht). Biologia. 49(6):825-828.

Eged S. 2002. Changes in the content of fusaric acid during *Fusarium oxysporum* ontogenesis. Biologia. 57: 725-728.

Elad Y., Chet I., Henis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology. 28: 719–725.

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

Faull J. L. 1988. Competitive antagonism of soil-borne plant pathogens. **In:** Burge M. N. (ed.). Fungi in Biological Control Systems. Manchester University Press, Manchester, UK. 125-141.

Ferkett K. K. A., Levery S. B., Park C., Cammue B. P. A. Thevissen K. 2003. Isolation and characterization of *Neurospora crassa* mutants resistant to antifungal plant defensins. Fungal Genetics and Biology. 40: 176-185.

Figueras-Roca M., Cristiani C., Vannacci G. 1996. Sensitivity of *Trichoderma* isolates and selected resistant mutants to DMI fungicides. Crop protection. 15(7): 615-620.

Fisher N. L., Burgess L. W., Toussoun T. A., Nelson P. E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology. 72: 151-153.

Fleissner A., Sopalla C., Weltring K. M. 2002. An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. Molecular Plant-Microbe Interactions. 15: 102-108.

Frasconi C. 2006. Lotta biologica ad alcune formae speciales di *F. oxysporum*. Tesi di laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie. Facoltà di Agraria, Università di Pisa, Pisa, IT.

Fravel D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of Plant Disease. Annual Review of Phytopathology. 26:75-91.

Fravel D., Olivain C., Alabouvette C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist. 157: 493–502.

Gabriel C. J., Cook R. J. 1990. Biological control-the need for a new scientific framework. BioScience. 40: 204-206.

Gallou A., Cranenbrouck S., Declerck S. 2008. *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. European Journal of Plant Pathology. 124: 219–230.

Gams W., Bissett J. 1998. Morphology and Identification of *Trichoderma*. **In:** Harman G. E., Kubicek C. P. (ed.). *Trichoderma* and *Gliocladium* vol.1. Taylor & Francis Publishing, London, UK. 1: 3-34.

Garibaldi A., Gullino M. 1987. *Fusarium* wilt of carnation: present situation, problems and perspectives. Acta Horticolturae (ISHS). 216: 45-54.

Garrett S. D. 1970. Pathogenic Root-infecting Fungi. Cambridge Univeristy Press, London, UK. 1-294.

Gaumann E., Roth S., Ettlinger L., Plattner P. A., Nager U. 1947. Ionophore antibiotics produced by the fungus *Fusarium orthoceras* var. *enniatum* and other *Fusaria*. Experientia. 3: 202.

Gaumann E. 1957. Fusaric acid as a wilt toxin. Phytopathology. 47: 342-357.

Gemma J. N., Wasti S. S., Hartmann G. C. 1985. Antagonism of entomogenous fungal extracts to the Dutch elm disease fungus, *Ceratocystis ulmi*. Journal of the New York Entomological Society. 93: 1109-1112.

Goldman G. H., Hayes C., Harman G. E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Trends in Biotechnology. 12: 478–482.

Gothoskar S. S., Scheffer R. P., Walzer J. C., Stahmann M. A. 1953. The role of pectic enzymes in *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology. 43: 535-536.

Graeme-Cook K. A., Faull J. L. 1991. Effect of ultraviolet induced mutants of *Trichoderma harzianum* with altered antibiotic production on selected pathogens in vitro. Canadian Journal of Microbiology. 37: 659–664.

Grottola. 1999. Valutazione del rischio micotossicologico associato al consumo di fichi secchi. Tesi di laurea in Scienze e Tecnologie alimentari, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli, Napoli, IT.

Guetsky R., Shtienberg D., Elad Y., Dinoor A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology. 91: 621-627.

Gullino M. L. 1992. Control of *Botrytis* rot of grapes and vegetables with *Trichoderma* spp. **In:** Tjamos E. C., Papavizas G. C., Cook R. J. (ed.). Biological Control of Plant Disease. Plenum Press, New York, US. 125-132.

Gullino M. L. e Garibaldi A. 2007. Nuove tracheomicosi su colture ornamentali. Informatore fitopatologico, la difesa delle piante. 57(7-8): 8-16.

Hamill R. L., Higgens C. E., Boaz H. E., Gorman M. 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antiboitic toxic to *Artemia Salina*. Tetrahedron Letters. 49: 4255-4258.

Harman G. E. 1992. Development and benefits of rhizosphere competence fungi for biological control of plant pathogens. Journal of Plant. Nutrition. 15: 835-843.

Harman G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research of *Trichoderma harzianum* T22. Plant Disease. 84: 377-393.

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

Harman G. E. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. The American Phytopathological Society. 96(2): 191-194.

Hatvani L., Manczinger L., Kredics L., Szekeres A., Antal Z., Vagvolgyi C. 2006. Production of *Trichoderma* strains with pesticide-polyresistance by mutagenesis and protoplast fusion. Antonie Van Leeuwenhoek. 89(3-4): 387-393.

Hayashi K., Schoonbeek H. G., Sugiura H., De Waard M. 2001. Multi drug resistance in *Botrytis cinerea* associated with decresed accumulation of the azole fungicide oxpoconazole and increased transcription of the

ABC transporter gene *BcatrD*. Pesticide Biochemestry and Physiology. 70: 168-179.

Hayes C. K., Harman G. E., Woo S. L., Gullino M. L. 1993. Methods for electrophoretic karyotyping of filamentous fungi in the genus *Trichoderma*. Analytical Biochemistry. 209: 176-182.

Hermosa M. R., Grondona I., Iturriaga E. A., Diaz-Minguez J. M., Castro C., Monte E., Garcia-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Applied and Environmental Microbiology. 66: 1890-1898.

Herrmann M., Zocher R., Haese A. 1996. Enniatin Production by *Fusarium* Strains and Its Effect on Potato Tuber Tissue. Applied and Environmental Microbiology. 393–398.

Hershenhorn J., Park S.H., Stierle A., Strobel G. A. 1992. *Fusarium avenaceum* as a novel pathogen of spotted knapweed and its phytotoxins, acetoamide-butenolide and enniatin B. Plant Science. 86: 155-160.

Hjeljord L., Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and G*liocladium* in Biological control: an overview. **In:** Harman G. E., Kubicek C. P. (ed.). *Trichoderma* and G*liocladium* vol.2. Taylor & Francis Publishing, London, UK. 2: 131-147.

Howell C. R., Stipanovic R. D. 1983. Gliovirin a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. Canadian Journal of Microbiology. 29: 321-324.

Howell C. R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. **In:** Harman G. E., Kubicek C. P. (ed.). *Trichoderma* & *Gliocladium* vol.2. Taylor & Francis Publishing, London, UK. 2: 173-184.

Howell C. R., Hanson L. E., Stipanovic R. D., Puckhaber L. S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology. 90: 248-252.

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: 4-10.

Hwang J., Benson D. M. 2003. Expression of induced resistance in poinsietta cuttings against *Rhizoctonia* stem rot by treatment of stock plants with binucleate *Rhizoctonia*. Biological Control. 27: 73-80.

Ichikawa K., Kawasaki S., Tanaka C., Tsuda M. 2003. Induced resistance against *Fusarium* diseases of *Cymbidium* species by weakly virulent

strain HPF-1 (*Fusarium* sp.). Journal of General Plant Pathology. 69: 400-405.

Inbar J., Menendez A., Chet I. 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. Soil Biology and Biochemistry. 28(6): 757-763.

Jackson R. M. 1965. Antibiosis and fungistasis of soil microrganism. **In:** Baker K. F, Snyder W. C. (ed.). Univ. of California Press, Berkeley, LA. 363-369.

Jayaraj J., Radhakrishnan N. V. 2003. Development of UV-induced carbendazim-resistant mutants of *Trichoderma harzianum* for integrated control of damping-off disease of cotton caused by *Rhizoctonia solani*. Journal of Plant Disease and Protection. 110: 449–460.

Jones J. B., Jones J. P., Stall R. E., Ziller T. A. 1991. Compendium of tomato disease. American Phytopatological Society Press, St. Paul, MN. 1-73.

Karlowsky P. 2008. Secondary metabolites in soil ecology. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1-293.

Kendrick B. 1992. The Fifth Kingdom 2nd edition. Mycologue Publ., Waterloo, Ont., CDN. 1-371.

Kern H. 1970. Phytotoxins produced by *Fusaria*. **In:** Wood R. K. S., Ballio A., Graniti A. (ed.). Phytotoxins in Plant Disease. New York Academic, New York, US. 35-35.

Kleifeld O., Chet I. 1992. *Trichoderma harzianum*—interaction with plants and effect on growth response. Plant Soil. 144: 267–27.

Klein D., Eveleigh D. E. 1998. Ecology of *Trichoderma.* **In:** Harman G. E., Kubicek C. P. (ed.). *Trichoderma and Gliocladium* vol.1. Taylor & Francis Publishing, London, UK. 1: 57-74.

Klein K. K., Correll J. C. 2001. Vegetative compatibility group diversity in *Fusarium*. **In:** Summerell B. A., Leslie J. F., Backhouse D., Bryden W. L., Burgess L. W. Paul E. (ed.). *Fusarium*. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota. 83-96.

Knudsen I. M. B., Hockenhull J., FunckJensen D., Gerhardson B., Okeberg M. H., Tahvonen R., Teperi E., Sundheim L., Henriksen B. 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. European Journal of Plant Pathology. 103: 775–784.

Koike N., Hyakumachi M., Kageyama K., Tsuyumu S., Doke N. 2001. Induction of systemic resistance in cucumber against several disease by plant growth-promoting fungi lignification and superoxide generation. European Journal of Plant Pathology. 107: 523-533.

Kommedahl T., Abbas H. K., Burnes P. M., Mirocha C. J. 1988. Prevalence and toxigenicity of *Fusarium* spp. from soils of Norway near the Arctic Circle. Mycologia. 80: 790-794.

Kothari I. L., Patel M. 2004. Plant immunization. Indian Journal of Experimental Biology. 42(3): 244-252.

Kubicek C. P., Mach R. L., Peterbauer C. K., Lorito M. 2001. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. Journal of Plant Pathology. 83: 11-23.

Kumar A., Gupta J. P. 1999. Alteration in the antifungal metabolite production of tebuconazole tolerant mutants of *Trichoderma viride*. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 34: 27–34.

Kumar V., Parkhi V, Kenerley C. M., Rathore K. S. 2009. Defense-related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. Planta. 230: 277–291.

Landa B. B., Cachinero-Dıaz J. M., Lemanceau P., Jimenez-Dıaz R. M., Alabouvette C. 2002. Effect of fusaric acid and phytoanticipins on growth of rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Microbiology. 48: 971–985.

Lanzuise S. 2005. Geni potenzialmente coinvolti nell'interazione *Trichoderma*-pianta e/o agente patogeno. Tesi di Dottorato in Agrobiologia e Agrochimica. XVII ciclo. Facoltà di Agraria. Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, IT.

Larkin R. P., Fravel D. R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. Plant Disease. 82: 1022-1028.

Larkin R. P., Fravel D. R. 1999. Mechanisms of action and dose–response relationships governing biological control of *fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. Phytopathology. 89: 1152–1161.

Lemanceau P., Alabouvette C. 1991. Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. Crop Protection. 10: 279–286.

Lemanceau P., Bakker P. A. H. M., De Kogel W. J., Alabouvette C., Schippers B. 1993. Antagonistic effect on nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic

Fusarium oxysporum f.sp. *dianthi*. Applied and Environmental Microbiology. 59: 74–82.

Leslie J. F., Pearson C. A. S., Nelson P. E., Toussoun T. A. 1990. *Fusarium* species from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. Phytopathology. 80: 343-350.

Leslie J. F., Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing Professional, Iowa, USA. 1-387.

Lewis G. A., Papavizas G. C. 1987. Permeability changes in Hyphae of *Rhizoctonia solani* induced by germling preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Phytopathology. 77(5): 699-703.

Li M., Yang Q. 2007. Isolation and Characterization of a *β-tubulin* Gene from *Trichoderma harzianum.* Biochemical Genetics. 45(7-8): 529-534.

Li Y. C., Ledoux D. R., Bermudez A. J., Fritsche K. L., Rottinghaus G. E. 2000. Effects of Moniliformin on Performance and Immune Function of Broiler Chicks. Poultry Science. 79: 26–32.

Liu P. G., Yang Q. 2005. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. Research in Microbiology. 156: 416-423.

Logrieco A., Moretti A., Castellá G., Kostecki M., Golinski P., Ritieni A., Chelkowski J. 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. Applied and Environmental Microbiology. 64: 3084-3088.

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

Lora J. M., De La Cruz J., Benitez T., Llobell A., Pintor-Toro J. A. 1994. A putative catabolic repressed cell wall protein from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Molecular and General Genetics. 242: 461-466.

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

Lorito M., Woo S. L., D'Ambrosio M., Harman G. E., Hayes C. K., Kubicek C. P., Scala F. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. Plant diseases. 9(3): 206-213.

Lucas J. A. 1998. Plant pathology and Plant pathogens.3rd edition. Blackwell Science, Oxford, UK. 1-274.

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

Mandeel Q. A., Abbas J. A., Saeed A. M. 1995. Survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain: II. Spectrum of species on five isolation media. Sydowia. 47: 223-239.

Marasas W. F. O., Leistner L., Hofman G., Eckardt C. 1979. Occurrence of toxigenic strains of *Fusarium* in maize and barley in Germany. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 7: 289-305.

Marasas W. F. O., Nelson P. E., Toussoun T. A. 1984. Toxigenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park, PA. 1-328.

Mathur S. B., Manandhar H. K. 2003. Fungi in Seeds. Recorded at The Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Frederiksberg, Copenhagen, Denmark. 1-825.

Matta A. 1996. Fondamenti di Patologia vegetale. Patron Editore, Bologna, IT. 1-496.

May H. D., Wu Q., Blake C. K. 2000. Effects of the *Fusarium* spp. mycotoxins fusaric acid and deoxynivalenol on the growth of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter ruminantium*. Canadian Journal of Microbiology. 46: 692–299.

Mazzola M. 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne disease. Antonie van Leeuwenhoek. 81: 557-564.

McCain A. H., Noviello C. 1985. Biological control of *Cannabis sativa.* Proceedings, 6th International Symposium on Biological Control of Weeds. 635-642.

McKinney H. H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agriculture Research. 26: 195-217.

McLean K. L., Swaminathan J., Frampton C. M., Hunt J. S., Ridgway H. J., Stewart A. 2005. Effect of formulation on the rhizosphere competence and biocontrol ability of *Trichoderma atroviride* C52. Plant Pathology. 54: 212–218.

McMullen M. V. P., Stack R. W. 1983. Effect of isolation techniques and media on the differential isolation of *Fusarium* species. Phytopathology. 73: 458-462.

Melo S. I., Faull J. L., Graeme-Cook K. A. 1997. Relationship between in vitro cellulase production of uv-induced mutants of *Trichoderma harzianum* and their bean rhizosphere competence. Mycological Research. 101(11): 1389-1392.

Migheli Q., Gullino M. L. 1990. La lotta biologica contro i funghi fitopatogeni. Informatore Fitopatologico. 9: 9-18.

Minuto A., Minuto G., Migheli Q., Mocioni M., Gullino M. L. 1997. Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and of different commercial biofungicide formulations on *Fusarium* wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.). Crop Protection. 16(8): 765-769.

Moretti A., Belisario A., Tafuri A., Ritieni A., Corazza L., Logrieco A. 2002. Production of beauvericin by different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis, the *Fusarium* wilt agent of muskmelon. European Journal of Plant Pathology. 108: 661-666.

Nakaume R., Hamamoto H., Iada J., Akutsu K. 2002. A novel ABC transporter gene, *PMR5* is involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. Molecular Genetics and Genomics. 267: 179-185.

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

Nel B., Steinberg C., Labuschagne N., Viljoen A. 2006. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing *fusarium* wilt of banana. Plant Pathology. 55(2): 217-223.

Nelson P. E., Toussoun T. A., Marasa W. F. O. 1983. *Fusarium* Species: An illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University park, PA. 1-193.

Nirenberg H. I. 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on weath. Canadian Journal of Botany. 59: 1599-1609.

Nogales Moncada A. M., Jiménez-Díaz R. M., Rafael M., Pérezartés E. 2009. Vegetative Compatibility Groups in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and *F. oxysporum* Non pathogenic to Chickpea. Journal of Phytopathology. 157(11-12): 729-735.

Notz R., Maurhofer M, Dubach H, Haas D, Defago G. 2002. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4 Diacetylphloroglucinol Biosyntethic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology. 2229-2235.

O'Donnell K., Sutton D. A., Rinaldi M. G., Magnon K. C., Cox P. A., Revankar S. G., Sanche S., Geiser D. M., Juba J. H., van Burik J. A. H., Padhye A., Anaissie E. J., Francesconi A., Walsh T. J., Robinson J. S. 2004. Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium oxysporum* Complex Inferred from Multilocus DNA Sequence Data and Amplified Fragment Length Polymorphism Analyses: Evidence for the Recent Dispersion of a Geographically Widespread Clonal Lineage and Nosocomial Origin. Journal of Clinical Microbiology. 42(11): 5109-5120.

Olivain C., Alabouvette C. 1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. New Phytologist. 141: 497-510.

Ossana N., Mischke S. 1990. Genetic transformation of the biocontrol fungus *Gliocladium virens* to Benomyl resistance. Applied and Environmental Microbiology. 56 (10): 2052-3056.

Ozbay N., Newman S. E. 2004. Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 7(4): 478-484.

Pane C., Rekab D., Firrao G., Ruocco M., Scala F. 2008. A novel gene coding for an ABC transporter in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*) is involved in resistance to H2O2. Journal of Plant Pathology. 90 (3): 453-462.

Papavizas G. C., Lewis J. A., Abd-El Moity T. H. 1982. Evaluation of new byotipes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology. 72: 126-132.

Papavizas G. C., Lewis J. A. 1983. Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. Phytopathology. 73: 407-411.

Papavizas G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology. 23(1): 23-54.

Papavizas G. C. 1987. Genetic manipulation to improve the effectiveness of biocontrol fungi for plant disease control. **In:** Chet I. (ed.). Innovative approaches to plant disease control. Wiley J. & Sons, New York, US. 193-212.

Papavizas G. C. 1992. Biological control of selected soilborne plant pathogens with *Gliocladium* and *Trichoderma*. **In:** Tjamos E. C., Papavizas G. C., Cook R. J. (ed.). Biological control of plant diseases. Plenum Press, New York, US. 223-230.

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

Pasquali M., Gilardi G., Gullino M. L., Garibaldi A. 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce: vegetative compatibility and RAPD analysis. Informatore Fitopatologico. 10: 73-75.

Pattori E., Cavagna S., Rossi V. 2008. Nuove conoscenze sul ciclo biologico di Stemphylium vesicarium e possibilità di contenimento della maculatura bruna del pero. Protezione delle colture. 1: 10-16.

Pe'er S., Chet I. 1990. *Trichoderma* protoplast fusion: a tool for improving biocontrol agents. Canadian Journal of Microbiology. 36(1): 6–9.

Pennypacker B. W. 1981. Anatomical changes involved in the pathogenesis of plants by *Fusarium*. **In:** Toussoun T. A., Cook R. J. (ed.). *Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA. 400-408.

Postma J., Luttikholt A. J. G. 1996. Colonization of carnation stems by a non pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum* and its effect on Fusa*rium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Canadian Journal of Botany. 74: 1841–1851.

Proctor R. H., Plattner R. D., Brown D. W., Seo J. A., Lee Y. W. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycological Research. 108: 815-822.

Pusey P. L. 1994. Enhancement of biocontrol agents for postharvest disease and their integration with other control strategies. **In:** Wilson C. L., Wisniewski M. E. (ed.). Biological control of Post harvest Diseases-Theory and practice. CRC Press, Boca raton, Fl. 77-87.

Reino J. L., Guerrero R. F., Hernandez-Galan R., Collado I. G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry Reviews. 7: 89-123.

Renshaw J. C., Robson G. D., Trinci A. P. J., Wiebe M. G., Livens F. R., Collison D., Taylor R. J. 2002. Fungal siderophores: structures, functions and applications. Mycological Research. 106: 1123-1142.

Rey M., Delgado-Jarana J., Benıtez T. 2001. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. Applied Microbiology and Biotechnology. 55: 604–608.

Rifai M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers. 116: 1-56.

Rossi V., Pattori E. 2009. Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products. Biological Control. 49(1): 52-57.

Ruocco M., Lanzuise S., Vinale F., Marra R., Turrà D., Woo S. L., Lorito M. 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. Molecular Plant-Microbe Interactactions. 22(3): 291-301.

Samuels G. J. 1996**.** *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. Mycological Research. 100: 923–935.

Samuels G., Dodd S. L., Gams W., Castelbury L. A., Petrini O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercialy grown *Agaricus bisporus*. Mycologia. 94(1): 146-170.

Sanchez L. E., Endo R. M., Leary J. V. 1975. A rapid technique for identifying the clones of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing crown- and root-rot of tomato. Phytopathology. 65: 726-727.

Sands D. C., Ford E. J., Miller R. V., Sally B. K., McCarthy M. K, Anderson T. W., Weaver M. B., Morgan, C. T., Pilgeram A. L., Darlington L. C. 1997. Characterization of a vascular wilt of *Erythroxylum coca* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* forma specialis nova. Plant Disease. 81(5): 501-505.

Schirmböck M., Lorito M., Wang Y. L., Hayes C. K., Arisan-Atac I., Scala F., Harman G. 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. Applied and Environmental Microbiology. 60(12): 4364-4370.

Schimdt E. L. 1979. Initiation of plant-microbe interactions. Annual Review of Microbiology. 33: 355-376.

Schnabel, G., Dait, Q., and Paradkar, M. R. 2003. Cloning and expression analysis of the ATP-binding cassette transporter gene MFABC1 and the alternative oxidase gene MfAOX1 from *Monilinia fructicola*. Pest Management Science. 59: 1143-1151.

Schneider R. W. 1984. Effects of non pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f. sp. *apii* and a novel use of the Lineweaver–Burk double reciprocal plot technique. Phytopathology. 74: 646–653.

Schnider-Keel U., Seematter A., Maurhofer M., Blumer C., Duffy B. K., Gigot-Bonnefoy C., Reimmann C., Notz R., Defago G., Hass D., Keel C. 2000. Autoinduction of 2,4-diacetylphoroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent Pseudomonas fluorescens CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. The Journal of Bacteriology. 182: 1215–1225.

Schoonbeek H. G., Del Sorbo G., De Waard M. A. 2001. The ABC transporters BcatrB affect the sensitivity of *Botritys cinerea* to the phytoalexin resveratrol and fungicide fenpiclonil. Molecular Plant-Microbe Interactions. 14: 562-571.

Schoonbeek H. G., Raaijmakers J. M., De Waard A. M. 2002. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. Molecular Plant-Microbe Interactions. 15(11): 1165-1172.

Seo J. A., Kim J. C., Lee Y. W. 1996. Isolation and characterization of two new type C fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*. Journal of Natural Products. 59: 1003-1005.

Seo J. A., Kim J. C., Lee Y. W. 1999. N-Acetyl derivatives of type C fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*. Journal of Natural Products. 62: 355-357.

Sewram V., Mshicileli N., Shephard G. S., Vismer H. F., Rheeder J. P., Lee Y. W., Leslie J. F., Marasas W. F. O. 2005. Production of fumonisin B and C analogs by several *Fusarium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 4861-4866.

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

Simon A., Dunlop R. W, Ghisalberti E. L., Sivasithamparam K. 1988. *Trichoderma koningii* produces a pyron compound with antibiotic properties. Soil Biology and Biochemistry. 20: 263-264.

Sivan A., Chet I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. Journal of General Microbiology. 135: 675-682.

Sivan A., Chet I. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on Rhizosphere colonization. The American Phytopathological Society. 79(2): 198-203.

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

Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. **In:** Harman G. E., Kubicek C. P. (ed.). *Trichoderma* and *Gliocladium* vol.2. Taylor & Francis Publishing, London, UK. 1: 139-191.

Smith V. L., Wilcox W. F., Barman G. E. 1990. Potential for biological control of *Phytophtora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. Phytopathology. 80: 880-885.

Snyder W. C., Hansen H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. American Journal of Botany. 27: 64-67.

Spadaro D., Gullino M. L. 2004. State of the art and future perspects of the biological control of postharvest fruit disease. International Journal of Food Microbiology. 91(2): 185-194.

Spadaro D., Gullino M. L. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. Crop Protection. 24: 601-613.

Stasz T. E. 1990. Genetic improvement of fungi by protoplast fusion for biological control of plant pathogens. Canadian Journal of Plant Pathology. 12: 322-327.

Stefanato F. L., Abou-Mansour E., Buchala A., Kretschmer M., Mosbach A., Hahn M., Bochet C. G., Metraux J. P., Schoonbeek H. G. 2009. The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. 1-12.

Stergiopoulos I., Zwiers L. H., De Waard M. A. 2003. The ABC transporter MgAtr4 is a virulence factor of *Mycosphaerella graminicola* that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves. Molecular Plant-Microbe Interactions. 16:689-698.

Strauss B. S. 1958. Cell death and "unbalanced growth" in *Neurospora*. Journal of General Microbiology. 18: 658-669.

Sumeet S., Mukerjii K. G. 2000. Exploitation of fusion protoplast technology in improving biocontrol potential. **In:** Upadhyay R. K. (ed.). Biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture: crop diseases, weeds and nematodes. Plenum publishing Corporation, New York, US. 1: 39-48.

Szekeres A., Kredics L., Antal Z., Kevei F., Manczinger L. 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters. 233: 215–222.

Tamietti G., Ferraris L., Matta A., Abbattista Gentile I. 1993. Physiological responses of tomato plants grown in *Fusarium* suppressive soil. Journal of Phytopathology. 138: 66–76.

Urban M., Bhargava T., Hamer J. E. 1999. An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. European Molecular Biology Organization Journal. 18: 512-521.

Vajna L. 2008. Phytopathogenic *Fusarium oxysporum* Schlecht, as a Necrotrophic Mycoparasite. Journal of Phytopathology. 114(4): 338–347.

Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology. 36: 453-483.

Van Wees S. C. M., Van Der Ent S., Pieterse C. M. J. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. Current Opinion in Plant Biology. 11(4): 443-448.

Vannacci G., Gullino M. L. 2000. Use of biocontrol agents against soil-born pathogens: results and limitations. Acta Horticolturae. 532: 79-87.

Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y., Valero J. R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal. 37: 1–20.

Vermeulen T., Schoonbeek H. G., De Waard M. A. 2001. The ABC transporters BcatrB from *Botritys cinerea* is a determinant of the activity of the phenilpyrrole fungicide fludioxonil. Pest Management Science. 57: 393-402.

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

Vinale F., Ghisalberti E. L., Sivasithamparam K., Marra R., Ritieni A., Ferracane R., Woo S. L., Lorito M. 2009. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. Letters in Applied Microbiology. 48: 705–711.

Vinci V., Byng G. 1998. Strain improvement by non-recombinant methods. **In:** Demain A. L., Davies J. E. (ed.). Manual of industrial microbiology and biotechnology. The American Society for Microbiology, Washington, US. 103-113.

Viterbo A., Montero M., Ramot O., Friesem D., Monte E., Llobell A., Chet I. 2002. Expression regulation of the endochitinase *chit36* from

Trichoderma asperellum (*T. harzianum* T-203). Current Genetics. 42: 114-122.

Vizcaino J. A., Cardoza R. E, Hauser et al. 2006. *ThPTR2*, a di/tri peptide transporter gene from *Trichoderma harzianum*. Fungal Genetics and Biology. 43: 234-246.

Vurro M., Gressel J. 2006. An integrated European approach to biological control of plant diseases and weeds. **In:** Eilenberg J., Hokkanen H. M. T. (ed.). An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Springer, The Netherlands. 257-274.

Walters D. e Daniell T. 2007. Microbial induction of resistance to pathogens. **In:** Walters D., Newton A., Lyon G. (ed.). Induced Resistance for Plant Defence. Balckwell Publishing, UK. 143-152.

Webster J., Rifai M. A. 1968. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* IV. *Hypocrea pilulifera* sp. Nov. Transaction of British Mycological Society. 51: 511-514.

Wechter W. P., Whitehead M. P., Thomas C. E., Dean R. A. 1995. Identification of a randomly amplified polymorphic DNA marker linked to the *Fom-2 Fusarium* wilt resistance gene in muskmelon MR-1. Phytopathology. 85: 1245-1249.

Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology. 22: 837-845.

Weindling R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology. 24: 1153-1179.

Weller D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology. 26: 379–407.

Whipps J. M. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. New Phytologist. 107: 127-142.

Whipps J. M., Lumsden R. D. 2001. Commercial use of Fungi as Plant disease Biological Control Agents: Status and prospects. **In:** Butt T. M., Jackson C. W., Magan N. (ed.). Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential. CAB International Publishing, Wallingford, UK. 9-22.

Whipps J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany. 52: 487-511.

Wiest A., Grzegorski D., Xu B., Goulard C., Le Doan S., Ebbole D. J., Bodo B., Kenerley C. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. Journal of Biological Chemistry. 277: 20862–20868.

Wilhite S. E., Lumsden R. D., Straney D. C. 1994. Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Pythium* damping-off. Phytopathology. 84: 816-821.

Windham M. T., Elad Y., Baker R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology. 76: 518–521.

Woo S. L., Fogliano V., Mach R. L., Scala F., Zoina A., Kubicek C. P., Lorito M. 2002. Mycoparasitic *Trichoderma* strains are activated by host-derived molecules. **In:** Vannacci G., Sarrocco S. (ed.). Proc. 6th European Conference on Fungal Genetics. Edizioni Plus, Pisa, IT. 306.

Woo S. L., Scala F., Ruocco M., Lorito M. 2006. The Molecular Biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology. 96: 181-185.

Woo S. L., Lorito M. 2007. Exploiting the interactions between fungal anatagonists, pathogens and the plant for biocontrol. **In:** Vurro M., Gressel J. (ed.). Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands. 107-130.

Yabuta T., Kambe K., Hayashi T. 1937. Biochemistry of the bakanae-fungusa. I. Fusarinic acid, a new product of bakanae-fungus. Journal of the Agriculture Chemical Society of Japan. 10: 1059-1068.

Yamaguchi K., Kida M., Arita M., Takahashi M. 1992. Induction of systemic resistance by *Fusarium oxysporum* MT0062 in Solanaceous crops. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 58: 16-22.

Yamaguchi K., Sano T., Arita M., Takahashi M. 1992. Biocontrol of *Fusarium* wilt of tomato and *Verticillium* wilt of eggplant by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* MT0062. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 58: 188-194.

Yedidia I., Benhamoi N., Chet I. 1999. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. 1061–1070.

Yedidia I., Shoresh M., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. 2003. Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-

203) and Accumulation of Phytoalexins. Applied and Environmental Microbiology. 7343-7353.

Zaldívar M., Velásquez J. C., Contreras I., Pérez L. M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Electronic Journal of Biotechnology. 4(3): 1-9.

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

Zocher R., Kleinkauf H. 1978. Biosynthesis of enniatin B partial purification and characterization of the synthesizing enzyme and studies of the biosynthesis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 81: 1162-1167.

Zocher R., Keller U., Kleinkauf H. 1982. Enniatin synthetase, a novel type of multifunctional enzyme catalyzing depsi-peptide synthesis in *Fusarium oxysporum*. Biochemistry. 21: 43-48.

Zonno M. C., Vurro M. 1999. Effect of fungal toxins on germination of *Striga hermontica* seeds. Weed Research. 39: 15-20.

Zonno M. C., Vurro M. 2002. Inhibition of germination of *Orobanche ramosa* seeds by *Fusarium* toxins. Phytoparasitica. 30(5): 519-524.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Pasquale Trematerra e tutto il collegio dei docenti del dipartimento S.A.V.A. della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi del Molise, per avermi dato l'opportunità di intraprendere questo percorso formativo. Un ringraziamento particolare va al prof. Vincenzo De Cicco per l'estrema gentilezza e disponibilità dimostratami in questi anni.

Ringrazio il Dott. Angelo Visconti per aver avuto fiducia in me, dandomi la possibilità di svolgere la mia attività di ricerca presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del CNR di Bari.

Ringrazio il Dott. Claudio Altomare, il mio tutor d'istituto, un ricercatore impeccabile ma soprattutto una persona speciale. In questi anni, è stato per me un maestro, un collega, un amico. Sin dal primo giorno mi ha seguita nella ricerca ed indirizzata dedicandomi del tempo prezioso. Si è messo in discussione, mi ha fatto mettere in discussione, ha creduto in me e, a volte, ha dovuto anche asciugare le mie lacrime. Mi ha trasmesso l'amore verso la ricerca, mi ha insegnato che il lavoro del ricercatore è un lavoro duro, fatto di sacrifici, di impegno, di dedizione, di studio ma allo stesso tempo è intrigante, stimolante, appassionante.

Un ringraziamento speciale va anche alla Dott.ssa Antonia Gallo per avermi dato la possibilità di continuare a lavorare nell'ambito della biologia molecolare, per avermi trasmesso la passione e la grinta nell'affrontare problematiche scientifiche e non, per essere stata un'amica.

Ringrazio la mia famiglia: i miei genitori ed i miei tre fratelli per non aver mai smesso di credere in me e in quello che facevo, per avermi dato la forza, per aver avuto la pazienza di ascoltarmi, di consigliarmi, di consolarmi, di sopportarmi anche nei momenti di crisi.

Ringrazio Alessandro, il mio compagno, l'uomo che a detta di tutti è speciale per il solo fatto che mi sopporta da tanti anni. E' sicuramente vero...senza di lui non ce l'avrei fatta...è riuscito a leggere ogni mio pensiero, ogni mia preoccupazione, mi ha incoraggiata, ha asciugato i miei "goccioloni," non mi ha mai abbandonata persino quando è stato costretto a correggere la bibliografia e vi assicuro...c'era da scapparsene!

Ringrazio le mie amiche-colleghe, dette anche "le friends", Stefania e Grazia per avermi accompagnata, sostenuta, supportata, sopportata in questi anni. Ringrazio Angela, Filomena, Mara, Francesca, Vincenzo e tutti gli altri colleghi dell'ISPA-CNR di Bari che hanno condiviso con me ogni istante di questa esperienza.

Forse questa è stata la pagina più difficile da scrivere di tutta la tesi. Non sono molto brava nell'esprimere i miei sentimenti e le mie emozioni, spero solo che sia emersa la mia profonda gratitudine verso tutti coloro che hanno creduto in me e mi hanno accompagnata in questo percorso formativo. Ora, è arrivato il momento di chiudere anche questo capitolo della mia vita, con la speranza che il prossimo sia ancora meglio....

Marinella