



***UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI***

**DOTTORATO DI RICERCA**  
***MONITORAGGIO E CONTROLLO DEGLI ECOSISTEMI FORESTALI***  
***IN AMBIENTE MEDITERRANEO***

**XXI CICLO**

**SELEZIONE DI FUNGHI ENDOFITI ANTAGONISTI**  
**DI PATOGENI FORESTALI**

**Coordinatore del dottorato: Prof. A. Franceschini**

**Docente guida: Prof. A. Franceschini**

**Tutor: Prof.ssa L. Maddau**

**Co-tutor: Dr. B. T. Linaldeddu**

**Tesi di dottorato del**

**dr. Luca Deriu**

**Anno Accademico 2008-2009**

# INDICE

INTRODUZIONE	pag. 1
1. ENDOFITI ED ENDOFITISMO	“ 3
2. RUOLO ECOLOGICO DEI FUNGHI ENDOFITI	“ 5
3. METABOLITI SECONDARI PRODOTTI DA FUNGHI ENDOFITI	“ 13
SCOPO DELLA RICERCA	“ 18
MATERIALI E METODI	“ 21
1. SITI DI INDAGINE E PRELIEVO DEI CAMPIONI	“ 21
2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE ENDOFITI	“ 26
3. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTAGONISTICA DEGLI ISOLATI	“ 29
4. OTTENIMENTO DEI FILTRATI E DEGLI ESTRATTI	“ 31
5. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI COLTURALI	“ 34
6. ATTIVITÀ ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI COLTURALI	“ 35
7. ANALISI STATISTICA	“ 37
RISULTATI	“ 38
1. FUNGHI ISOLATI	“ 38
2. ATTIVITÀ ANTAGONISTICA IN COLTURA DUALE	“ 40
3. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI <i>BIONECTRIA OCHROLEUCA</i>	“ 43
4. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI <i>DICTYochaeta parva</i>	“ 46
5. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI <i>PENICILLIUM</i> SP.	“ 49
6. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI <i>TRICHODERMA VIRIDESCENS</i>	“ 52
7. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI <i>TRICHODERMA</i> SP.	“ 55
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	“ 58
RIASSUNTO	“ 62
BIBLIOGRAFIA	“ 66

# SELEZIONE DI FUNGHI ENDOFITI ANTAGONISTI DI PATOGENI FORESTALI

## INTRODUZIONE

In natura gli organismi viventi si sono evoluti in nicchie ecologiche definite dal complesso di relazioni che gli stessi instaurano in metabiosi o in simbiosi con organismi di specie diverse per soddisfare esigenze trofiche o di protezione dalle avversità. Le associazioni simbiotiche in particolare sono ampiamente diffuse nella biosfera e assumono un significato ecologico rilevante quando coinvolgono organismi autotrofi (piante) ed eterotrofi (microrganismi).

Queste associazioni possono realizzarsi con varie modalità che in sintesi si riconducono a tre differenti tipologie di simbiosi: *armoniche*, come il mutualismo (per es.: micorrize, noduli radicali batterici), nel quale entrambi i bionti coinvolti traggono benefici; *neutre*, come il commensalismo, in cui anche un eventuale vantaggio per un bionte non comporta alcun danno per l'altro; *disarmoniche* (antagonismo e patosismo), quando un bionte si avvantaggia a discapito dell'altro.

In ogni caso, da un punto di vista trofico in queste simbiosi si configura sempre un rapporto di parassitismo del quale si avvantaggia il bionte parassita, talvolta senza causare danni sensibili al bionte ospite, altre volte in modo aggressivo o virulento (parassita patogeno) tanto da stimolare le reazioni dell'ospite e attivare un processo morboso (Graniti, 2002).

Sotto un profilo più prettamente ecologico, l'associazione-interazione tra microrganismo e pianta rappresenta, soprattutto per il primo, un sistema ottimale per soddisfare le sue esigenze in termini di cibo, acqua, protezione da fattori avversi ambientali (stress idrici, osmotici, radiazioni nocive, temperature estreme) e da microrganismi competitori.

Le piante, quindi, rappresentano un valido *habitat* per molti microrganismi eterotrofi ed una pronta sorgente di sostanze nutritive, senza dubbio preferibile a quella costituita dai residui vegetali o da altri substrati organici del terreno, dove la competizione microbica è più elevata. Di conseguenza, per un microrganismo la strategia più efficace per far fronte a queste esigenze si configura con uno stile di vita da “endofita” (‘*endon*’=dentro e ‘*phyton*’=pianta) in un rapporto esclusivo con l'ospite vegetale.

## 1. ENDOFITI ED ENDOFITISMO

Vengono comunemente considerati endofiti tutti quei microrganismi, soprattutto funghi e batteri, che stabiliscono un rapporto di endobiosi con le piante. Per quanto riguarda più da vicino i funghi endofiti, la loro presenza è stata accertata in tutti gli organi: radici, fusto, rami e foglie sia di angiosperme che di gimnosperme. Il numero delle loro specie è stato stimato in circa 1,3 milioni, in considerazione del fatto che alle piante vascolari risultano mediamente associati da 2 a 5 funghi endofiti specifici (Dreyfuss e Chapela, 1994).

Gli endofiti possono colonizzare i tessuti dell'ospite per una parte o per tutta la durata del loro ciclo biologico senza causare sintomi visibili di malattia (Wilson, 1995). In base a questa definizione rientrano tra gli endofiti i microrganismi mutualisti e commensali che colonizzano le piante in maniera asintomatica, ma non sono esclusi quei microrganismi che al variare delle condizioni fisiologiche dell'ospite possono assumere un comportamento patogenetico.

Come si può intuire, il termine endofita, identificabile come microrganismo che vive dentro la pianta, non è esaustivo se non si considerano i ruoli e le molteplici interazioni che instaura con il proprio ospite in relazione al tempo, i rapporti sinergici o antagonistici con gli altri microrganismi endofitici e le diverse espressioni sintomatiche o asintomatiche da parte della pianta (Ragazzi, 2009).

Ancora oggi non c'è univocità nel dare una definizione precisa di endofita: infatti, come sottolineano Schulz e Boyle (2005), molti micologi usano questo termine solamente per indicare quei funghi che colonizzano la pianta senza causare sintomi visibili in nessun momento specifico (Stone *et al.*, 2000); altri parlano invece di “vero endofita”, in riferimento a quei funghi la cui completa colonizzazione non risulta mai in sintomi visibili di malattia (Mostert *et al.*, 2000); altri ancora, in rapporto a quegli endofiti fungini che si comportano da patogeni opportunisti nelle piante arboree in condizioni di stress, parlano di “endofiti patogeni” (Ragazzi, 2009).

In effetti esiste un'ampia variabilità del rapporto che l'organismo endofita può instaurare con il suo ospite; per esempio in letteratura sono stati descritti come endofiti: alghe patogene e piante parassite, batteri mutualistici, micorrizici, commensalistici e patogenetici, funghi micorrizici, a commensalismo criptico, mutualistici, mutualistici che diventano patogeni, patogeni latenti (Schulz e Boyle, 2005; Ragazzi, 2009).

L'endofitismo si configura quindi come un rapporto di endobiosi tra piante e microrganismi che include un'ampia varietà di rapporti nutrizionali, variabili dal mutualismo al parassitismo (Sieber, 2007). L'ospite fornisce all'endofita un sostegno trofico e protezione verso le avversità dell'ambiente esterno. Per contro, l'endofita può conferire alla pianta, sia direttamente che indirettamente attraverso i prodotti del suo metabolismo secondario, un vantaggio ecologico aumentandone il vigore vegetativo e la resistenza ai parassiti (Graniti, 2002).

In effetti, l'endofitismo si identifica per due caratteri distintivi: la colonizzazione dei tessuti interni di piante vive e l'infezione asintomatica, quindi con un preciso riferimento all'*habitat* e alla strategia d'infezione dell'endofita, ma non alla sua tassonomia o al ciclo infettivo (Wilson, 1995, Bills, 1996).

## 2. RUOLO ECOLOGICO DEI FUNGHI ENDOFITI

I risultati di oltre un secolo di ricerche sui funghi endofiti suggeriscono che gran parte, se non tutte, le piante negli ecosistemi naturali instaurano rapporti di simbiosi con questi microrganismi (Siegel *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1996; Germina *et al.*, 1998; Ragazzi *et al.*, 1999; Rodrigues e Samuels, 1999; Gutierrez-mora e Martinez-Romero, 2001; Schena *et al.*, 2003; Hoff *et al.*, 2004; Raviraja, 2005; Rodriguez *et al.*, 2009).

Gli endofiti possono colonizzare i tessuti delle piante in maniera localizzata e sistemica, sia inter che intracellulare (Stone *et al.*, 2000). Inoltre, possono manifestare una specificità d'organo e di tessuto come risultato del loro adattamento a differenti condizioni fisiologiche nelle piante (Rodrigues e Samuels, 1999) e, pertanto, colonizzare solo le foglie o gli aghi (Stone, 1986; Deckert *et al.*, 2001), le radici (Bacon e Hinton 1996), o adattarsi a crescere nella corteccia (Fisher e Petrini, 1990).

La colonizzazione endofitica dei tessuti epigei (in particolare foglie e germogli) è differente da quella delle radici. A tal riguardo, molte ricerche hanno evidenziato che la colonizzazione dei germogli può essere intracellulare e confinata a singole cellule o intercellulare localizzata; mentre la colonizzazione endofitica delle radici avviene generalmente in maniera estensiva sia intra che intercellularmente.

L'infezione può avvenire tramite appressori e austori, oppure attraverso le aperture naturali quali stomi, idatodi e lenticelle (Stone, 1987; Cabral *et al.*, 1993; Stone *et al.*, 1994). L'esito della colonizzazione può avere un forte impatto sulle piante che si manifesta con una maggiore tolleranza agli stress abiotici e biotici, un incremento del vigore vegetativo, oppure con un'alterazione della loro fisiologia.

Le ricerche effettuate negli ultimi venti anni hanno dimostrato l'estrema specializzazione degli endofiti nella colonizzazione delle piante. È infatti ampiamente dimostrato che gli endofiti colonizzano tutti i *taxa* di piante, da quelle meno evolute, come muschi, epatiche e felci, fino a piante superiori (gimnosperme

e angiosperme) che crescono in foreste tropicali, temperate e boreali; inoltre, colonizzano piante erbacee annuali e poliannuali che crescono in ambienti estremi come quelli artici, alpini e xerici (Zhang *et al.*, 2006).

Da una singola pianta è possibile isolare centinaia di specie endofitiche di cui alcune presentano una specificità per quell'ospite (Tan e Zou, 2001). Questa specificità può essere influenzata dalle condizioni ambientali, quali i cambiamenti climatici stagionali, e dalle condizioni fisiologiche della pianta stessa. A tal riguardo, le indagini effettuate sulla comunità endofitica associata alle piante di *Quercus ilex*, hanno mostrato un maggiore grado di similarità tra le comunità fungine delle piante presenti in una ristretta area geografica rispetto alle comunità associate allo stesso ospite situato in aree distanti geograficamente (Fisher *et al.*, 1994).

Un singolo endofita è anche in grado di colonizzare numerose piante ospite appartenenti a famiglie diverse ed *habitat* differenti. *Phialocephala fortini*, ad esempio, è un comune fungo endofita radicale con un'ampia distribuzione geografica, capace di colonizzare piante di ambienti sia aridi che fluviali (Addy *et al.*, 2000). Diversamente, altri endofiti fungini, tra i quali *Biscougnauxia mediterranea*, noto endofita delle querce, sono in grado di colonizzare i tessuti di varie specie vegetali all'interno di un determinato ecosistema, in un areale di distribuzione geografica abbastanza limitato (Franceschini *et al.*, 2002; Turco *et al.*, 2009).

Attualmente dal punto di vista ecologico i funghi endofiti vengono distinti principalmente in due gruppi: Clavicipitacei e non-Clavicipitacei (Tabella 1). Essi differiscono dal punto di vista tassonomico, evolutivo ed ecologico. I primi infettano le piante erbacee mentre i secondi colonizzano i tessuti di piante soprattutto arboree.

Dal punto di vista sistematico le classi 2, 3 e 4 dei non-Clavicipitacei includono soprattutto funghi Ascomiceti e in minima parte Basidiomiceti (Arnold, 2007; Higgins *et al.*, 2007; Promputtha *et al.*, 2007; U'Ren *et al.*, 2008).



Gli endofiti Clavicipitacei colonizzano esclusivamente piante erbacee, sistemicamente e intercellularmente. Essi si trasmettono in modo verticale attraverso il seme, sono in grado di produrre metaboliti secondari con funzione deterrente nei confronti di insetti ed erbivori e, data la capacità di colonizzare gli spazi intercellulari, dipendono dalle sostanze nutritive presenti nell'apoplasto per il loro accrescimento. A questo raggruppamento ecologico appartengono specie dei generi *Balansia*, *Epichloë* e *Claviceps* (Bacon e White, 2000; Saikkonen *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2009).

Tabella 1. Parametri simbiotici utilizzati per caratterizzare le classi dei funghi endofiti (da Rodriguez *et al.*, 2009).

Parametri	Clavicipitacee		Non-Clavicipitacee	
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Numero di ospiti	Ristretto	Ampio	Ampio	Ampio
Tessuti colonizzati	Epigei/Ipogei	Epigei/Ipogei	Epigei	Ipogei
Colonizzazione <i>in planta</i>	Estensiva	Estensiva	Limitata	Estensiva
Biodiversità <i>in planta</i>	Bassa	Bassa	Alta	Sconosciuta
Trasmissione	Verticale/Orizzontale	Verticale/Orizzontale	Orizzontale	Orizzontale
Benefici ecologici *	NHA	NHA e HA	NHA	NHA

\*) I benefici ecologici riportati con la sigla NHA (nonhabitat-adapted) includono la tolleranza alla siccità e la stimolazione della crescita e sono indipendentemente dall'habitat di origine, mentre i benefici HA (habitat-adapted) sono influenzati da fattori specifiche dell'habitat quali il pH, la temperatura e la salinità.

I non-Clavicipitacei, sono costituiti da un gruppo polifiletico di microrganismi fungini il cui ruolo ecologico ancora è poco conosciuto. Rodriguez *et al.* (2009) propongono la suddivisione di questo raggruppamento di endofiti in 3 classi in base al numero di ospiti infettati, al grado di colonizzazione dei tessuti della pianta, ai meccanismi di trasmissione, al livello di biodiversità e al ruolo ecologico.

La classe 2 dei non-Clavicipitacei include gli endofiti che possono colonizzare tutti i tessuti della pianta, mentre classe 3 e 4 le specie che colonizzano rispettivamente solo la parte epigea ed ipogea.

Gli endofiti della classe 3 danno origine a infezioni altamente localizzate, mentre quelli della classe 2 e 4 si distinguono per una colonizzazione estensiva dei tessuti. La biodiversità all'interno della classe 2 è abbastanza limitata, mentre nella classe 3 è estremamente elevata, come dimostra una ricerca dove sono state riscontrate più di 20 specie fungine in una singola foglia di una pianta tropicale (Arnold e Herre, 2003; Rodriguez *et al.*, 2008).

Il divario in termini di biodiversità, fra la classe 2 e 3, può dipendere sia dal differente grado colonizzazione dell'ospite sia dal modo di trasmissione. Sebbene entrambe le classi utilizzino prevalentemente una trasmissione orizzontale, gli endofiti della classe 2 possono trasmettersi anche in modo verticale attraverso i semi (Rodriguez *et al.*, 2009). Per la classe 4, invece, il grado di biodiversità non è stato ancora sufficientemente studiato.

I vantaggi ecologici che gli endofiti possono conferire ai loro ospiti possono essere suddivisi in *habitat-adapted* e *nonhabitat-adapted*. Il primo gruppo include quei benefici che derivano da pressioni selettive specifiche dell'*habitat*, come il pH, la temperatura e la salinità; nel secondo gruppo vengono considerati i benefici conferiti da tutti gli endofiti indipendentemente dall'*habitat*. Gli endofiti della classe 2 sono gli unici a possedere entrambe le proprietà (Rodriguez *et al.*, 2008).

I metaboliti prodotti dagli endofiti possono influenzare la fisiologia delle piante ospiti, migliorandone lo sviluppo vegetativo, la tolleranza agli stress abiotici e l'adattamento a condizioni di aridità (Schardl, 1996). Diversi endofiti producono fitormoni che favoriscono un maggior sviluppo dell'ospite, altri accumulano nella pianta alcaloidi, metaboliti tossici, insetticidi biologici e micotossine di varia natura che influenzano la fisiologia dell'ospite conferendo resistenza, di volta in volta, a stress abiotici (quali terreni salini, bassi pH, metalli pesanti, ecc.) o ad

attacchi di funghi e batteri fitopatogeni, di nematodi, di insetti predatori, di roditori e di mammiferi, verso i quali possono avere anche effetti deterrenti (antifeeding).

Secondo alcuni studi effettuati nelle foreste nord americane, esistono meccanismi simili in piante, sia di conifere che di latifoglie, le cui foglie non vengono attaccate da insetti perché colonizzate da funghi endofiti produttori di insetticidi naturali (Wilson, 2000).

Le comunità microbiche endofitiche giocano, quindi, un importante ruolo benefico nella fisiologia delle piante che le ospitano. Questo effetto è dovuto, sia alla produzione di metaboliti secondari bioattivi, sia alla mediazione nell'assorbimento di elementi nutrizionali quali il fosforo e l'azoto (Lyons *et al.*, 1990; Malinowski e Belesky, 1999; Guo *et al.*, 2000).

Alcuni studi hanno dimostrato che certi funghi endofiti di piante tolleranti alla siccità esercitano la loro azione favorendo l'immagazzinamento e la secrezione di zuccheri e alcoli (Richardson *et al.*, 1992), ma anche modificando alcune caratteristiche anatomiche fogliari che riducono le perdite legate alla traspirazione (Richardson *et al.*, 1990; Elmi *et al.*, 2000).

È nota anche l'azione di alcuni endofiti come "fito-protettori". *Pantoea agglomerans*, un endofita di diverse piante agrarie (pisello, patata, pomodoro e mais), svolge un effettivo biocontrollo sulle batteriosi di queste piante (Hsieh *et al.*, 2005). *Hetroconium chaetospora*, un fungo endofita radicale del cavolo cinese è in grado di proteggere questa pianta da alcune malattie causate da *Plasmodiophora brassicae* e *Verticillium* sp. (Narisawa *et al.*, 2000).

Chen *et al.* nel 1995 isolarono alcuni batteri endofiti: *Aureobacterium saperda*, *Bacillus pumilus*, *Phyllobacterium rubiacearum*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia solanacearum*, in grado di ridurre in modo significativo gli attacchi di *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* su cotone.

I microrganismi endofiti svolgono un ruolo importante anche nella formazione delle comunità vegetali, influenzando la composizione floristica e quindi la biodiversità. A tal proposito, è stato accertato che il fungo endofita

*Neotyphodium* sp., attraverso la produzione di tossine (alcaloidi), è in grado di alterare drasticamente la catena alimentare dei piccoli erbivori, uccelli ed insetti, tanto da influenzare anche la struttura e la diversità della comunità vegetale (Clay e Holah, 1999).

Gli endofiti fogliari sono in grado di influenzare anche il ciclo del carbonio, alterando la composizione chimica della lettiera e quindi influenzando il processo di decomposizione della sostanza organica (Omacini *et al.*, 2001, Young *et al.*, 2005).

In ambito forestale gli studi volti alla comprensione delle complicate relazioni ecologiche e funzionali tra endofiti e piante non hanno dato ancora risultati comparabili a quelli ottenuti in campo agrario. Ciò, probabilmente, a causa della complessità delle interazioni ecologiche che si instaurano negli ecosistemi forestali, sottoponendo le piante ad una molteplicità di rapporti e innescando, di conseguenza, reazioni diversificate della popolazione endofitica ad esse associata.

La lunga vita delle specie legnose e la loro conseguente esposizione alle spore aeree dei funghi, determina nelle stesse sia un'elevata diversità endofitica (Tabella 2), sia una molteplicità di rapporti che possono variare nel tempo. Durante questo lungo periodo l'attività simbiotica di uno stesso endofita può mutare da mutualistica a parassitaria passando per tutta una serie di interazioni ancora non ben conosciute.

Tabella 2. Numero di *taxa* endofitici associati a piante forestali (da Ragazzi, 2009).

Famiglia	Foglie	Rametti	Totale
Aceraceae	38	31	69
Betulaceae	38	255	293
Fagaceae	340	230	570
Salicaceae	9	19	28
Tiliaceae	17	-	17
Cupressaceae	132	82	214
Pinaceae	565	143	708
Taxaceae	6	-	6
Totale	1145	760	1905

Alcuni esempi in merito a quest'ultimo concetto sono rappresentati da: *Chaetomium globosum* che si comporta da endofita neutrale-saprotrofo-patogeno (Arnold *et al.*, 2009); *Fomes fomentarius*, noto agente di carie su diverse specie forestali, che sopravvive come endofita xilematico nei tessuti sani di faggio (Sieber, 2007); *Apiognomonina quercina*, agente di “antracosi” su specie quercine che alterna fasi di vita neutrale a fasi patologiche (Ragazzi *et al.*, 2003).

In questi casi, l'endofita fungino patogeno, dopo la penetrazione (attiva o passiva) all'interno dell'ospite, germina producendo un tallo che assume uno stato di quiescenza, presumibilmente attivata da una reazione di ipersensibilità della pianta elicitata dall'endofita stesso. L'endofita sopravvive quindi sottoforma di tallo quiescente, reso tale da metaboliti prodotti dalla pianta, bloccando la propria crescita (Sieber, 2007).

Lo stato di quiescenza permane sino al sopraggiungere di fattori esterni, quali stress biotici o abiotici, che alterano le condizioni fisiologiche della pianta inducendo il tallo alla “rottura” della quiescenza per iniziare il processo patogenetico.

Analogo discorso si può fare anche per gli endofiti mutualisti o commensali che, variando nel tempo il rapporto con la pianta, mutano il proprio *status* in saprotrofi o patogeni.

A tale proposito, Schulz *et al.* (1999) e Schulz e Boyle (2005) hanno proposto un modello di colonizzazione asintomatica basato su un equilibrio dinamico tra pianta ospite ed endofiti chiamato “antagonismo bilanciato” (Figura 1).

In questo schema il patogeno neutralizza o comunque supera le reazioni difensive della pianta fino al punto in cui si sviluppa la malattia, mentre l'endofita tollera la reazione della pianta fino al punto in cui esso può infettare e colonizzare i tessuti. Se l'antagonismo tra fungo e pianta si sbilancia a favore del fungo, l'endofita si può comportare da patogeno.

Molti endofiti, infatti, possiedono gli stessi fattori di virulenza dei patogeni. Essi sono in grado di produrre numerosi enzimi (amilasi, cellulasi, laccasi, lipasi, pectiniasi, polifenolossiasi, proteasi, xilanasi) necessari ad infettare e colonizzare i tessuti della pianta ospite (Petrini *et al.*, 1993; Viret e Petrini, 1994; Lumyong *et al.*, 2002). Inoltre, la pianta ospite può reagire con gli stessi meccanismi di difesa attivi e passivi che utilizza verso i patogeni.

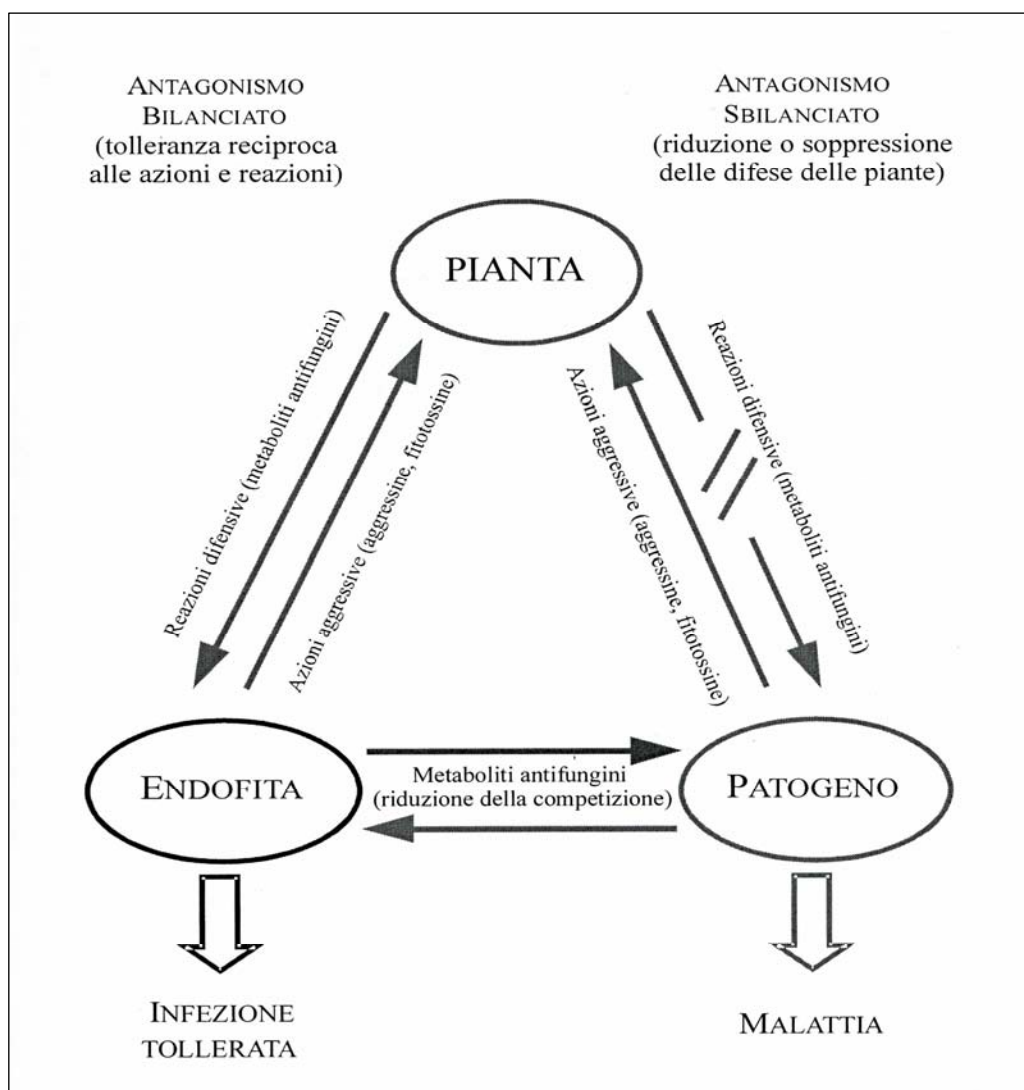


Figura 1. Schema dell'antagonismo bilanciato/sbilanciato (da Schulz *et al.*, 1999, adattato da Graniti, 2002).

### 3. METABOLITI SECONDARI PRODOTTI DA FUNGHI ENDOFITI

Oltre alle piante, i microrganismi costituiscono la maggiore risorsa di prodotti naturali con proprietà biologiche. Attualmente si conoscono più di 20000 metaboliti bioattivi di origine microbica (Bérdy, 2005). Batteri e funghi sono ben noti per produrre composti chimici utilizzabili in vari settori tra cui quello medico e farmaceutico (Kock *et al.*, 2001; Bode *et al.*, 2002; Donadio *et al.*, 2002; Chin *et al.*, 2006; Gunatilaka, 2006; Lam, 2006; Mitchell *et al.*, 2008; Stadler e Keller, 2008).

Un forte impulso nello studio dei metaboliti secondari prodotti dai funghi derivò dall'importante scoperta, effettuata all'inizio del secolo scorso, riguardante la penicillina un antibiotico beta-lattamico isolato da alcune specie di *Penicillium*.

Da quel momento in poi, sono stati immessi sul mercato numerosi medicinali il cui principio attivo è ottenuto da microrganismi fungini. Questi medicinali sono impiegati per curare varie malattie dell'uomo, tra cui il cancro, i disturbi neurologici e le disfunzioni metaboliche e immunologiche (Chin *et al.*, 2006).

Visto il crescente interesse verso i metaboliti secondari di natura fungina anche gli endofiti sono stati oggetto di ricerche finalizzate ad accertarne la capacità di produrre sostanze bio-attive.

Gli endofiti, oltre a rappresentare una grande riserva di biodiversità microbica, finora esplorata solo in minima parte, possono costituire un'inesauribile fonte di sostanze biologicamente attive che oltre a mediare le interazioni con la pianta ospite possono costituire una fonte di nuovi composti utilizzabili in vari settori delle agro-biotecnologie. Oggi, con tali prospettive, le ricerche sono indirizzate allo studio degli endofiti degli ecosistemi forestali poiché rappresentano un'importante riserva di nuove molecole attive con proprietà antimicrobiche, fitotossiche, antitumorali, immunosoppressive e antimalariche.

Suryanarayanan *et al.*, (2009), saggiando 150 funghi endofiti isolati da 55 piante forestali appartenenti a 29 famiglie hanno individuato alcuni isolati, appartenenti ai generi *Alternaria*, *Chaetomium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*,

*Nigrospora* e *Xylaria*, capaci di produrre vari metaboliti secondari bioattivi con proprietà alghicida, antifungina, insetticida e anticancerosa.

In tabella 3, è riportato un elenco di alcuni metaboliti secondari prodotti da funghi endofiti di piante forestali con la relativa attività biologica.

Tabella 3. Metaboliti bioattivi prodotti da funghi endofiti di piante forestali (da Maddau *et al.*, 2004 modificato).

<b>Endofita</b>	<b>Pianta ospite</b>	<b>Metabolita</b>	<b>Attività</b>
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Ginkgo biloba</i>	Taxolo	Anticancerosa
<i>Acrerionium</i> sp.	<i>Taxus baccata</i>	Leucinostatin A	Anticancerosa, Antifungina, Fitotossica
<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Sequoia sempervirens</i>	Sequoiatones A - B	Antitumorale
<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Sequoia sempervirens</i>	Sequoiatones C-F	Zootossica
<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Sequoia sempervirens</i>	Sequoiamonascins A-D	Zootossica
<i>Canoplea elegantula</i>	<i>Picea mariana</i>	Isocumarine	Insetticida
<i>Cryptosporiopsis</i> sp. <i>Pezicula</i> sp.	<i>Pinus sylvestris</i> <i>Fagus sylvatica</i>	Echinocandin	Antibatterica
<i>Cryptosporiopsis</i> cf. <i>quercina</i>	<i>Trypterigium wilfordii</i>	Cryptocandin	Antifungina
<i>Cryptosporiopsis</i> cf. <i>quercina</i>	<i>Trypterigium wilfordii</i>	Cryptocin	Antifungina
<i>Cytospora</i> sp.	<i>Quercus</i> sp.	Cytonic acids A - B	Antivirale
<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Conocarpus erecta</i> <i>Forsteronia spicata</i>	Cytosporones D - E	Antibatterica
<i>Diplodia corticola</i>	<i>Quercus suber</i>	Diplopyrone	Fitotossica
<i>Guignardia</i> sp.	<i>Spondias mombin</i>	Guignardic acid	Antimicrobica
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Eucryphia cordifolia</i>	Composti volatili	Antifungina



<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Subglutinols A – B	Immunorepressiva
<i>Hormonema</i> sp.	<i>Juniperus communis</i>	Enfumafungin	Antifungina
<i>Hormonema dematioides</i>	<i>Abies balsamea</i>	Rugulosin	Insetticiida
<i>Hormonema dematioides</i>	<i>Chamaecyparis thyoides</i>	preussomerin D	Antibatterica Antifungina
<i>Hormonema dematioides</i>	<i>Pinus</i> sp.	Hormonemate	Antitumorale
<i>Monochaetia</i> sp. <i>Pestalotiopsis</i> sp.	Rainforest plants	Acido Ambuico	Antifungina
<i>Monodictys fluctuata</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Stemphytriol	Erbicida
<i>Muscodor albus</i>	<i>Cynnamomum zeylanicum</i>	Composti volatitli	Antifungina
<i>Muscodor roseus</i>	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Composti volatitli	Antifungina
<i>Muscodor vitigenus</i>	<i>Paullinia paullinioides</i>	Naphtalene	Insetticiida
<i>Nodulisporium</i> sp.	Woody plants	Acido Nodulisporico A	Insetticiida
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Taxus brevifolia</i>	Phomopsolides	Antibatterica
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Taxus brevifolia</i>	Highly methylated polyketides	Antifungina
<i>Periconia</i> sp.	<i>Torreya grandifolia</i>	Taxolo	Anticancerosa
<i>Periconia</i> sp.	<i>Taxus cuspidate</i>	Periconicins	Antibatterica
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Taxus brevifolia</i>	Pestalotiopsins A - B	Immunosuppressive
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i>	Taxolo	Anticancerosa
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Torreya taxifolia</i>	Pestalopyrone Hydroxypestalopyrone Pestaloside	Fitotossica
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Erminalia morobensis</i>	Isopestacin	Antifungina Antiossidante
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxes wallachiana</i>	Taxolo	Anticancerosa
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Bald cypress-	Taxolo	Anticancerosa
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Torreya taxifolia</i>	Torreyanic acid	Antitumorale

<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Rainforest plants	Pestacin	Antifungina Antiossidante
<i>Pestalotiopsis jesteri</i>	<i>Fragaea bodenii</i>	Jesterone Hydroxy-jesterone	Antifungina
<i>Phomopsis cassiae</i>	<i>Cassia spectabilis</i>	Cadinane sesquiterpenes	Antifungina
<i>Phomopsis longicolla</i>	<i>Dicerandra frutescens</i>	Dicerandrols A-C	Antibatterica
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Salix lasiolepis</i> .	Phomodiol	Antifungina
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Salix gracilostyla</i>	Phompsichalasin	Antimicrobica
<i>Phomopsis</i> sp.	Teak	Phomoxanthonas A - B	Antimalarica
<i>Phyllosticta spinarum</i>	<i>Platyclusus orientalis</i>	Sesquiterpene quinines	Anticancerosa
<i>Rhinochlamydia</i> sp.	<i>Tripterigium wilfordii</i>	Cytochalasins	Antitumorale
<i>Seimatoantherium nepalense</i>	<i>Taxus wallichiana</i>	Taxolo	Anticancerosa
<i>Sphaeropsis</i> sp.	<i>Taxus globosa</i>	Sphaeric acid	Zootossica
<i>Sporormia minima</i>	<i>Taxus wallachiana</i>	Taxolo	Anticancerosa
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Taxolo	Anticancerosa
<i>Tubercularia</i> sp.	<i>Taxus mairei</i>	Taxolo	Anticancerosa
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Siparuna</i> sp.	Lactones	Antimalarica

La capacità dei funghi endofiti di produrre una vasta gamma di metaboliti secondari può derivare dall'ampia diversità di substrati naturali utilizzati (Hyde, 2005; Suryanarayanan e Hawksworth, 2005), nonché dalla costante interazione fra fungo e pianta ospite. In tal senso, un ambiente metabolicamente aggressivo, in cui l'endofita è costantemente alle prese con le difese chimiche dell'ospite (Cabral *et al.*, 1993; Peters *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 1999), potrebbe spiegare l'evoluzione della capacità sintetica degli endofiti. Inoltre, chiarirebbe l'apparente anomalia osservata in una specie di endofita che produce un composto bioattivo quando è isolata da una pianta ospite, ma non quando viene isolata da un'altra specie di pianta (Li *et al.*, 1996). Ad esempio, l'attività erbicida di metaboliti secondari

dell'endofita *Phyllosticta capitalensis* differisce a seconda della pianta dalla quale l'endofita è stato isolato. Questo suggerisce che la pianta ospite (e quindi il suo metabolismo) può influenzare la capacità sintetica dell'endofita.

Pertanto, nella fase di valutazione dei funghi endofiti per la produzione di metaboliti secondari è importante allestire le colture su differenti substrati di crescita. Infatti, è noto che alcuni parametri come la composizione del substrato, l'aerazione, il pH, la temperatura e il periodo di incubazione possono influenzare significativamente la produzione e la composizione dei metaboliti secondari prodotti (Bode *et al.*, 2002).

## SCOPO DELLA RICERCA

Le malattie fungine hanno causato, e causano ancora oggi, una forte riduzione della produzione agrarie e forestali a livello mondiale. Attualmente, il loro controllo avviene prevalentemente facendo ricorso alla lotta chimica basata sull'impiego di agrofarmaci di sintesi (Gullino *et al.*, 2002).

A fronte di un innegabile aumento della produzione, l'uso degli agrofarmaci ha però causato gravi problemi di natura ambientale, dovuti all'inquinamento del suolo e delle falde acquifere con sostanze pericolose per la salute dell'uomo e degli animali.

Pertanto, oggigiorno la ricerca di nuovi mezzi di lotta a basso impatto ambientale, alternativi a quelli classici, riveste un ruolo chiave nell'ambito delle agro-biotecnologie. In questo settore, nel corso degli ultimi anni, come testimoniano le numerose pubblicazioni scientifiche a riguardo, una crescente attenzione è stata riposta verso lo studio dei funghi endofiti con attività antagonistica isolati da piante forestali (Campanile *et al.*, 2007; Linaldeddu *et al.*, 2007; Mejìa *et al.*, 2008; Maddau *et al.*, 2009).

È infatti ormai ben noto che gli endofiti sono in grado di prevenire o ridurre i danni causati dai patogeni alle piante attraverso diversi meccanismi d'azione quali: la competizione per le sostanze nutritive e lo spazio, la produzione di inibitori allelochimici (batteriocine, antibiotici, enzimi litici), e l'induzione della risposta sistemica (ISR) (Lodewyckx *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2008).

La ISR verso i patogeni è un tipo di resistenza che le piante sviluppano in seguito alla colonizzazione dei loro tessuti (radici) da parte di alcuni batteri conosciuti come *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR). Questo tipo di resistenza non induce la produzione di proteine di patogenesi (PR) ed è mediata da segnali biochimici in cui è coinvolto l'acido salicilico (SA), le specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'etilene e l'acido jasmonico (JA) (Van Loon *et al.* 1998).

Oltre ai batteri PGPR anche alcune specie di *Trichoderma* endofitiche sembrerebbero attivare nella piante questo tipo di risposta sistemica (Bailey *et al.*, 2008). Ciò ha ampliato le possibilità di utilizzare come bio-antiparassitari questi funghi che per le loro capacità, sia come micoparassiti, sia come produttori di metaboliti bioattivi vengono studiati da più di 30 anni con buoni risultati (Coley-Smith *et al.*, 1974; Verma, *et al.*, 2007). Per esempio, attualmente la lotta biologica contro le principali fitopatie del cacao in centro America si basa proprio sull'impiego di specie endofite appartenenti al genere *Trichoderma* con capacità antimicrobiche (Evans *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2004; Rubini *et al.*, 2005; Tondje *et al.*, 2006).

Inoltre, in questi ultimi anni la comunità scientifica internazionale ha focalizzato sempre più l'attenzione sulla ricerca di nuovi antibiotici, antivirali, chemioterapici di origine microbica. In passato gran parte di tali sostanze sono state ottenute da microrganismi prevalentemente terricoli, mentre oggi un interesse crescente è rivolto proprio verso i microrganismi ad *habitus* endofitico (Strobel e Daisy, 2003; Owen e Hundley, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008; Strobel *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2009; Maddau *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 2009).

Pertanto, con tali presupposti è parso interessante, nell'ambito di questa tesi di dottorato, svolgere ricerche sulle micocenosi endofitiche di alcune specie forestali autoctone della Sardegna. Ciò al fine di selezionare endofiti fungini con capacità antagonistiche da saggiare, sia in programmi di lotta biologica contro pericolosi patogeni di specie forestali – quali le querce e il castagno che rivestono nell'isola un ruolo ecologico e socio-economico di notevole rilevanza – sia come fonte di composti naturali biologicamente attivi, potenzialmente utilizzabili in vari settori delle biotecnologie agro-industriali e in campo medico-farmaceutico. Peraltro, risultati incoraggianti sono stati già ottenuti in questo ambito attraverso l'impiego di alcuni endofiti fungini delle querce che in prove *in vitro* ed *in vivo* hanno mostrato un'elevata capacità competitiva nei confronti di patogeni associati

ai fenomeni di deperimento delle querce, agendo con vari meccanismi d'azione inclusa la produzione di metaboliti secondari bioattivi (Linaldeddu *et al.*, 2005; Linaldeddu *et al.*, 2007).

In sintesi, le ricerche per questa tesi sono state indirizzate a conseguire i seguenti obiettivi:

- isolamento di endofiti fungini da piante di specie forestali autoctone della Sardegna;
- identificazione su base morfologica e bio-molecolare e selezione degli endofiti fungini dotati di più spiccate capacità antagonistiche nei confronti di patogeni forestali;
- valutazione dell'attività antifungina e zootossica dei loro estratti organici ottenuti da substrati di crescita differenti.

## MATERIALI E METODI

### 1. SITI DI INDAGINE E PRELIEVO DEI CAMPIONI

I campioni vegetali utilizzati per l'isolamento degli endofiti sono stati prelevati da piante di castagno, di quercia da sughero e di tasso situate in 4 differenti aree della Sardegna centrale: due in Provincia di Nuoro, una in Provincia di Oristano e una in Provincia dell'Ogliastra (Figura 2).

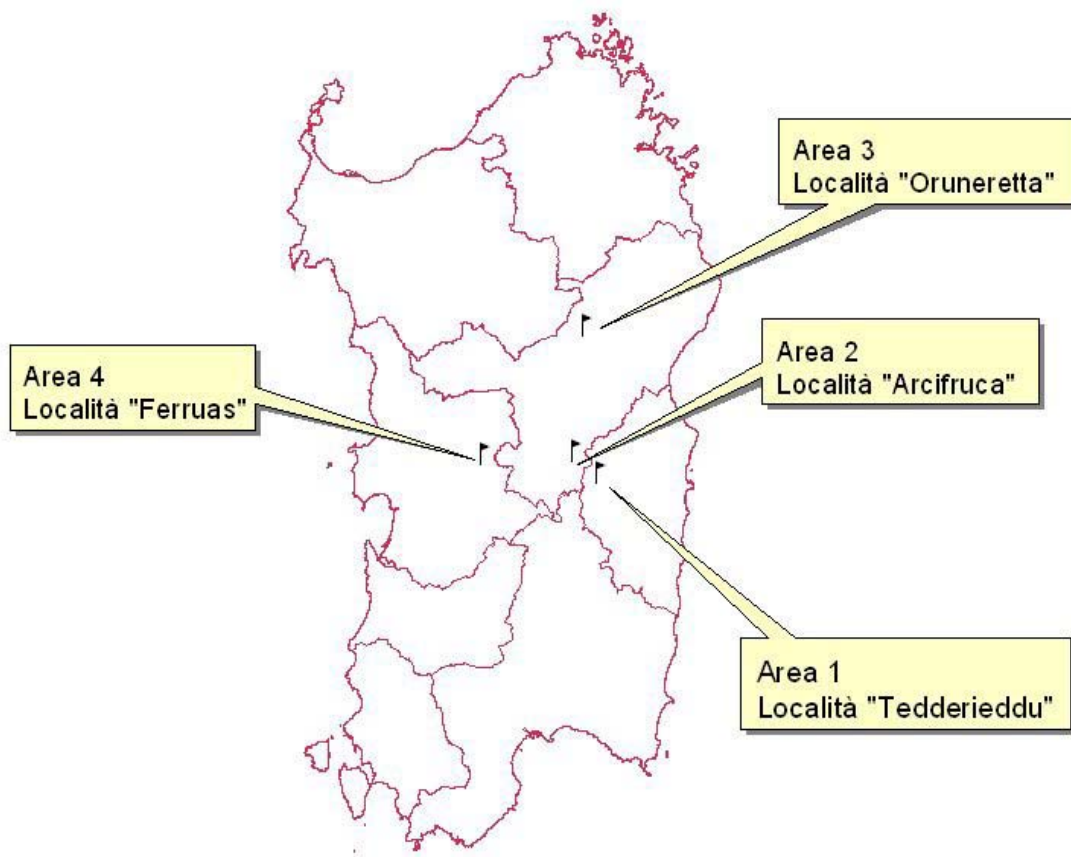


Figura 2. Mappa della Sardegna e localizzazione geografica dei siti oggetto di campionamento.

L'area 1 è situata in agro di Arzana, in località "Tedderieddu" (IGM 1:25000 Foglio 531 sez. 4 Villanova Strisaili), in un compluvio di un affluente del Rio Orruidorgiu a circa 1000 m s.l.m (Figura 3a). L'area è popolata da alberi sparsi di tasso e di ontano residuali di una vegetazione riparia in passato più consistente (Figura 3b). Secondo la classificazione fitoclimatica del Pavari il territorio in esame ricade nel *Lauretum* sottozona fredda. Il regime pluviometrico (893 mm in 88 giorni piovosi) è caratterizzato da un picco delle precipitazioni nel periodo in autunno-vernino. La temperatura media annua è di 12,9°C, quella del mese più freddo (gennaio) di 3,6° C e quella del mese più caldo (agosto) di 23,8°C. Il territorio mostra evidenti segni di degrado ambientale ed erosione dovuti alla riduzione della copertura arborea causata dal forte impatto antropico (utilizzazioni frequenti, pascolo, incendi).

All'interno dell'area sono state scelte due piante di tasso da cui sono stati prelevati nel mese di gennaio, dalla parte medio-bassa della chioma, 10 rametti di circa 10 mm di diametro e 30 foglie.

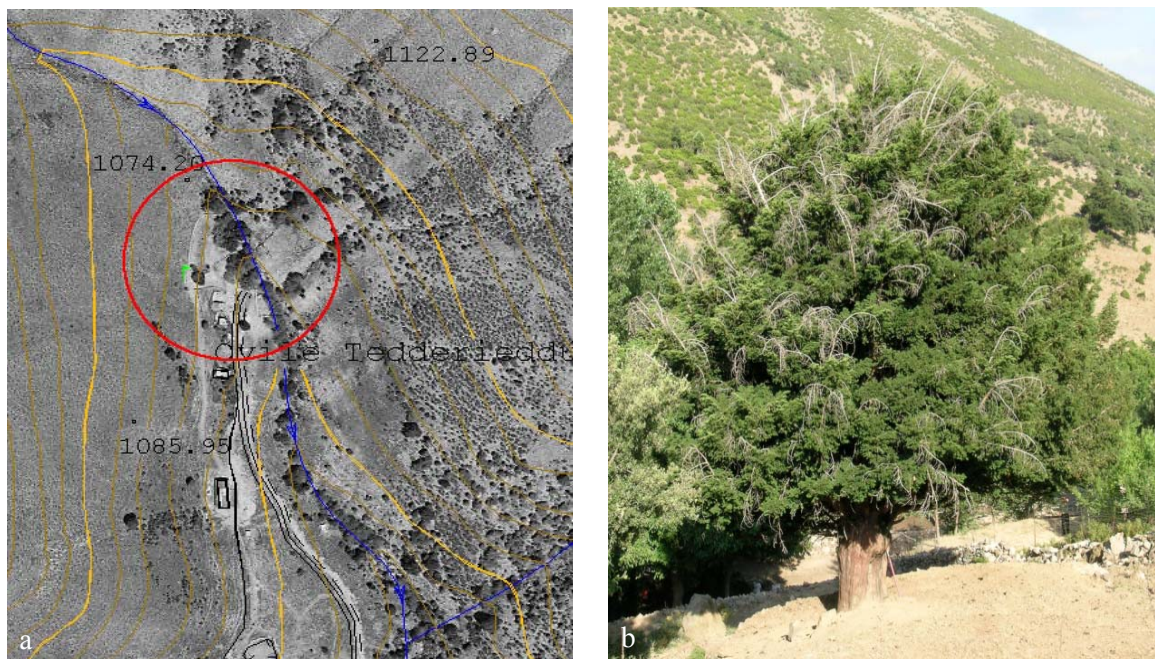


Figura 3. Ortofoto del sito d'indagine (a); pianta di tasso da cui sono stati prelevati i campioni vegetali utilizzati per l'isolamento degli endofiti (b).



L'area 2 è stata individuata all'interno di un castagneto da frutto di circa 2 ha, situato in agro di Desulo, in località "Arcifruca" (IGM 1:25000 Foglio 516 sez. 2 Desulo) ad una quota di 1053 m s.l.m (Figura 4a). Secondo la classificazione fitoclimatica del Pavari il territorio in esame ricade nel *Lauretum* sottozona fredda. Il regime pluviometrico (1181 mm in 106 giorni piovosi) è caratterizzato da un picco delle precipitazioni nel periodo in autunno-vernino. La temperatura media annua è di 12,7°C, quella del mese più freddo (gennaio) di 3,5°C e quella del mese più caldo (agosto) di 22,8°C.

All'interno del castagneto sono state scelte *at random* 30 piante di castagno (Figura 4b), e da ciascuna di esse è stato prelevato un tassello di 2 x 2 cm di corteccia in prossimità di un "cancro corticale" causato da *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr.

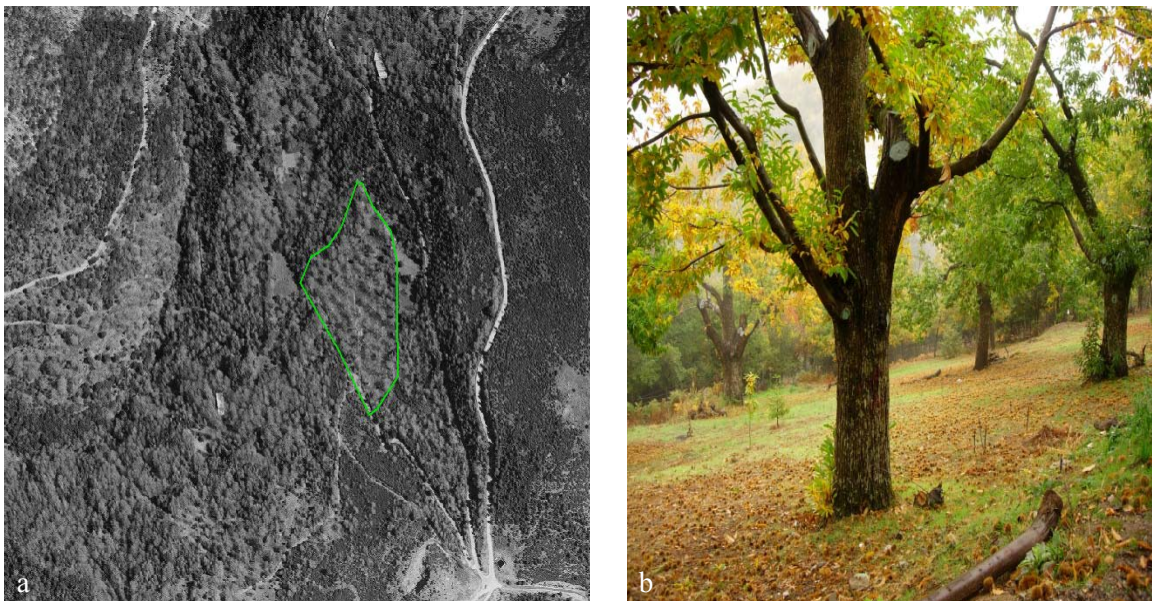


Figura 4. Ortofoto del sito d'indagine (a); piante di castagno da cui sono stati prelevati i campioni di corteccia (b).

L'area 3 è stata individuata in agro di Orune, in località "Oruneretta" (IGM 1:25000 Foglio 481 sez. 2 Benetutti) su un'altopiano posto a 700 m s.l.m (Figura 5a). La vegetazione è costituita da elementi sparsi di quercia da sughero associati a piante di cisto ed erica. Secondo la classificazione fitoclimatica del Pavari il territorio in esame ricade nel *Lauretum* sottozona media. Il regime pluviometrico (708 mm in 78 giorni piovosi) è caratterizzato da un picco delle precipitazioni nel periodo in autunno-vernino. La temperatura media annua è di 14,8°C, quella del mese più freddo (gennaio) di 5,8°C e quella del mese più caldo (agosto) di 25°C. In passato l'intero territorio è stato percorso più volte da incendi che, unitamente ad un'irrazionale gestione silvo-colturale (estrazioni maldestre del sughero e arature sottochioma), hanno contribuito a determinare ripetuti stress vegetativi nelle piante, esponendole ad attacchi entomatici e fungini (Figura 5b).

All'interno del sito d'indagine è stata scelta una pianta di quercia da sughero attaccata dal coleottero xilofago *Platypus cylindrus*. Da questa è stata recisa una branca che poi è stata sezionata in 10 parti di circa 2 cm di spessore.

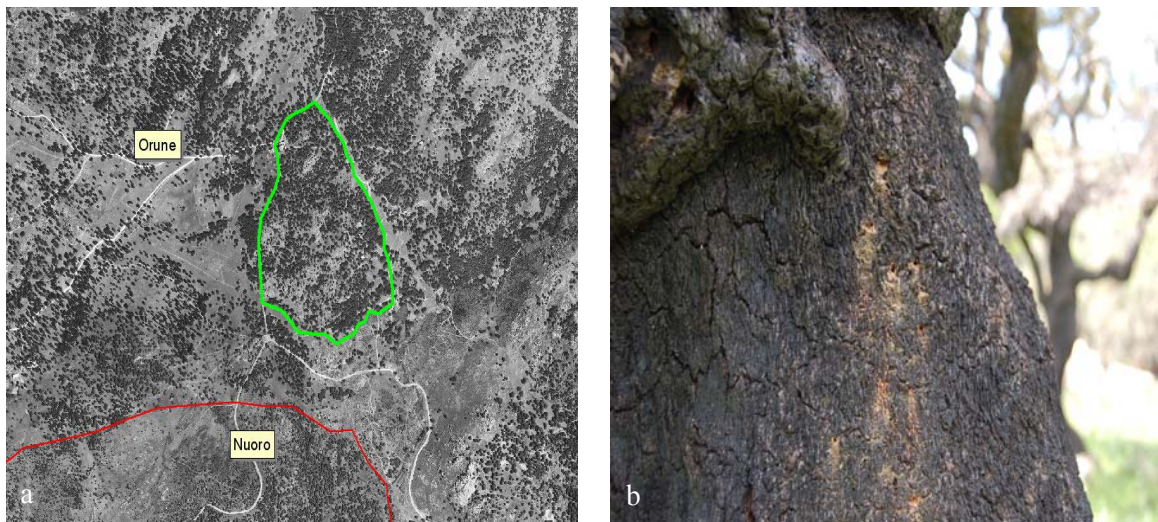


Figura 5. Ortofoto del sito d'indagine (a); particolare del fusto di una pianta di quercia da sughero con attacchi del coleottero xilofago *Platypus cylindrus* (b).

L'area 4 è stata individuata in una sughereta situata al confine tra i Comuni di Busachi e Samugheo, in località "Feurras" (IGM 1:25000 Foglio 515 sez. 2 Busachi e 529 sez. 1 Samugheo) ad una quota di 750 m s.l.m. (Figura 6a). Lo strato arbustivo è costituito da specie tipiche della macchia mediterranea come corbezzolo, erica, lavanda e cisto (Figura 6b). Secondo la classificazione fitoclimatica del Pavari il territorio in esame ricade nel *Lauretum* sottozona calda. Il regime pluviometrico (662 mm in 71 giorni piovosi) è caratterizzato da un picco delle precipitazioni nel periodo in autunno-vernino. La temperatura media annua è di 17°C, quella del mese più freddo (gennaio) di 9°C e quella del mese più caldo (agosto) di 25,4°C.

All'interno del sito sono state individuate alcune piante vigorose e in buone condizioni fitosanitarie. Da queste sono state prelevate *at random* 30 ghiande.

Tutti i campioni vegetali (foglie, rametti, porzioni di tessuti legnosi e ghiande) prelevati nei vari siti d'indagine sono stati etichettati e trasferiti immediatamente in laboratorio per l'isolamento degli endofiti fungini.

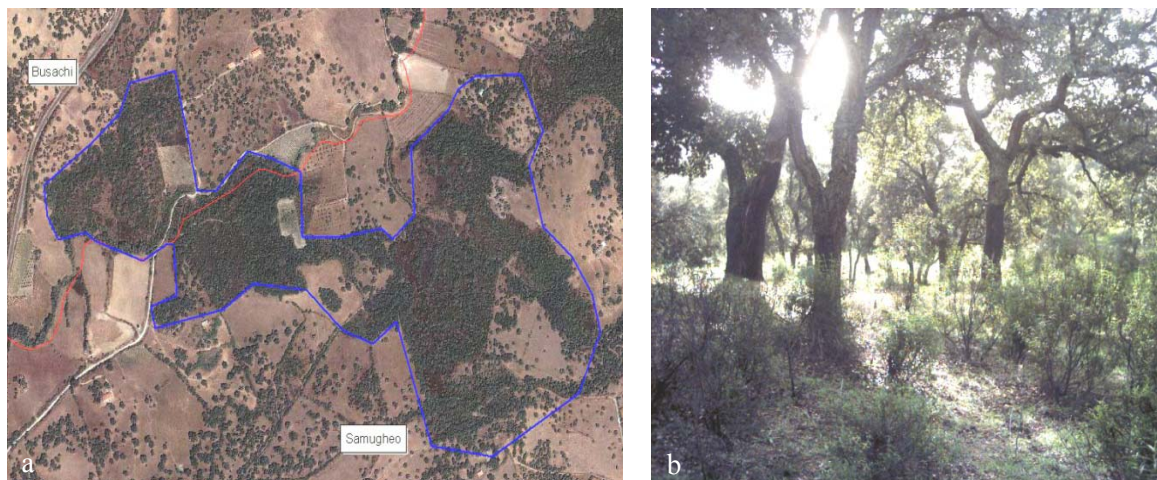


Figura 6. Ortofoto del sito d'indagine (a); piante di quercia da sughero da cui sono state prelevate le ghiande (b).

## 2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI ENDOFITI FUNGINI

Tutti i campioni sono stati inizialmente disinfettati superficialmente mediante immersione in acqua ossigenata al 10% per 15 minuti e successivamente risciacquati, sotto cappa, con acqua sterile e posti ad asciugare su carta da filtro sterile. I campioni di tessuto legnoso prelevati dalla branca di quercia da sughero nell'area 2 sono stati disinfettati ulteriormente con alcool etilico al 70% per 1 minuto prima del risciacquo.

Dai campioni di castagno e di sughera e dalle foglie di tasso è stato ottenuto, con l'ausilio di un bisturi sterile, un singolo frammento di circa 2-3 mm<sup>2</sup>, mentre dai rami di tasso sono stati prelevati 3 frammenti di corteccia e da ogni singola ghianda 10 frammenti di tegumento e 10 di endosperma (Figura 7).

Tutti i frammenti ottenuti sono stati posti all'interno di piastre Petri (90 mm Ø), contenenti un substrato a base di patata-destrosio-agar (PDA) addizionato con 0,06 g l<sup>-1</sup> di streptomicina. Le piastre sono state incubate in termostato a 25°C, al buio.

Dopo 4-5 giorni di incubazione, dal margine di ciascuna colonia fungina sviluppatasi, è stata prelevata una porzione di micelio e trasferita su nuove piastre Petri contenenti PDA. Le colture pure sono state mantenute in termostato a 25°C fino alla differenziazione delle strutture riproduttive. Le colonie sono state identificate su base morfologica attraverso il rilievo dei caratteri colturali (pigmentazione e crescita del micelio, produzione di metaboliti volatili caratteristici) e micro-morfometrici (morfologia e dimensione delle spore e dei conidi) al microscopio ottico, in accordo con le chiavi dicotomiche d'identificazione proposte da Barnett, (1960), Sutton (1980), Kuthubutheen e Nawawi (1991), Schroers (2001), Jaklitsch *et al.* (2006).

Le colonie che non hanno differenziato strutture riproduttive sono state suddivise in base ai caratteri morfo-colturali e riportate come morfotipi di miceli sterili.



Figura 7. a) Ghiande sezionate e separazione del tegumento dall'endosperma; b) ottenimento dei frammenti da entrambi i tessuti.

Alcuni isolati fungini sono stati inoltre identificati anche su base molecolare. A tal fine, un frammento di micelio (20 mg) ottenuto da colture pure di 4-6 giorni su PDA di ogni specie fungina è stato opportunamente lisato in modo da ottenere il DNA genomico mediante il metodo CTAB descritto da Doyle e Doyle (1987). Il DNA è stato amplificato mediante la reazione a catena della DNA polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction). Le reazioni di PCR per l'amplificazione delle regioni ITS (ITS1, 5.8S, ITS2) del rDNA attraverso l'impiego dei primers ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) sono state condotte utilizzando un termociclatore PCR Express (Hybaid) con le seguenti condizioni di reazione: iniziale denaturazione a 95°C per 3 min; 35 cicli (a 95°C per 15 s, 55°C per 20 s e 72°C per 1 min); e infine un ulteriore step a 72°C per 5 min.

I frammenti amplificati sono stati purificati mediante l'Eurogold extraction kit (Euroclone) in accordo con le istruzioni della ditta produttrice.

Il sequenziamento degli amplificati è stato effettuato presso i laboratori della BMR-Genomics ([www.bmr-genomics.it](http://www.bmr-genomics.it)) dell'Università di Padova.

Le sequenze nucleotidiche sono state lette ed analizzate col programma FinchTV 1.4.0 e i nucleotidi dedotti sono stati infine confrontati con i dati

disponibili in Genbank utilizzando il programma blastn del database del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Infine, gli allineamenti delle sequenze sono stati eseguiti utilizzando il software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

### 3. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTAGONISTICA DEGLI ISOLATI

Tra tutti gli isolati ottenuti ne sono stati scelti 16 di cui alcuni già noti per le loro potenziali capacità antagonistiche e altri più attivi nel colonizzare e pigmentare il substrato (Tabella 4). La loro attività antagonistica è stata valutata verso i 3 funghi patogeni (*Biscogniauxia mediterranea* De Not. O. Kuntze, *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque e *Discula quercina* (Cooke) Sacc.) più direttamente coinvolti nell'eziologia del deperimento delle querce, e verso *C. parasitica*, l'agente causale del “cancro della corteccia” del castagno.

Tabella 4. Specie fungine endofitiche impiegate nei saggi di antagonismo in coltura duale.

Endofita	Ospite	Tessuto
<i>Alternaria</i> sp.	Tasso	Rami (corteccia)
<i>Bionectria ochroleuca</i> (Schwein.) Schroers & Samuels	Sughera	Branca (legno)
<i>Dictyochaeta parva</i> (S. Hughes & W.B. Kendr.) Hol.-Jech.	Sughera	Ghianda (tegumento)
<i>Dothiorella</i> sp.	Tasso	Rami (corteccia)
<i>Fusarium</i> sp. 1	Tasso	Rami (corteccia)
<i>Fusarium</i> sp. 2	Sughera	Branca (legno)
<i>Penicillium</i> sp.	Sughera	Branca (legno)
<i>Phoma</i> sp.	Tasso	Foglia
<i>Trichoderma viridescens</i> (Horne & Will.) Jaklitsch & Samuels	Castagno	Rami (corteccia)
<i>Trichoderma</i> sp.	Tasso	Ramo
Ifomicete non identificato	Sughera	Branca (legno)
Micelio sterile (a)	Sughera	Ghianda (tegumento)
Micelio sterile (b)	Tasso	Rami (corteccia)
Micelio sterile (c)	Tasso	Foglia
Micelio sterile (d)	Tasso	Rami (corteccia)
Micelio sterile (e)	Sughera	Ghianda (endosperma)

I saggi sono stati effettuati ponendo a confronto in coltura duale i 16 endofiti con i 4 patogeni in tutte le combinazioni possibili. A tal fine, due dischetti di agar-micelio di 5 mm di diametro, uno del patogeno e l'altro dell'endofita, prelevati dal margine di colonie madri di 4 giorni di età, sono stati posti alla distanza di 45 mm uno dall'altro in piastre Petri (Ø 10 cm), contenenti 20 ml di PDA al 3%. Le prove relative a ciascuna combinazione endofita-patogeno sono state allestite con tre replicazioni e ripetute 2 volte.

La valutazione dell'attività antagonistica dei funghi endofiti è stata effettuata dopo 30 giorni di incubazione a 25°C, utilizzando un indice di antagonismo (IA) calcolato secondo la metodologia proposta da Badalyan *et al.* (2002). Essa contempla 7 tipi di interazioni tra le colonie delle specie a confronto, a ciascuna delle quali viene assegnato un valore (Tabella 5). L'indice di antagonismo è calcolato mediante la formula:  $IA = \sum n \times i$ , dove  $n$  rappresenta la frequenza di ciascun tipo d'interazione e  $i$  il relativo valore.

Tabella 5. Tipo di interazione antagonistica in coltura duale (da Badalyan *et al.*, 2002).

<b>Tipo di interazione</b>	<b>Natura dell'interazione</b>	<b>Valore</b>
A	Arresto della crescita delle colonie per contatto con reciproca inibizione	1
B	Arresto a distanza senza contatto miceliare	2
C	Crescita di una colonia sull'altra senza arresto iniziale	3
CA1	Parziale crescita di una colonia sull'altra dopo arresto per contatto	3,5
CA2	Completa crescita di una colonia sull'altra dopo arresto per contatto	4,5
CB1	Parziale crescita di una colonia sull'altra dopo arresto a distanza	4
CB2	Completa crescita di una colonia sull'altra dopo arresto a distanza	5



#### 4. OTTENIMENTO DEI FILTRATI E DEGLI ESTRATTI

Le 5 specie fungine che nelle prove di antagonismo in coltura duale hanno mostrato un'elevata capacità competitiva, sono state saggiate per la capacità di produrre *in vitro* metaboliti secondari (Figura 8).

Ciascun isolato fungino è stato allevato su tre differenti substrati: uno liquido (Figura 9) e due solidi. Il substrato liquido era costituito da: NaNO<sub>3</sub>, 3g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g; KCl, 0,5g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01g; estratto di lievito, 5g; malto 5g; saccarosio, 30g; 1000 ml di H<sub>2</sub>O; pH 5,9. 170 ml di substrato nutritivo è stato versato in bottiglie Roux da 1 l, sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 min e successivamente inoculato con 4 ml di una sospensione miceliare di ciascuna specie fungina.

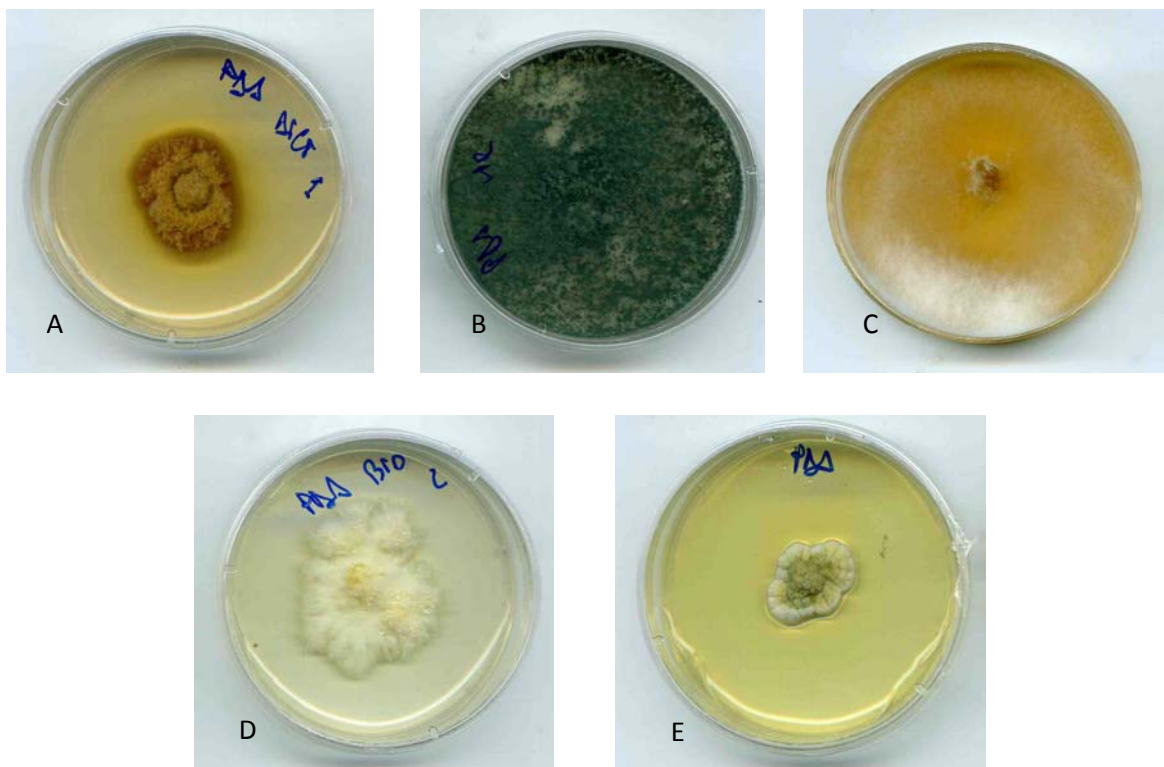


Figura 8. Aspetto delle colonie dei 5 funghi endofiti su PDA. A) *Dictyochaeta parva*; B) *Tricoderma viridescens*; C) *Tricoderma* sp.; D) *Bionectria ochroleuca*; E) *Penicillium* sp.

Per quanto riguarda i due substrati solidi, preparati in sacchetti autoclavabili da 6 l con tappo traspirante, il primo era costituito da 250 g di farro e 250 g di orzo (siglato O/F), e il secondo da 250 g di farro e 250 g di fagioli (siglato F/F).

Entrambi i substrati sono stati opportunamente addizionati con 10 g di foglie di castagno, di sughera e di tasso in funzione dell'ospite da cui sono stati isolati i 5 funghi endofiti. I vari substrati solidi sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 minuti e successivamente inoculati con 15 ml di una sospensione miceliare di ciascuna specie fungina.

Dopo 21-30 giorni di incubazione in termostato a 25°C, al buio, le colture liquide sono state filtrate su garza e il filtrato culturale ottenuto è stato conservato a -20°C fino al momento dell'estrazione. Analogamente anche le colture solide dopo 21-30 giorni di incubazione sono state conservate a -20°C.

Un'aliquota di ciascun filtrato culturale ottenuto dalle colture liquide è stato estratto esaustivamente con etile acetato dopo correzione del pH a 4. Una seconda aliquota è stata estratta allo stesso modo senza modificare il valore di pH.

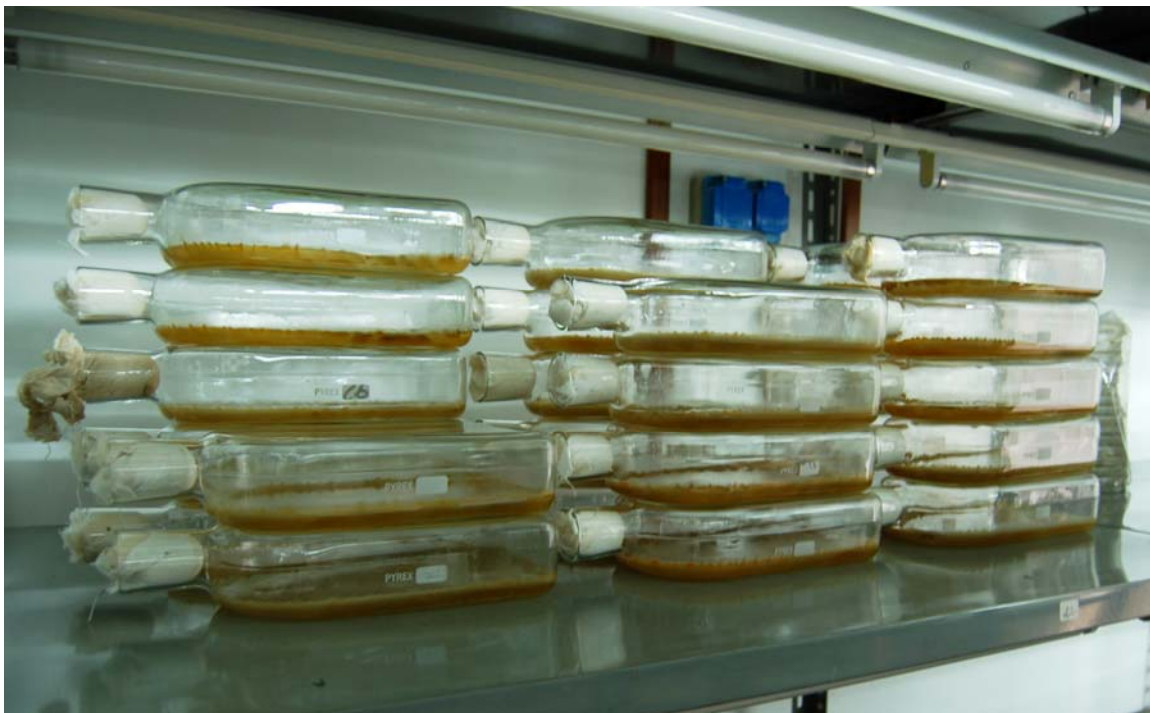


Figura 9. Bottiglie di Roux durante la fase di incubazione in termostato.

Le fasi organiche sono state combinate ed anidificate con solfato di sodio ( $\text{NaSO}_4$ ) anidro. Successivamente sono state filtrate su carta da filtro e concentrate a pressione ridotta in rotavapor a  $40^\circ\text{C}$ , ed infine pesate.

Le colture su substrato solido sono state omogeneizzate con metanolo ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) con un frullatore elettrico. L'omogenato è stato centrifugato a 12000 giri per 25 minuti in modo tale da separare il materiale solido. Il surnatante è stato filtrato su carta da filtro e concentrato in misura del 10-20% in rotavapor a  $40^\circ\text{C}$ . La soluzione idroalcolica così ottenuta è stata estratta inizialmente con esano e successivamente con diclorometano. L'estratto in diclorometano è stato anidificato con solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato in rotavapor a  $40^\circ\text{C}$  ed infine pesato.

## 5. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI COLTURALI

L'attività antifungina degli estratti organici è stata valutata nei confronti dei 4 funghi patogeni a tre differenti concentrazioni (6,25, 12,5 e 25 µg/µl). A tale scopo piastre Petri del diametro di 100 mm, contenenti 20 ml di PDA al 3%, sono state inoculate al centro con dischetti di micelio del diametro di 5 mm, prelevati dal margine di colonie madri di 4-7 giorni di età di ciascun fungo patogeno. Attorno a ciascun dischetto di inoculo sono stati applicati 20 µl di una soluzione metanolica di ciascun estratto organico. Le piastre di controllo sono state trattate con 20 µl di metanolo e acqua sterile. Le piastre sono state incubate a 25°C al buio per 3 giorni.

L'accrescimento diametrico delle colonie, è stato misurato quotidianamente per 3 giorni. L'inibizione percentuale dell'accrescimento miceliare è stata valutata secondo la formula:  $I = 100 \cdot (y-x)/y$ , dove  $y$  è il diametro medio delle colonie nelle tesi di controllo, e  $x$  corrisponde al diametro medio delle colonie nelle tesi trattate.

Le prove relative a ciascuna combinazione estratto-patogeno sono state allestite con tre replicazioni e ripetute 2 volte.

## 6. ATTIVITÀ ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI COLTURALI

L'attività zootossica degli estratti fungini è stata valutata su *Artemia salina*. A tal fine, le cisti di *A. salina* sono state schiuse circa 48 ore prima del saggio in una soluzione salina al 3,3% utilizzando una miscela commerciale di sali (Optium Sea) e acqua sterile. Successivamente, previa filtrazione con carta da filtro, la soluzione salina è stata versata in un apposito "schiuditoio" contenente le cisti e mantenuto in termostato a 25C° al buio.

Il saggio è stato allestito in piastre per colture cellulari con 24 pozzetti (Figura 10), contenenti ciascuno 20-40 nauplii di *A. salina* in 500 µl di soluzione salina a cui è stato addizionato l'estratto metanolico (1%) di ciascun endofita a 4 differenti concentrazioni (125, 250, 500 e 1000 µg/ml). Le tesi di controllo sono state allestite con metanolo (1%) e la soluzione salina.

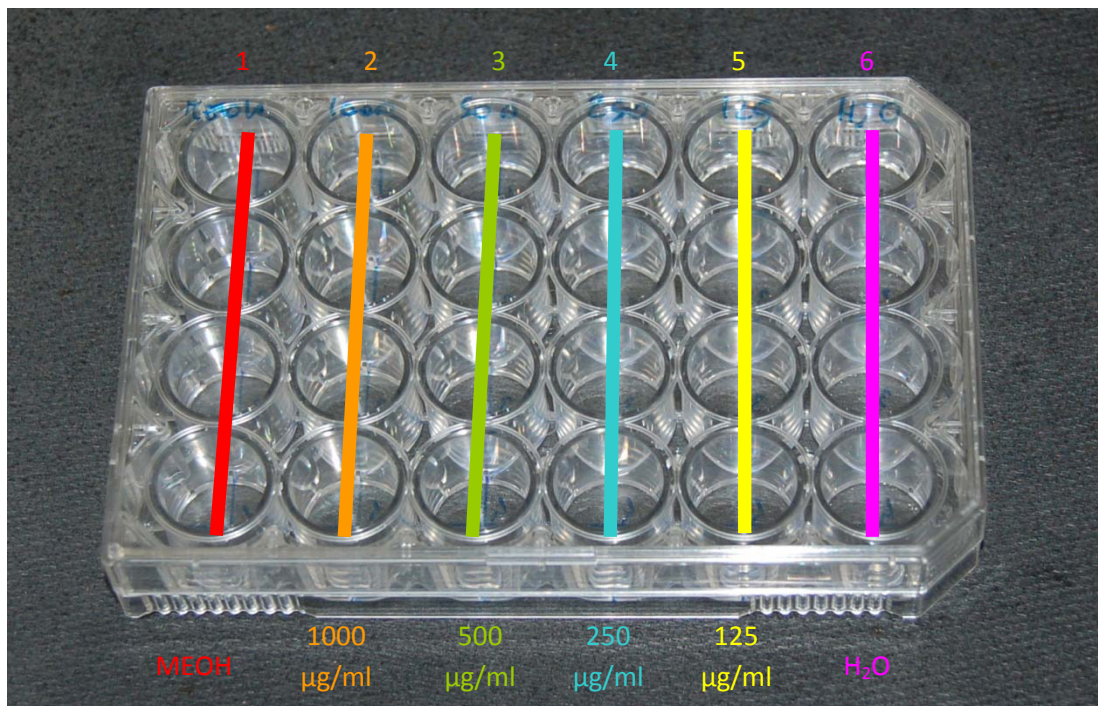


Figura 10. Schema di trattamento delle piastre a 24 pozzetti. MEOH = tesi di controllo con metanolo; 1000, 500, 250 e 125µg/ml = concentrazione dell'estratto metabolico nel set di pozzetti; H<sub>2</sub>O = tesi di controllo con soluzione salina pura.

Le piastre sono state poste ad incubare a 25°C al buio per 24 e 36 ore. L'attività zootossica è stata valutata rilevando allo stereomicroscopio il numero di larve morte rispetto al totale delle larve presenti in ogni pozzetto, dopo aver mantenuto le piastre in freezer a -20°C per 12 ore. I saggi sono stati ripetuti 2 volte.

## 7. ANALISI STATISTICA

Tutti i valori relativi alla percentuale di mortalità di *A. salina* sono stati corretti con la formula di Abbott prima di essere elaborati statisticamente. I dati espressi in forma percentuale, prima dell'elaborazione statistica, sono stati trasformati in valori angolari. I dati relativi all'attività antifungina e zootossica degli estratti colturali sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) e le medie comparate con il test di confronto multiplo (LSD) verificando la significatività per  $P \leq 0,05$ . I dati sono stati elaborati utilizzando il programma XLSTAT-2008 (Addinsoft, USA).

## RISULTATI

### 1. FUNGHI ISOLATI

Dagli isolamenti effettuati sono state ottenute complessivamente 555 colonie appartenenti a 74 specie fungine. Di queste, 36 non hanno differenziato strutture riproduttive su PDA e pertanto sono state riportate come morfospecie di miceli sterili. Più in particolare:

- dai campioni di castagno si sono sviluppate 31 colonie appartenenti a 2 specie: *Cryphonectria parasitica* (27 colonie) e *Trichoderma viridescens* (4 colonie). L'identificazione degli isolati di quest'ultima specie, utilizzata per le prove di antagonismo, è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS (ITS1 e ITS2) dell'rDNA. Esse mostravano il 99-100% di similarità con le sequenze di *T. viridescens* depositate in GenBank, comprese quelle dell'epitipo e del neotipo di questa specie (numero di accesso GenBank: DQ677651 e AF456922) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- dai tessuti legnosi di quercia da sughero si sono sviluppate 53 colonie appartenenti a 23 specie. Una di queste, utilizzata nelle prove di antagonismo, è stata identificata come *Bionectria ochroleuca* sia su base morfologica che molecolare (99% di similarità con sequenze rappresentative di *B. ochroleuca* depositate in GenBank). Le altre specie sono state identificate su base morfologica: 6 a livello di genere (*Cytospora* sp., *Fusarium* sp., *Fusicoccum* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp. e *Rhizopus* sp.) e 9 a livello di classe (ascomiceti); le restanti erano costituite da morfospecie di miceli sterili.
- dalle ghiande di quercia da sughero si sono sviluppate 331 colonie appartenenti a 26 specie differenti sotto il profilo morfologico. Tre di queste sono state identificate come *Botrytis cinerea*, *Discula quercina* e *Dictyochaeta parva*. Per quest'ultima in particolare, utilizzata per le prove di antagonismo, l'esame delle regioni ITS non si è dimostrato uno strumento tassonomico informativo, in



quanto finora non risultano depositate sequenze nucleotidiche di questo fungo nelle principali banche dati di DNA online (GenBank, DDBJ, EMBL). Pertanto, la sua identificazione è stata effettuata seguendo le chiavi dicotomiche proposte da Kuthubutheen e Nawawi (1991). Le altre specie sono state identificate: 3 a livello di genere (*Cytospora* sp., *Coryneum* sp. e *Penicillium* sp.) e 2 a livello di classe (ascomiceti); le restanti 18 erano costituite da morfospesie di miceli sterili.

- dai campioni di tasso si sono sviluppate 140 colonie appartenenti a 23 specie: 7 sono state identificate su base morfologica a livello di genere (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Dothiorella*, *Nodulisporium*, *Penicillium*, *Phoma* e *Trichoderma*), e 5 a livello di classe (ascomiceti); le restanti 11 erano costituite da morfospesie di miceli sterili.

## 2. ATTIVITÀ ANTAGONISTICA IN COLTURA DUALE

I 16 endofiti saggiati hanno mostrato una differente capacità competitiva nei confronti dei 4 patogeni presi in esame (Tabella 6). Solo 5 di essi hanno limitato e/o inibito lo sviluppo miceliare di tutti i patogeni, attraverso differenti meccanismi d'azione.

Tabella 6. Tipo di interazione antagonistica in coltura duale tra le 16 specie fungine endofitiche e i 4 funghi patogeni.

Endofiti	Patogeni				IA**
	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Discula quercina</i>	
<i>Alternaria</i> sp.	CA2*	B	B	B	6
<i>Bionectria ochroleuca</i>	CA1	CA1	CB1	CA1	14,5
<i>Dictyochaeta parva</i>	B	B	B	B	8
<i>Dothiorella</i> sp.	CA2*	A	A	A	3
<i>Fusarium</i> sp. 1	CA2*	A	A	C	5
<i>Fusarium</i> sp. 2	CB2*	A	B	B	5
<i>Penicillium</i> sp.	B	B	B	B	8
<i>Phoma</i> sp.	CB2*	CB2*	A	B	3
<i>Trichoderma viridescens</i>	CB2	CB2	CB2	CB2	20
<i>Trichoderma</i> sp.	CB2	CB2	CB2	CB2	20
Ifomicete non identificato	CA2*	B	A	C	6
Micelio sterile (a)	CB2*	A	A	A	3
Micelio sterile (b)	CA1*	CA1*	A	A	2
Micelio sterile (c)	CA2*	CA1*	C*	C*	0
Micelio sterile (d)	CA2*	A	A	A	3
Micelio sterile (e)	CA2*	CA1*	A	A	2

\*) Sovracrescita delle ife del patogeno su quelle dell'endofita.

\*\*\*) IA = indice di antagonismo.

In particolare, *Bionectria ochroleuca* ha mostrato un'azione antagonistica prevalentemente di tipo parassitario contro tutti e 4 i patogeni. L'azione parassitaria nei confronti di *Biscogniauxia mediterranea*, *Cryphonectria parasitica* e *Discula quercina* è stata esplicitata dopo il blocco delle ife dei patogeni per contatto tra i due miceli, mentre nei confronti di *Diplodia corticola* in seguito all'arresto delle ife a distanza (Tabella 6) e (Figura 11).

*D. parva* e *Penicillium* sp. hanno inibito lo sviluppo dei 4 patogeni attraverso la produzione di metaboliti secondari diffusibili che ne hanno bloccato le ife a distanza (Tabella 6) e (Figura 11).

*Trichoderma* sp. e *T. viridescens* hanno mostrato una spiccata attività antagonistica, mediata da meccanismi diversi: a) produzione di metaboliti secondari diffusibili capaci di inibire lo sviluppo dei patogeni a distanza; b) competizione per lo spazio e le sostanze nutritive; c) micoparassitizzazione delle ife dei patogeni (Tabella 6) e (Figura 11).

Sulla base del tipo di interazioni antagonistiche osservate nelle prove in coltura duale le due specie di *Trichoderma* sono risultate quelle maggiormente competitive nei confronti dei 4 patogeni saggiati raggiungendo il più elevato valore di IA (Tabella 6).

Le altre 11 specie endofitiche saggiate hanno evidenziato una limitata capacità competitiva, spesso inferiore a quella dei patogeni; tra questi, *B. mediterranea* ha mostrato di competere attivamente attraverso differenti meccanismi d'azione, limitando e/o inibendo lo sviluppo miceliare degli endofiti.

Sulla base del tipo di interazione riscontrata è plausibile ipotizzare la produzione di metaboliti secondari con attività antifungina da parte di *B. mediterranea*. D'altronde è nota la capacità di questo fungo di produrre acido fenilacetico (Evidente *et al.*, 2005), una fitotossina per la quale è stata accertata di recente anche un'attività antifungina (Hwang *et al.*, 2001).

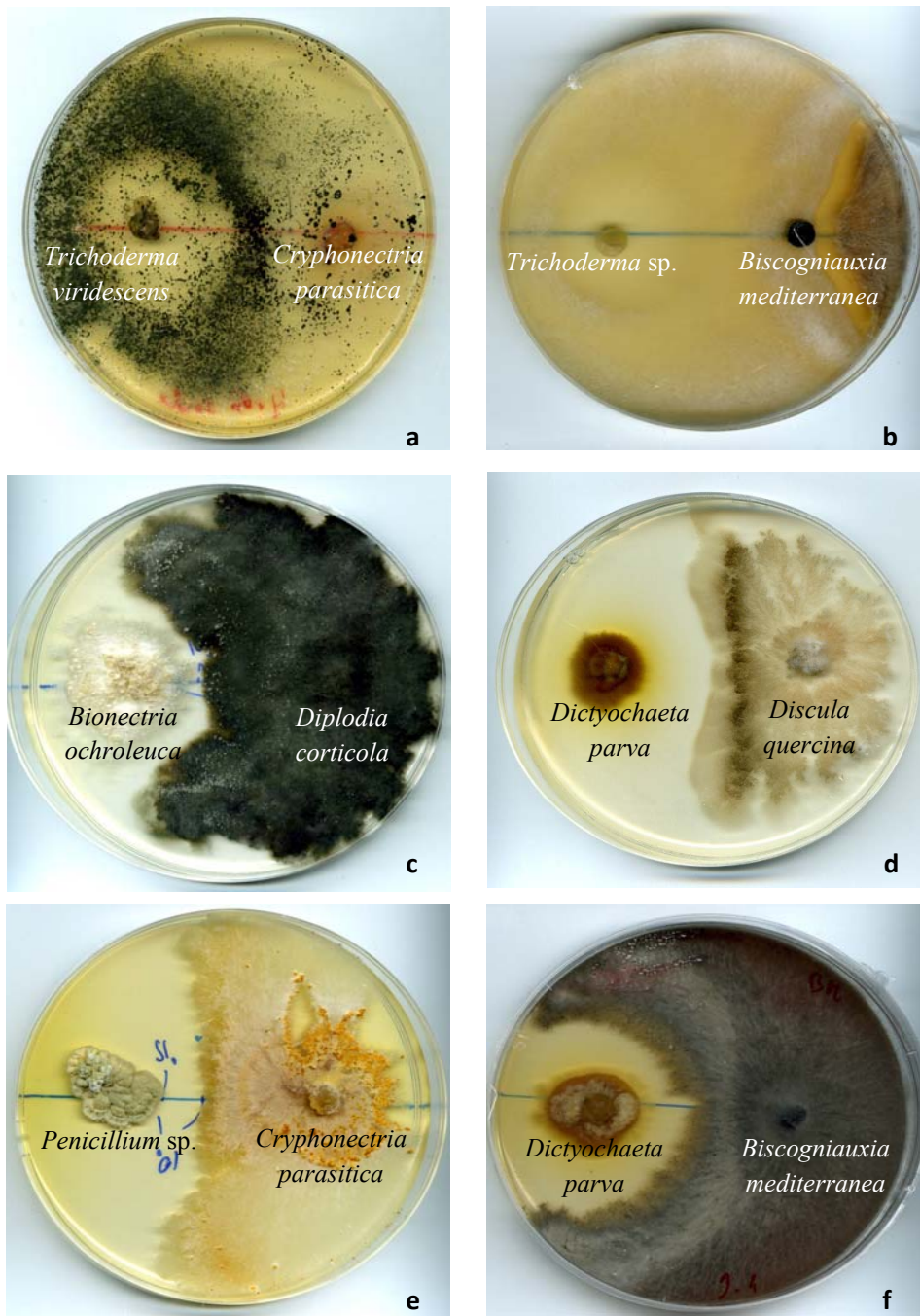


Figura 11. Tipo di interazioni antagonistiche tra i 5 endofiti e i 4 patogeni: a, b) CB2; c) CB1; d,e,f) B. Secondo la classificazione proposta da Badalyan *et al.* (2002).

### 3. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI *BIONECTRIA OCHROLEUCA*

#### *Attività antifungina*

Gli estratti organici ottenuti dalle colture di *B. ochroleuca* hanno mostrato una elevata attività antifungina soprattutto nei confronti di *D. quercina*. In particolare, gli estratti ottenuti dalle 2 colture solide e da quella liquida a pH 8,71 hanno inibito completamente l'accrescimento miceliare di *D. quercina* a tutte le concentrazioni. Mentre l'estratto ottenuto dal filtrato colturale acidificato ha inibito la crescita del patogeno con valori percentuali compresi tra il 70 e l'83%.

Tabella 7. Inibizione (%) della crescita miceliare dei 4 patogeni fungini causata dagli estratti organici di *Bionectria ochroleuca* ottenuti dal substrato liquido e dai substrati solidi di orzo/farro (OF) e farro/fagioli (FF), a 3 differenti concentrazioni di saggio.

Substrato	Concentrazione (µg/µl)	Patogeni			
		<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Discula quercina</i>
Liquido pH 8,71	6,25	74 cd*	66 bc	22 abc	100 a
	12,5	88 bc	72 b	31 ab	100 a
	25	98 a	91 a	35 a	100 a
Liquido pH 4	6,25	77 bc	36 f	7 c	70 c
	12,5	97 a	48 e	15 bc	77 b
	25	100 a	54 de	15 abc	83 b
OF	6,25	62 de	46 ef	12 bc	100 a
	12,5	91 ab	55 cde	17 abc	100 a
	25	100 a	63 bcd	21 abc	100 a
FF	6,25	12 g	14 h	11 bc	100 a
	12,5	40 f	19 gh	10 c	100 a
	25	52 ef	26 g	13 abc	100 a

\*) I valori in colonna contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per P < 0,05.

Nei confronti di *B. mediterranea* e *C. parasitica* l'attività antifungina degli estratti ha variato in funzione del substrato e della concentrazione. Su entrambi i patogeni l'estratto ottenuto dalla coltura solida allestita con farro e fagioli ha mostrato un'attività antifungina statisticamente minore rispetto a quella degli altri tre estratti. Mentre nei confronti di *D. corticola* l'attività antifungina di tutti gli estratti è risultata blanda (<35%) a tutte le concentrazioni saggate (Figura 12).

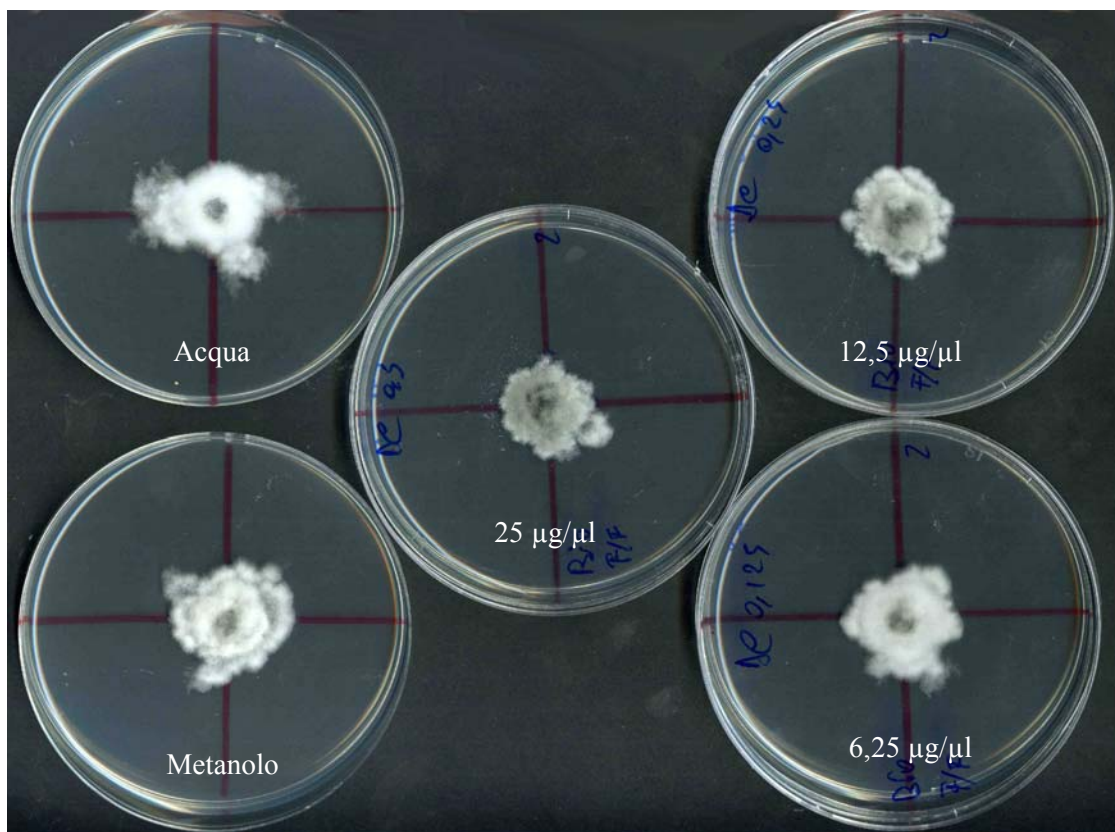


Figura 12. Effetto dell'estratto organico ottenuto dalla coltura liquida (pH 8,71) di *Bionectria ochroleuca* a concentrazioni crescenti (25, 12,5 e 6,25 µg/µl) sull'accrescimento diametrale delle colonie di *Diplodia corticola*.

## Attività zootossica

Tutti gli estratti di *B. ochroleuca* sono risultati particolarmente attivi nei confronti di *A. salina* con percentuali di mortalità superiori al 93% alle concentrazioni di 1000 e 500 µg/ml (Figura 13). Valori di mortalità ancora elevati (>50%) sono stati rilevati alle due concentrazioni più basse con tutti gli estratti, ad eccezione di quello ottenuto dal filtrato colturale acidificato a pH 4. Quest'ultimo, alla concentrazione di 125 µg/ml, ha determinato una percentuale di mortalità del 29,5%.

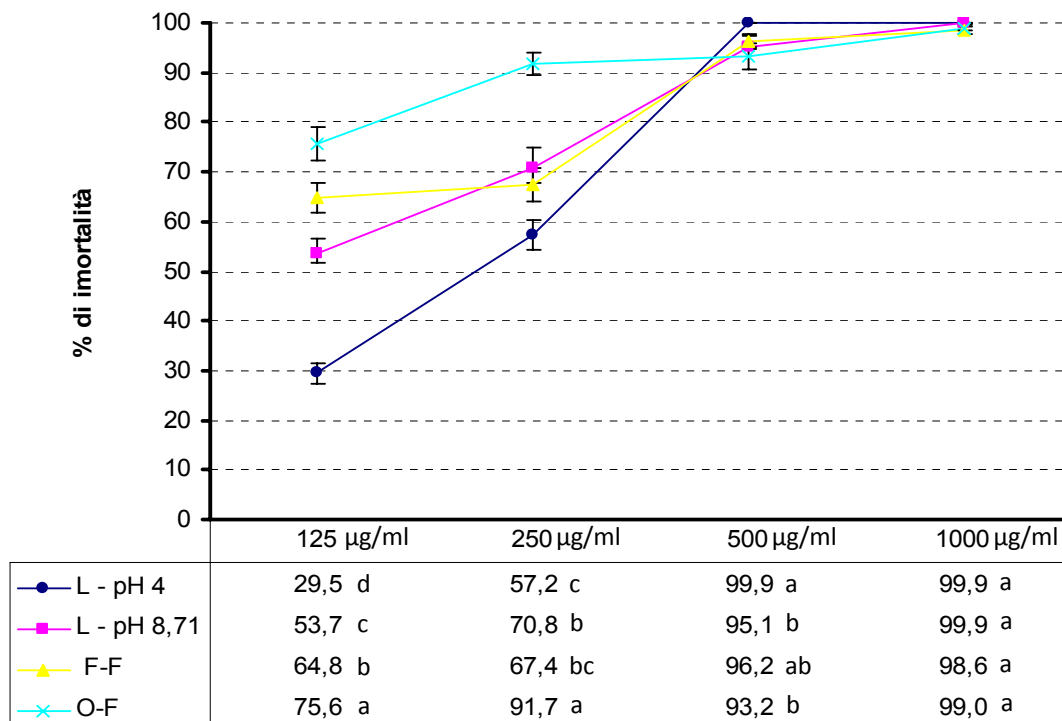


Figura 13. Percentuale di mortalità delle larve di *Artemia salina* determinata dagli estratti organici di *B. ochroleuca* alle differenti concentrazioni. I valori di mortalità contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per  $P < 0,05$ .

#### 4. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI *DICTYOCHAETA PARVA*

##### *Attività antifungina*

Gli estratti organici ottenuti sia da colture solide che liquide di *D. parva* hanno mostrato una spiccata attività antifungina nei confronti di tutte le specie patogene saggate (Tabella 8) (Figura 14).

Tabella 8. Inibizione (%) della crescita miceliare dei 4 patogeni fungini causata dagli estratti organici di *Dictyochaeta parva* ottenuti dal substrato liquido e dai substrati solidi di orzo/farro (OF) e farro/fagioli (FF), a 3 differenti concentrazioni di saggio.

Substrato	Concentrazione (µg/µl)	Patogeni			
		<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Discula quercina</i>
Liquido pH 7,35	6,25	100a*	100a	100a	45c
	12,5	100a	100a	100a	63b
	25	100a	100a	100a	66b
Liquido pH 4,11	6,25	50c	18d	36c	14e
	12,5	98b	30c	35c	23d
	25	100a	49b	60b	30d
OF	6,25	100a	100a	100a	100a
	12,5	100a	100a	100a	100a
	25	100a	100a	100a	100a
FF	6,25	100a	100a	100a	100a
	12,5	100a	100a	100a	100a
	25	100a	100a	100a	100a

\*) I valori in colonna contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per  $P < 0,05$ .

In particolare, gli estratti di entrambe le colture solide hanno mostrato un'attività inibitoria del 100% su tutti i patogeni e a tutte le concentrazioni di saggio. Analoghi risultati, fatta eccezione per *D. quercina*, sono stati ottenuti anche con l'estratto organico del filtrato colturale non acidificato. In questo caso la percentuale d'inibizione è risultata inferiore al 70% alla concentrazione più elevata



di 25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Un minore effetto inibente è stato osservato con l'estratto organico ottenuto dal filtrato colturale acidificato a pH 4. Infatti, ad eccezione di *B. mediterranea* (inibizione > 50% a tutte le concentrazioni), l'attività inibitoria è risultata inferiore al 50% per tutti gli altri patogeni. Sulla base di tali dati, è ragionevole supporre che l'acidificazione del filtrato colturale non migliora l'efficienza di estrazione dei metaboliti attivi.

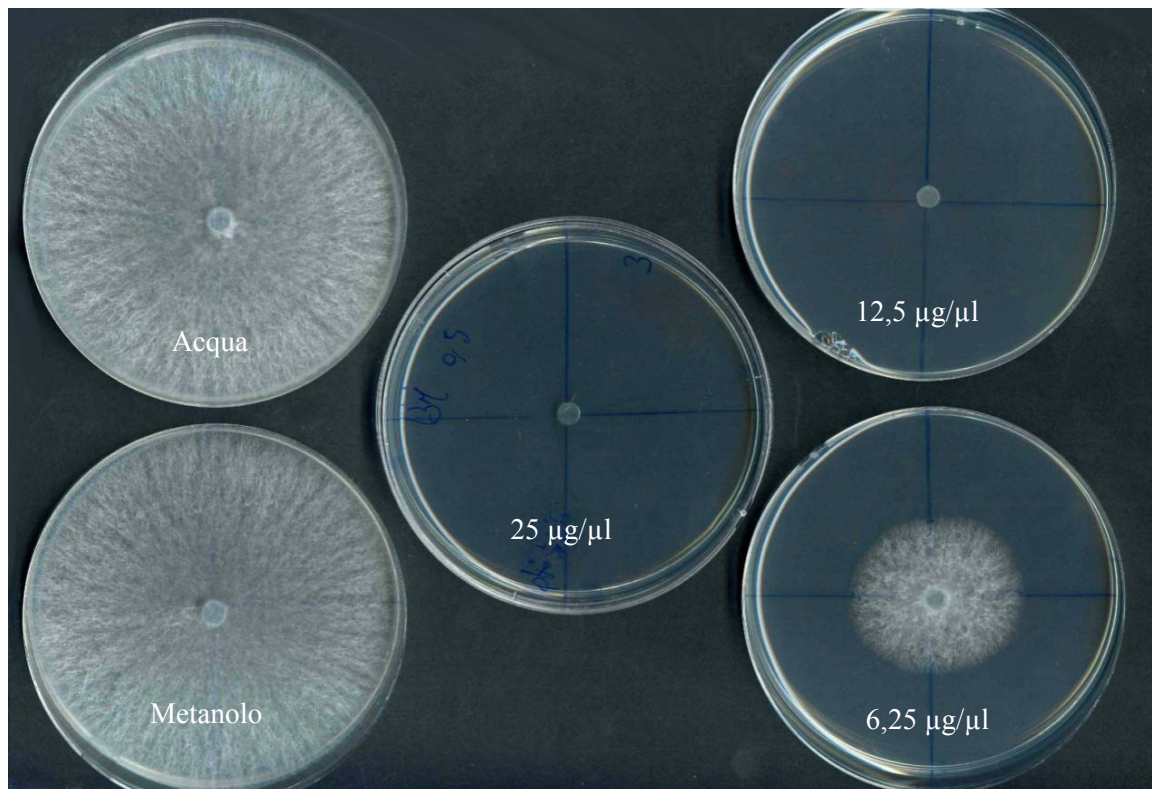


Figura 14. Effetto dell'estratto organico ottenuto dalla coltura liquida (acidificata a pH 4,11) di *Dictyochaeta parva* a concentrazioni crescenti (25, 12,5 e 6,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) sull'accrescimento diametrico delle colonie di *Biscogniauxia mediterranea*.

## Attività zootossica

La percentuale di mortalità larvale causata dagli estratti organici è risultata particolarmente elevata (>80%) alle concentrazioni di 250, 500 e 1000 µg/ml. Fa eccezione l'estratto ottenuto da orzo e farro che ha mostrato un'attività inferiore al 50% anche alla concentrazione più elevata di 1000 µg/ml (Figura 15).

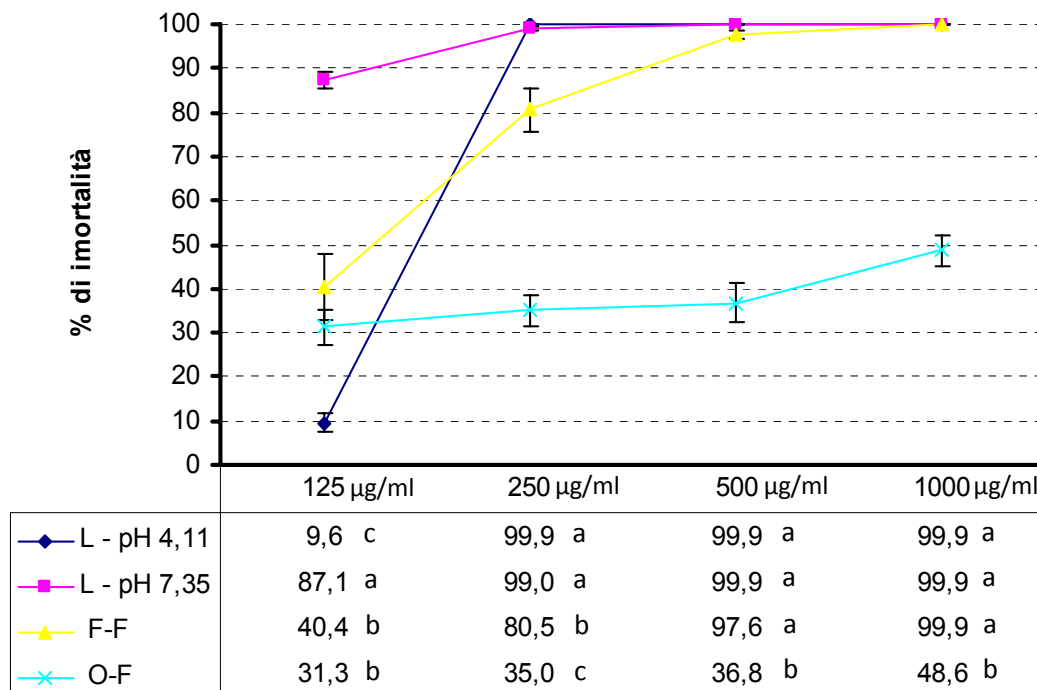


Figura 15. Percentuale di mortalità delle larve di *Artemia salina* determinata dagli estratti organici di *Dictyochaeta parva* alle differenti concentrazioni. I valori di mortalità contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per  $P < 0,05$ .

Alla concentrazione più bassa (125 µg/ml), solo l'estratto ottenuto dal filtrato colturale non acidificato ha causato una mortalità larvale elevata (>70%).

A tale concentrazione, gli estratti di entrambe le colture solide hanno evidenziato un'attività decisamente inferiore (mortalità del 50%). L'estratto ottenuto dal filtrato colturale acidificato ha causato solo una mortalità del 10%.

Come osservato per l'attività antifungina, anche l'attività zootossica si riduce sensibilmente a seguito dell'acidificazione del filtrato colturale.

## 5. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI *PENICILLIUM* SP.

### *Attività antifungina*

Come si evince dai risultati riportati nella Tabella 9, *B. mediterranea* è risultata la specie maggiormente sensibile all'azione degli estratti organici ottenuti dalle colture di *Penicillium* sp., con valori di inibizione compresi tra l'80 e il 100%.

Alla concentrazione più bassa è stato osservato un effetto inibitorio ancora elevato (>50%) solo con l'estratto sia del filtrato colturale non acidificato, sia del substrato solido allestito con farro e fagioli (82 e 62%, rispettivamente).

Tabella 9. Inibizione (%) della crescita miceliare dei 4 patogeni fungini causata dagli estratti organici di *Penicillium* sp. ottenuti dal substrato liquido e dai substrati solidi di orzo/farro (OF) e farro/fagioli (FF), a 3 differenti concentrazioni di saggio.

Substrato	Concentrazione (µg/µl)	Patogeni			
		<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Discula quercina</i>
Liquido pH 7,35	6,25	82cd	42cd	23bcd	16de
	12,5	100a	58c	30abc	28bcde
	25	100a	90a	42a	78a
Liquido pH 4,04	6,25	47f	25de	11def	21cde
	12,5	96ab	40cd	11def	46b
	25	100a	77b	17cde	71a
OF	6,25	35f	6f	16def	24cde
	12,5	81d	11f	18de	36bcd
	25	89bcd	16ef	36ab	43bc
FF	6,25	62e	11ef	6f	12e
	12,5	95abc	14ef	10ef	15d
	25	96ab	34d	12def	22cde

\*) I valori in colonna contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per  $P < 0,05$ .

Su *D. quercina* e *C. parasitica* solo gli estratti organici ottenuti dal filtrato colturale della coltura liquida hanno causato un'inibizione superiore al 50%, alla concentrazione più elevata (Figura 16).

*D. corticola* è risultata la specie meno sensibile con percentuali di inibizione sempre inferiori al 50%.

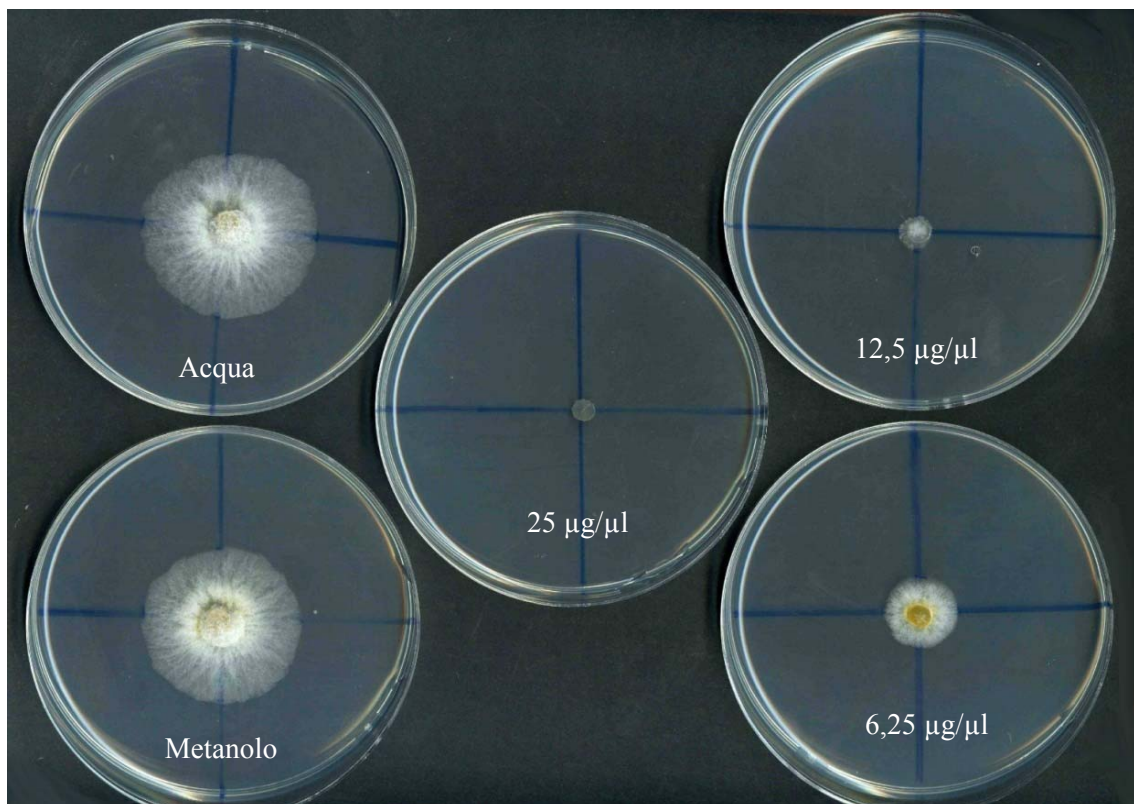


Figura 16. Effetto dell'estratto organico ottenuto dalla coltura liquida (pH 7,35) di *Penicillium* sp., a concentrazioni crescenti (25, 12,5 e 6,25 µg/µl), sull'accrescimento diametrico delle colonie di *Cryphonectria parasitica*.

## Attività zootossica

Gli estratti organici di *Penicillium* sp. hanno causato percentuali di mortalità superiori al 70% solo alle concentrazioni di 500 e 1000µg/ml. Mentre alla concentrazione di 125 µg/ml solo l'estratto del filtrato colturale non acidificato ha causato una percentuale di mortalità superiore al 30%.

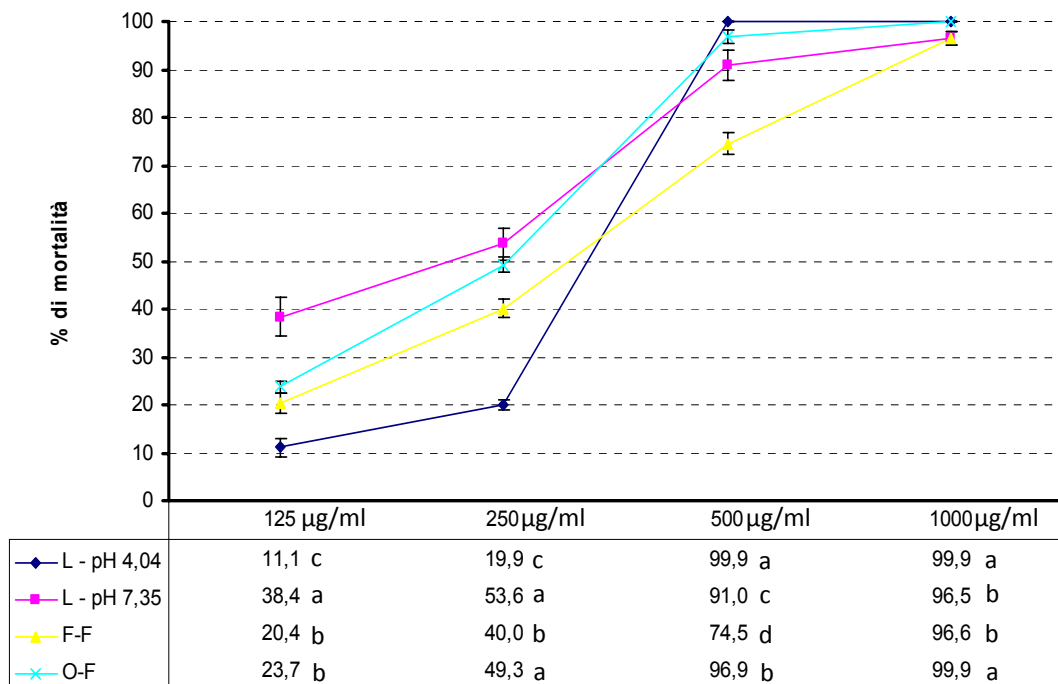


Figura 17. Percentuale di mortalità delle larve di *Artemia salina* determinata dagli estratti organici di *Penicillium* sp. alle differenti concentrazioni. I valori di mortalità contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per  $P < 0,05$ .

## 6 ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI *TRICHODERMA VIRIDESCENS*

### *Attività antifungina*

*B. mediterranea* è risultata la specie maggiormente sensibile all'azione degli estratti di *T. viridescens*. Tutti gli estratti hanno mostrato un effetto inibitorio marcato nei confronti di questo patogeno anche alla concentrazione più bassa di trattamento.

Tabella 10. Inibizione (%) della crescita miceliare dei 4 patogeni fungini causata dagli estratti organici di *Trichoderma viridescens* ottenuti dal substrato liquido e dai substrati solidi di orzo/farro (OF) e farro/fagioli (FF), a 3 differenti concentrazioni di saggio.

Substrato	Concentrazione (µg/µl)	Patogeni			
		<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Discula quercina</i>
Liquido pH 6	6,25	70cd	32d	23ef	30d
	12,5	93ab	48c	42abc	52bc
	25	99a	65a	51a	85a
Liquido pH 3,88	6,25	60d	21e	16f	16e
	12,5	79c	36d	25ef	34d
	25	98a	54bc	37bcd	61b
OF	6,25	80c	35d	30bcde	48c
	12,5	90b	53bc	42abc	52bc
	25	94ab	54bc	43ab	58bc
FF	6,25	98a	56b	28de	58bc
	12,5	99a	52bc	31cde	59bc
	25	97a	60ab	29de	64b

\*) I valori in colonna contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per  $P < 0,05$ .

*D. quercina* e *C. parasitica* sono risultate meno sensibili all'azione degli estratti organici rispetto a *B. mediterranea*; la percentuale di inibizione è stata superiore al 50% solo alle concentrazioni più elevate (Figura 18).

*D. corticola* è risultata la specie meno sensibile all'azione degli estratti, con percentuali di inibizione inferiori al 50%. Solo con l'estratto del filtrato colturale non acidificato e alla concentrazione più elevata di trattamento sono state registrate percentuali di inibizione di poco superiori al 50%.

Anche in questo caso l'acidificazione dei filtrati colturali prima dell'estrazione determina una riduzione dell'attività antifungina degli estratti.

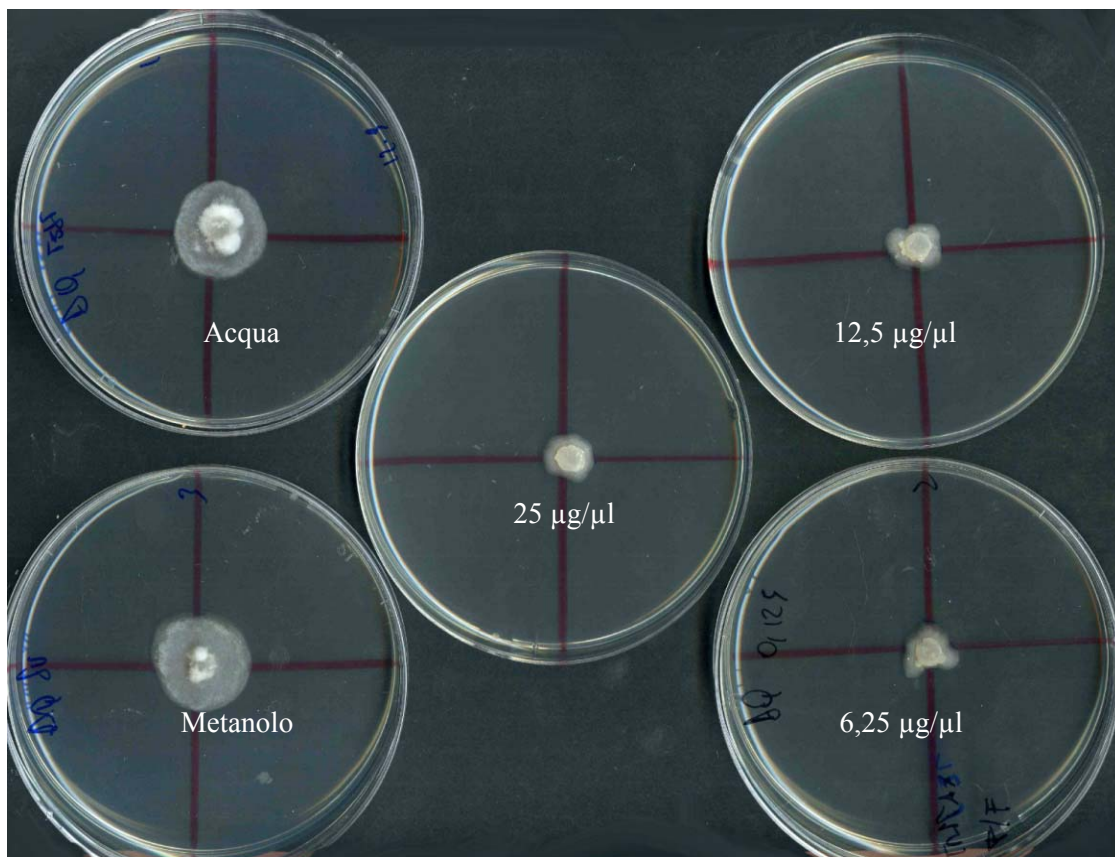


Figura 18. Effetto dell'estratto organico ottenuto dalla coltura solida (farro/fagioli) di *Trichoderma viridescens*, a concentrazioni crescenti (25, 12,5 e 6,25 µg/µl) sull'accrescimento diametrico delle colonie di *Discula quercina*.

## Attività zootossica

Tutti gli estratti organici di *T. viridescens* hanno mostrato un'elevata tossicità alle concentrazioni di saggio di 250, 500, 1000 µg/ml con percentuali di mortalità comprese tra 76,2% e 99,9%.

Alla concentrazione di trattamento inferiore (125 µg/ml) solo gli estratti organici ottenuti dalle due colture solide hanno determinato percentuali di mortalità superiori al 50%.

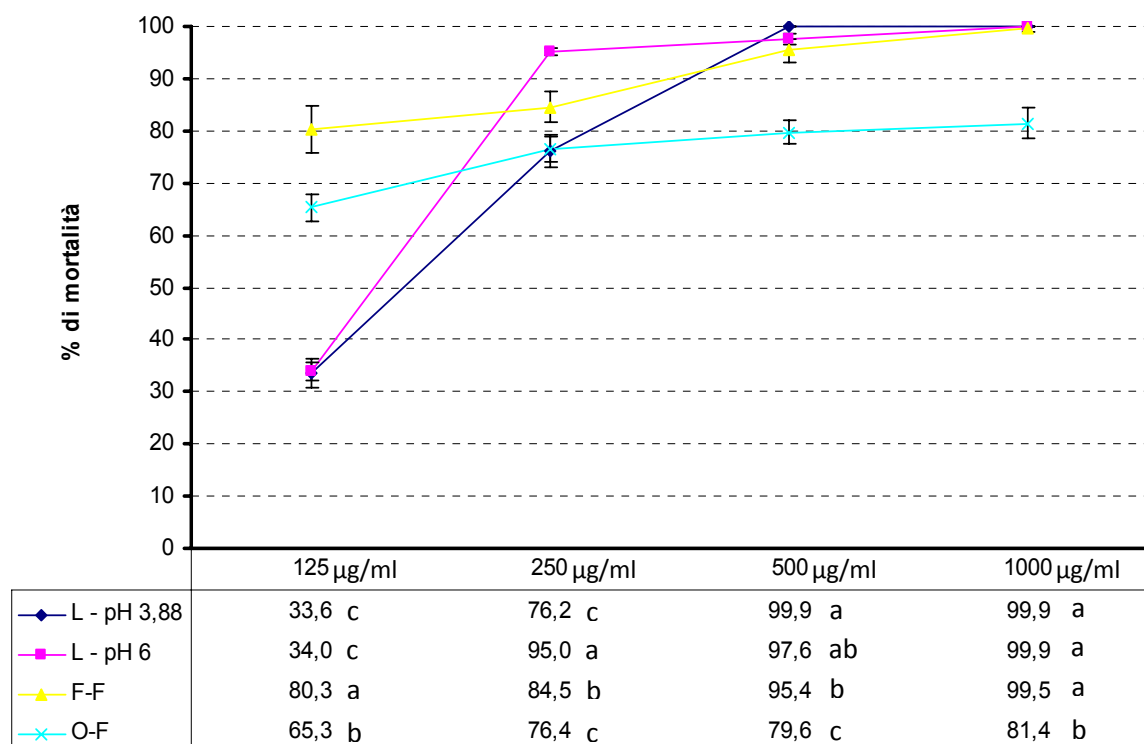


Figura 19. Percentuale di mortalità delle larve di *Artemia salina* determinata dagli estratti organici di *Trichoderma viridescens* alle differenti concentrazioni. I valori di mortalità contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per  $P < 0,05$ .



## 7. ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E ZOOTOSSICA DEGLI ESTRATTI ORGANICI DI *TRICHODERMA* SP.

### *Attività antifungina*

Gli estratti organici di *Trichoderma* sp. hanno mostrato complessivamente una moderata attività antifungina nei confronti di tutti i patogeni saggiati (Tabella 11).

Tabella 11. Inibizione (%) della crescita miceliare dei 4 patogeni fungini causata dagli estratti organici di *Trichoderma* sp. ottenuti dal substrato liquido e dai substrati solidi di orzo/farro (OF) e farro/fagioli (FF), a 3 differenti concentrazioni di saggio.

Substrato	Concentrazione ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Patogeni			
		<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Discula quercina</i>
Liquido pH 5,34	6,25	51de	23cd	11cd	13efg
	12,5	90b	40b	20b	27bc
	25	100a	60a	43a	63a
Liquido pH 3	6,25	31g	16de	2d	7g
	12,5	73c	25c	19bc	12fg
	25	100a	40b	24b	25bcd
OF	6,25	34fg	3g	0e	21cde
	12,5	46ef	9f	0e	27bc
	25	63cd	11ef	0e	33b
FF	6,25	21g	2g	0e	12fg
	12,5	21g	5g	0e	17def
	25	34fg	11ef	0e	24bcd

\*) I valori in colonna contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per  $P < 0,05$ .

Anche in questo caso *B. mediterranea* è risultata la specie più sensibile all'azione degli estratti. In particolare, l'estratto ottenuto dal filtrato colturale non acidificato ha determinato un'inibizione superiore al 50% anche alla concentrazione più bassa, mentre quello ottenuto dalla coltura solida di farro e

fagioli (OF) ha inibito lo sviluppo di *B. mediterranea* in modo statisticamente inferiore agli altri substrati.

Su *C. parasitica* e *D. quercina* valori di inibizione statisticamente più elevati sono stati osservati con gli estratti organici della coltura liquida a pH 5,34, mentre l'effetto degli estratti organici della coltura liquida acidificati è stato molto debole (Figura 20).

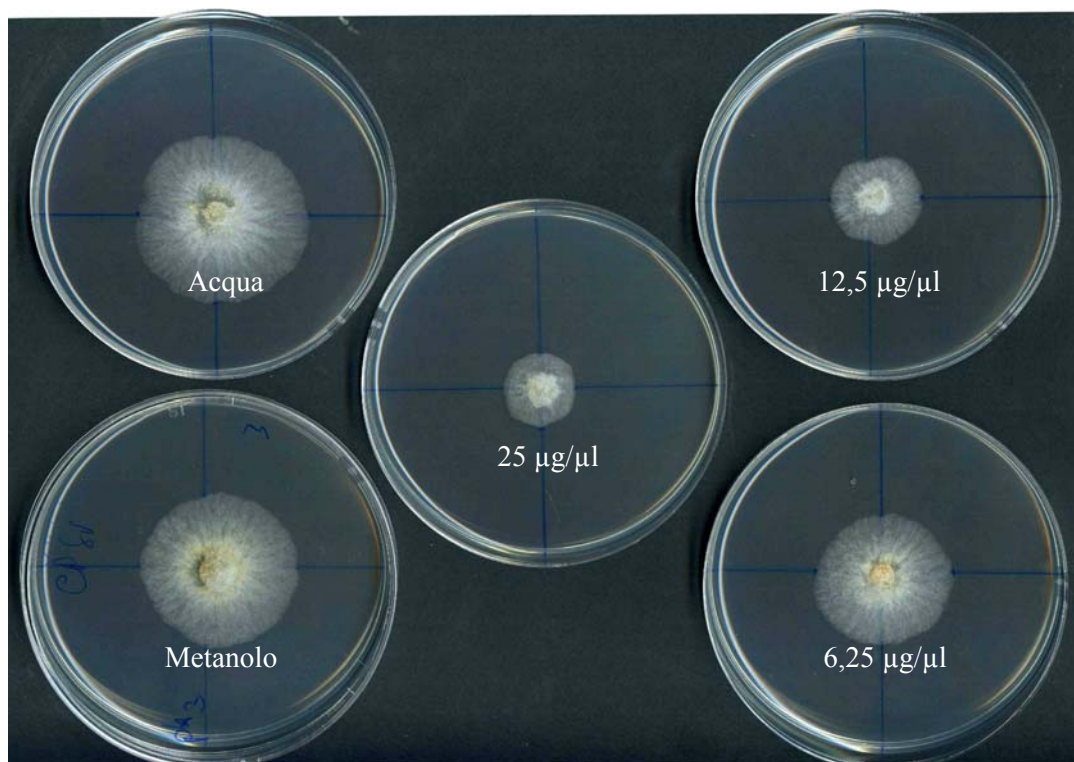


Figura 20. Effetto dell'estratto organico ottenuto dalla coltura liquida (acidificati a pH 3) di *Trichoderma* sp., a concentrazioni crescenti (25, 12,5 e 6,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), sull'accrescimento diametrico delle colonie di *Cryphonectria parasitica*.

Su *D. corticola* solo gli estratti della coltura liquida hanno influito negativamente sullo sviluppo delle colonie del patogeno. Gli estratti ottenuti dalle colture solide sono risultati completamente inefficaci su questo fungo.

Questi risultati evidenziano una marcata influenza del substrato sulla produzione di metaboliti secondari bioattivi da parte di questo fungo che, nei saggi

in coltura duale, aveva mostrato di possedere una forte attività competitiva mediata dalla diffusione di metaboliti secondari.

### Attività zootossica

Gli estratti di *Trichoderma* sp. alle concentrazioni di 250, 500 e 1000 µg/ml hanno mostrato tossicità elevata (>60%) (Figura 21).

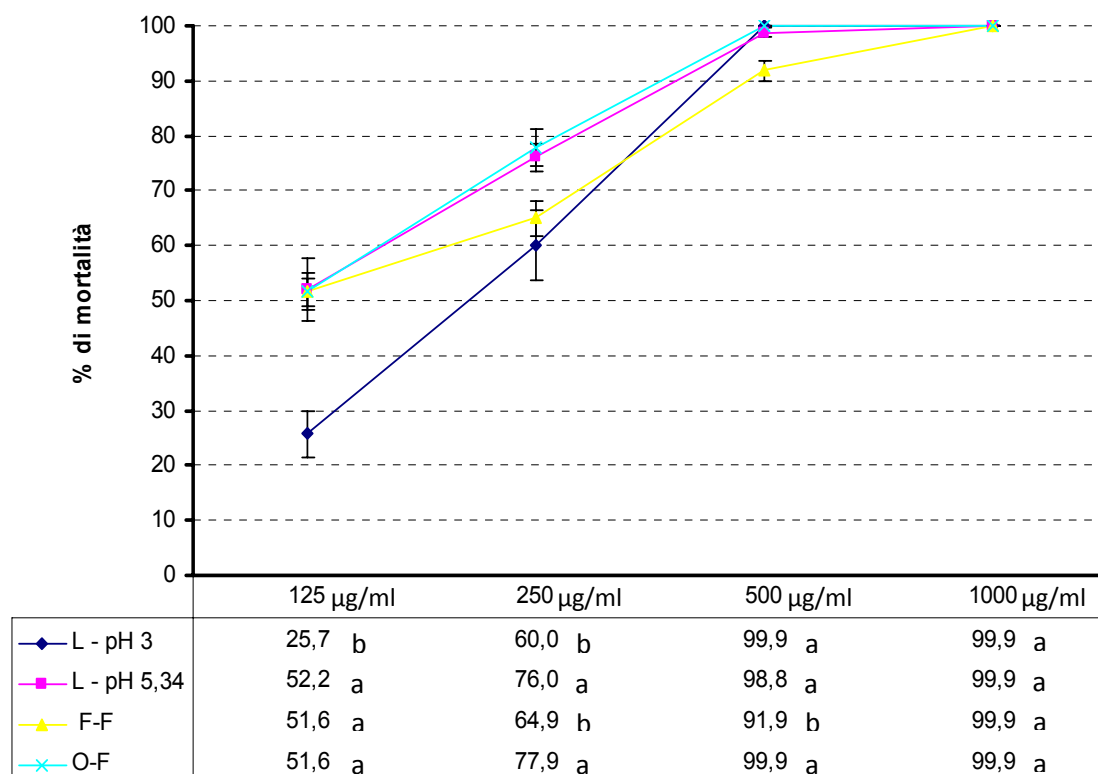


Figura 21. Percentuale di mortalità delle larve di *Artemia salina* determinata dagli estratti organici di *Trichoderma* sp. alle differenti concentrazioni. I valori di mortalità contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente al test (LSD) per  $P < 0,05$ .

Alla concentrazione più alta tutti gli estratti hanno causato una mortalità del 99,9%.

Alla concentrazione di 125 µg/ml tutti gli estratti, ad eccezione del filtrato colturale acidificato, hanno causato una mortalità superiore al 50%. Il filtrato colturale acidificato (pH 3) ha causato una mortalità del 25,7% statisticamente inferiore a quella degli altri estratti.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I numerosi isolamenti effettuati da campioni sintomatici e asintomatici prelevati da piante di castagno, quercia da sughero e tasso – specie tipiche della vegetazione forestale mediterranea e della Sardegna in particolare – hanno consentito di rilevare un’elevata biodiversità delle comunità fungine endofitiche. Queste risultano composte da molte specie ubiquitarie e saprotrofe, ma anche da diverse specie che possiedono capacità antagonistiche o patogenetiche.

Per quanto riguarda le specie antagoniste, meritano di essere menzionati gli isolati di *Bionectria ochroleuca* (anamorfo: *Clonostachys rosea* f. *rosea*, ≡ *Gliocladium roseum*) e di *Dictyochoaeta parva*, due specie già riportate in letteratura come potenziali agenti di biocontrollo (Burgess e Keane, 1997; Linaldeddu *et al.*, 2005).

Inoltre assume rilevanza la presenza endofitica delle specie di *Trichoderma*, in particolare di *T. viridescens*, un fungo di recente descrizione, riscontrato in precedenza come endofita solo su faggio in Gran Bretagna (Jaklitsch *et al.*, 2006). Il genere *Trichoderma*, com’è noto, annovera numerose specie in grado di produrre metaboliti che interagiscono con le piante ospiti e con gli altri microrganismi presenti nella stessa nicchia ecologica. Per esempio, recentemente è stata dimostrata la capacità di un isolato di *Trichoderma citrinoviride* ottenuto da piante di quercia da sughero, di produrre *in vitro* metaboliti secondari biologicamente attivi appartenenti alla famiglia dei peptaiboli (Maddau *et al.*, 2009).

In merito alle specie con attitudini patogenetiche, da sottolineare è il rinvenimento endofitico di *Discula quercina*, agente di “antracnosi” e disseccamenti su *Quercus* spp., e di altre specie appartenenti a generi che comprendono importanti patogeni di piante forestali (per es.: *Coryneum*, *Fusicoccum*, *Nodulisporium*, *Phoma*). La loro presenza assume rilevanza soprattutto in relazione al ruolo che possono svolgere nell’eziologia dei gravi e sempre più diffusi fenomeni di “deperimento” che colpiscono i soprassuoli

forestali in ambiente mediterraneo. Tali fenomeni, infatti, sono malattie ad eziologia complessa legate alle conseguenze di una condizione di stress delle piante, causata dall'interazione di molteplici fattori avversi, biotici e abiotici, e aggravata dall'intervento di patogeni opportunisti. Molti di questi ultimi, albergano appunto in latenza come endofiti nei tessuti dell'ospite e riescono ad esprimere tutta la loro aggressività, fino a causarne la morte, quando nelle piante sotto stress si alterano i rapporti tra e con gli endofiti presenti.

Per quanto riguarda i saggi di antagonismo, dai risultati ottenuti nelle prove in coltura duale è emersa la spiccata attività micoparassitaria di *B. ochroleuca* nei confronti di tutti e quattro i patogeni saggiati. Tale tipo di attività è ampiamente riportata in letteratura per questo fungo (Sutton *et al.*, 1997). È emersa altresì la capacità di *B. ochroleuca* di produrre metaboliti secondari con attività antifungina che, verosimilmente, possono essere coinvolti nei meccanismi di antagonismo. Merita anche sottolineare che gli estratti organici ottenuti dalle colture liquide e solide del fungo hanno mostrato un'elevata attività antifungina soprattutto nei confronti di *D. quercina*.

Peraltro, *B. ochroleuca*, è stato isolato di recente in Patagonia come endofita di *Eucryphia cordifolia*, una specie arborea appartenente alla famiglia delle Cunoniaceae, e segnalato per produrre *in vitro* numerosi idrocarburi volatili “myco-diesel” come metaboliti secondari (Strobel *et al.*, 2008).

Tali evidenze suggeriscono la necessità di approfondire le conoscenze sulla biologia di questo fungo che è ampiamente diffuso come endofita della querce in Sardegna (Franceschini *et al.*, 2005).

*D. parva* ha mostrato un'elevata attività antifungina nei confronti di tutti i patogeni saggiati. Questi risultati supportano quelli ottenuti in coltura duale che hanno evidenziato un meccanismo di inibizione a distanza dei patogeni, sicuramente mediata dalla diffusione di metaboliti nel substrato di crescita.

Per quanto riguarda questo endofita non è riportata in letteratura nessuna informazione sulla produzione di metaboliti secondari bioattivi, né sul suo ruolo

ecologico negli ecosistemi forestali. Pertanto, considerata la forte attività antifungina degli estratti organici prodotti da questo endofita è auspicabile che le ricerche possano continuare al fine di isolare e caratterizzare le sostanze da esso prodotte.

In relazione alle due specie endofitiche di *Trichoderma*, i risultati ottenuti indicano che il loro meccanismo di azione nei confronti dei patogeni è mediato, verosimilmente, sia dalla produzione di metaboliti secondari, sia da altri fenomeni come il micoparassitismo, particolarmente evidente in *T. viridescens*. Questi dati, concordano con quanto riportato in letteratura sull'attività micoparassitaria di diverse specie appartenenti al genere *Trichoderma* e sulla loro capacità di produrre numerose sostanze antifungine e/o antibiotiche (Howell, 2003; Reino *et al.*, 2008).

I funghi del genere *Trichoderma* sono stati ampiamente studiati come agenti di biocontrollo e sono tra i microrganismi maggiormente commercializzati come biopesticidi, biofertilizzanti e ammendanti addizionati (Harman, 2000; Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2007; Shores e Harman, 2008).

Per diversi anni, le ricerche sui *Trichoderma* hanno preso in esame le specie ad *habitus* terricolo (Harman *et al.*, 2004) e, solo recentemente, l'attenzione è stata rivolta verso quelle specie in grado di colonizzare come endofiti i tessuti di piante erbacee e legnose (Evans *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2008), e di essere potenzialmente utilizzate come agenti di bio-controllo (Linaldeddu *et al.*, 2007; Mejia *et al.*, 2008; Maddau *et al.*, 2009). A tale proposito vale la pena di ricordare che per alcune specie di *Trichoderma* è stata dimostrata la capacità di indurre nella pianta risposte sistemiche di difesa (Yedidia *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2004; Horst *et al.*, 2005; Vinale *et al.*, 2008).

L'isolato di *Penicillium* sp. utilizzato nelle prove in coltura duale ha evidenziato una forte capacità di inibire a distanza i patogeni. Tuttavia, tale spiccata attività antifungina non è stata confermata nei saggi con gli estratti organici dell'isolato. Ciò molto probabilmente perché nessuno dei tre substrati utilizzati ha consentito un'efficace espressione metabolica del fungo.

Infine, in relazione ai saggi sull'attività zootossica degli estratti organici dei 5 microrganismi selezionati, i risultati ottenuti evidenziano una forte tossicità di tutti gli estratti, seppure con differenze, nei confronti delle larve di *Artemia salina*. Il reale significato di questi risultati resta comunque da chiarire, considerando che questo saggio viene utilizzato di solito anche per lo screening preliminare di sostanze antitumorali (Stierle *et al.*, 1999; 2003).

In conclusione, le ricerche effettuate nell'ambito di questa tesi di dottorato hanno consentito di ampliare le conoscenze sulla composizione delle micocenosi endofitiche di piante forestali autoctone della Sardegna e, soprattutto, di selezionare nuovi isolati che per le loro capacità antagonistiche si candidano per essere saggiati in programmi di lotta biologica, in particolare contro i pericolosi patogeni che colpiscono le specie quercine.

Tali antagonisti, infatti, potrebbero essere impiegati sia per trattamenti in vivaio, finalizzati all'ottenimento di piante "immunizzate" da destinare ai nuovi impianti forestali, sia in boschi deperenti per la protezione dei ricacci di ceppaia dopo gli interventi di risanamento o sfruttamento produttivo. Inoltre, nel caso specifico delle sugherete, l'utilizzo di agenti di biocontrollo è indispensabile per la protezione delle piante dalle quali è stato appena estratto il sughero, specialmente nelle aree in cui il carico d'inoculo dei patogeni fungini è elevato. La decortica, infatti, espone ampie superfici di tessuti vivi del fusto alle infezioni dei patogeni, peraltro spesso facilitate dalle ferite che, inevitabilmente, vengono arrecate al fellogeno con l'estrazione del sughero. Per altro verso, non meno interessante sotto il profilo sia scientifico che pratico-applicativo, i risultati ottenuti in questa ricerca costituiscono la base per auspicabili ulteriori ricerche volte alla purificazione e caratterizzazione chimica di nuovi composti naturali biologicamente attivi che potrebbero essere utilizzati in vari settori delle biotecnologie agro-industriali e in ambito medico-farmaceutico.

## RIASSUNTO

In questi ultimi anni gli endofiti sono stati oggetto di una crescente attenzione da parte della ricerca, impegnata sia a delineare nuovi mezzi di difesa a basso impatto ambientale per la protezione delle colture agrarie e degli ecosistemi forestali, sia a individuare nuovi composti naturali di interesse applicativo nel settore delle agro-biotecnologie.

Con tali presupposti sono state sviluppate le attività di ricerca svolte per questa tesi di dottorato, finalizzate in particolare a isolare, selezionare e caratterizzare isolati fungini endofitici, da specie forestali presenti in Sardegna, in grado di produrre *in vitro* metaboliti secondari biologicamente attivi, potenzialmente utilizzabili come agenti di biocontrollo di importanti patogeni forestali.

I funghi endofiti utilizzati nel corso delle indagini sono stati isolati da piante di castagno, quercia da sughero e tasso ubicate rispettivamente nei territori comunali di Desulo, Orune, Arzana e Samugheo/Busachi. 16 delle 74 specie fungine isolate sono state saggiate *in vitro*, con il metodo delle colture duali, per valutare la loro attività antagonistica nei confronti di 4 patogeni fungini: *Biscogniauxia mediterranea*, *Diplodia corticola* e *Discula quercina*, associati al “deperimento” delle querce, e *Cryphonectria parasitica*, agente del “cancro della corteccia” del castagno.

In base ai risultati di queste prove sono stati selezionati 5 endofiti fungini con spiccata attività antagonistica che sono stati identificati su base sia morfologica (utilizzando le comuni chiavi tassonomiche disponibili in letteratura), sia molecolare mediante PCR e successivo sequenziamento della regione ITS del rDNA; tre di essi (*Bionectria ochroleuca*, *Dictyochaeta parva*, *Trichoderma viridescens*) sono stati identificati a livello di specie e due (*Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp.) a livello di genere.



Gli endofiti selezionati sono stati allevati su tre differenti substrati di coltura per valutare la loro capacità di produrre metaboliti secondari bioattivi. In particolare, ciascun fungo è stato allevato in condizioni statiche su un substrato liquido e su due substrati solidi. Il filtrato colturale e le colture solide sono state estratte esaustivamente con diversi solventi organici, e gli estratti ottenuti sono stati saggiati per valutare una loro potenziale attività antifungina e zootossica.

L'attività antifungina di tutti gli estratti è stata valutata a 3 diverse concentrazioni (25, 12,5 e 6,25 µg/µl) depositando 20 µl di ciascun estratto attorno ad un dischetto di inoculo (diametro 6 mm) dei 4 patogeni. L'attività antifungina è stata calcolata come percentuale di inibizione rispetto al testimone. L'attività zootossica degli estratti organici è stata valutata su larve di *Artemia salina* L. a 4 differenti concentrazioni (125, 250, 500 e 1000µg/ml). La percentuale di mortalità delle larve di *A. salina* per ogni concentrazione è stata valutata 24 e 36 ore dopo il trattamento.

I risultati dei saggi in coltura duale hanno messo in evidenza: un'elevata capacità competitiva delle due specie di *Trichoderma* nei confronti di tutti i patogeni contrastandone lo sviluppo miceliare con meccanismi d'azione differenti; una spiccata attitudine micoparassitaria dell'isolato *Bionectria ochroleuca*; la capacità del *Penicillium* sp. e dell'isolato *Dictyochaeta parva* di inibire a distanza la crescita dei patogeni.

Per quanto riguarda l'attività biologica degli organici, i risultati ottenuti per ciascun endofita sono di seguito riportati:

#### *Bionectria ochroleuca*

Gli estratti organici hanno mostrato un'elevata attività antifungina nei confronti di *D. quercina* (inibizione del 100% a tutte le concentrazioni saggate). Tutti gli estratti sono risultati particolarmente attivi nei confronti di *A. salina* con percentuali di mortalità superiori al 90% alle concentrazioni di 1000 e 500 µg/ml; mentre alla concentrazione più bassa, solo l'estratto ottenuto da orzo-farro è risultato particolarmente attivo (mortalità superiore al 50% a 125 µg/ml).

### *Dictyochaeta parva*

Gli estratti organici ottenuti sia dalle colture liquide che solide di questo fungo hanno mostrato un'elevata attività antifungina (100% d'inibizione alla concentrazione più bassa esclusa la *D. quercina*) nei confronti di tutti i patogeni saggiati. L'attività zootossica è risultata particolarmente elevata con l'estratto ottenuto dalla coltura liquida del fungo con una mortalità pari all'87% alla concentrazione di 125 µg/ml.

### *Trichoderma viridescens*

Tutti gli estratti hanno evidenziato una rilevante attività antifungina (inibizione superiore al 90%) nei confronti di *B. mediterranea* a tutte le concentrazioni di saggio. Tutti gli estratti sono risultati particolarmente attivi nei confronti di *A. salina* con percentuali di mortalità superiori al 90% alle concentrazioni di 1000 e 500 µg/ml; mentre alla concentrazione più bassa, solo gli estratti ottenuti dalle colture solide sono risultati attivi (mortalità superiore al 65% a 125 µg/ml).

### *Trichoderma* sp.

Gli estratti di *Trichoderma* sp. hanno mostrato una limitata attività antifungina nei confronti di tutti i patogeni. Tutti gli estratti hanno mostrato una elevata attività zootossica alle concentrazioni di 1000 e 500 µg/mL. Alla concentrazione più bassa (125 µg/ml) la percentuale di mortalità è risultata inferiore al 50%

### *Penicillium* sp.

Gli estratti organici ottenuti sono risultati particolarmente attivi nei confronti di *B. mediterranea* a tutte le concentrazioni. Gli altri patogeni hanno mostrato una sensibilità inferiore. Alle concentrazioni di 1000, 500 µg/ml gli estratti di questo fungo hanno causato una mortalità delle larve di *A. salina* superiore al 90%. Alla concentrazione più bassa le percentuali di mortalità sono risultate inferiori al 50%.

Nel complesso, tutti gli endofiti selezionati possiedono un'elevata attività competitiva, diversificata in funzione delle loro proprietà biologiche e della loro

versatilità metabolica. Questi risultati, sebbene preliminari, possono costituire la base per lo sviluppo di nuove ed efficaci strategie di contenimento delle infezioni dei principali patogeni fungini delle querce e delle piante forestali, basate sull'impiego di agenti microbici. Tali bio-antiparassitari potrebbero essere sviluppati sia per trattamenti in vivaio, finalizzati all'ottenimento di piante immunizzate da destinare ai nuovi impianti forestali, sia in boschi deperienti per la protezione dei ricacci di ceppaia dopo gli interventi di risanamento o sfruttamento produttivo. Un altro aspetto applicativo della ricerca riguarda l'ottenimento di metaboliti secondari bioattivi potenzialmente utilizzabili in vari settori delle biotecnologie tra cui quello medico, farmaceutico e industriale. A tal riguardo, è ben nota l'attività antibiotica e antitumorale di numerosi metaboliti secondari prodotti da funghi endofiti di piante forestali.

## BIBLIOGRAFIA

- Addy H.D., Hamblenton S., Currah R.S. 2000. *Distribution and molecular characterization of the root endophyte Phialocephala fortinii along an environmental gradient in the boreal forest of Alberta*. Mycological Research, 104: 1213-1221.
- Arnold A.E., Herre E.A. 2003. *Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in Theobroma cacao (Malvaceae)*. Mycologia, 95: 388-398.
- Arnold A.E., Mejia L.C., Kyllö D., Rojas E., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A. 2003. *Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 15649-15654.
- Arnold A.E. 2007. *Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges, and frontiers*. Fungal Biology Reviews, 21: 51-66.
- Arnold A.E., Miadlikowska J., Higgins K.L., Sarvate S.D., Gugger P., Way A., Hoftetter V., Kauff F., Lutzoni F. 2009. *Hyperdiverse fungal endophytes and endolichenic fungi elucidate the evolution of major ecological modes in the Ascomycota*. Systematic Biology (in press).
- Bacon C.W., Hinton, D.M. 1996. *Symptomless endophytic colonization of maize by Fusarium moniliforme*. Canadian Journal of Botany, 74: 1195-1202.
- Bacon C.W., White J.F. Jr., 2000. *Microbial endophytes*. M. Dekker, Inc., New York, 487 pp.
- Badalyan S.M., Innocenti G., Garibyan N.G. 2002. *Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture*. Phytopathologia Mediterranea, 41: 200-225.
- Bailey B.A., Bae H., Strem M.D., Roberts D.P., Thomas S.E., Crozier J., Samuels G.J., Choi I.Y., Holmes, K.A. 2006. *Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four Trichoderma species*. Planta, 224: 1149-1164.
- Bailey B.A., Bae H., Strem M.D., Crozier J., Thomas S.E., Samuels G.J., Vinyard B.T., Holmes K.A. 2008. *Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic Trichoderma isolates with biological control potential in Theobroma cacao*. Biological Control, 46: 24-35.
- Barnett, H.L. 1960. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, U.S.A, 225pp.
- Bérdy J. 2005. *Bioactive microbial metabolites: a personal view*. The Journal of Antibiotics, 58: 1-26.

- Bills G.F. 1996. *Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants*. In: Redlin S.C., Carris L.M. (eds), *Endophytic fungi in grasses and woody plants. Systematics, ecology, and evolution*. APS Press, St. Paul, MN: 31-65.
- Bode H.B., Bethe B., Höfs R., Zeek A. 2002. *Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity*. ChemBioChem, 3: 619-627.
- Borges W.D., Borges, K.B., Bonato P.S, Said S., Pupo M.T. 2009. *Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions*. Current Organic Chemistry 13: 1137-1163.
- Burgess D.R., Keane P.J. 1997. *Biological control of Botrytis cinerea on chickpea seed with Trichoderma spp. and Gliocladium roseum: indigenous versus non indigenous isolates*. Plant Pathology, 46: 910-918.
- Cabral D., Stone J.K., Carroll G.C. 1993. *The internal mycobiota of Juncus spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns*. Mycological Research, 97: 367-376.
- Campanile G., Ruscelli A. Luisi N. 2007. *Antagonistic activity of endophytic fungi towards Diplodia corticola assessed by in vitro and in planta tests*. European Journal Plant Pathology, 117: 237-246.
- Chen C., Bauske E.M., Musson G., Rodriguezkabana R., Kloepper J.W. 1995. *Biological Control of Fusarium Wilt on Cotton by Use of Endophytic Bacteria*. Biological control 5: 83-91.
- Chin Y.W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. 2006. *Drug discovery from natural sources*. The AAPS Journal, 8: E239-E253.
- Clay, K., Holah, J. 1999. *Fungal Endophyte Symbiosis and Plant Diversity in Successional Field*. Science, 285: 1742-1744.
- Coley-Smith J.R., Ghaffar A., Javed, Z.U.R., 1974. *The effect of dry conditions on subsequent leakage and rotting of fungal sclerotia*, Soil Biol. Biochem., 6: 307-312.
- Deckert R.J., Melville L.H., Peterson R.L. 2001. *Structural features of a Lophodermium endophyte during the cryptic life-cycle phase in the foliage of Pinus strobus*. Mycological Research, 105(8): 991-997.
- Donadio S., Monicardini P., Alduina R., Mazzaa P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M., Puglia A.M. 2002. *Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites*. Journal of Biotechnology, 99: 187-198.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. Phytochemistry Bulletin 19: 11-15.

- Dreyfuss M.M., Chapela I.H. 1994. *Potential of fungi in discovery of novel low molecular weight pharmaceuticals*. In: *The discovery of Natural Products with Therapeutic Potential* (ed. V.P. Gullo). Butterworth-Heinemann, London, UK: 49-80.
- Elmi A.A., West C.P., Robbins R.T., Kirkpatrick T.L. 2000. *Endophyte effects on reproduction of a root-knot nematode (Meloidogyne marylandi) and osmotic adjustment in tall fescue*. Grass Forage Science 55: 166-172.
- Evans H.C., Holmes K.A., Thomas S.E. 2003. *Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, Theobroma gileri, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases*. Mycological Progress, 2: 149-160.
- Evidente A., Andolfi A., Maddau L., Franceschini A., Marras F. 2005. *Biscopyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by Biscogniauxia mediterranea, a fungus pathogen of cork oak*. Journal of Natural Product, 68: 568-571.
- Fisher P.J., Petrini O. 1990. *A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of Alnus species in England and Switzerland*. Mycological Research, 94: 313-319.
- Fisher P.J., Petrini O., Petrini L.E., Sutton B.C. 1994. *Fungal Endophytes from the Leaves and Twigs of Quercus ilex L. from England, Majorca and Switzerland*. New Phytologist, 127(1): 133-137.
- Franceschini A., Maddau L., Linaldeddu B. 2002. *Presenza di endofiti fungini coinvolti nel deperimento della quercia da sughero in specie del sottobosco di una sughereta in decadenza*. Atti del Convegno "L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive", A. Franceschini e F. Marras (Ed.), Sassari-Tempio Pausania, 19-21 maggio 2002: 147-156.
- Franceschini A., Linaldeddu B.T., Marras F. 2005. *Occurrence and distribution of fungal endophytes in declining cork oak forests in Sardinia (Italy)*. IOBC/wprs Bulletin, 28: 67-74.
- Germida J.J., Siciliano S.D., de Freitas J.R., Seib A.M. 1998. *Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (Brassica napus L.) and wheat (Triticum aestivum L.)*. FEMS Microbiology Ecology, 26:43-50.
- Graniti A. 2002. *L'endofitismo nei funghi: un adattamento ecologico o un modo di vita?*. Atti del Convegno "L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive", A. Franceschini e F. Marras (Ed.), Sassari-Tempio Pausania, 19-21 maggio 2002: 147-156.
- Gullino M.L., Minuto A., Garibaldi A. 2002. *Lotta biologica a funghi e batteri fitopatogeni*. Notiziario sulla Protezione delle Piante 14: 19-45.

- Gunatilaka A.A.L. 2006. *Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence*. Journal of Natural Products, 69: 509-526.
- Guo L. I., Hyde K. D., Liew E. C Y., 2000. *Identification of endophytic fungi from Livingstonia chinensis based on morphology and rDNA sequences*. New Phytologist, 147: 617-630.
- Guo B., Wang Y., Sun X., Tang K. 2008. *Bioactive natural products from endophytes: a review*. Prikl Biokhim Mikrobiol. 44(2):153-158.
- Gutierrez-Zamora M.L., Martinez-Romero E., 2001. *Natural endophytic association between Rhizobium etli and maize (Zea mays L.)*. J. Biotechnol., 91: 117-126.
- Harman G.E. 2000. *Myths and dogms of biocontrol: changes in perceptions derived from research in Trichoderma harzianum T-22*. Plant Disease, 84: 377-393.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts*. Nature Reviews, 2: 43–56.
- Higgins KL, Arnold AE, Miadlikowska J, Sarvate SD, Lutzoni F. 2007. *Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 42: 543–555.
- Hoff J.A., Klopfenstein N.B., McDonald G.I., Tonn J.R., Kim M.S., Zambino P.J., Hessburg P.F., Rogers J.D., Peever T.L., Carris L.M. 2004. *Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii) and ponderosa pine (Pinus ponderosa)*. Forest Pathology, 34: 255-271.
- Holmes K.A., Schroers H.J., Thomas S.E., Evans H.C., Samuels, G.J. 2004. *Taxonomy and biocontrol of a new species of Trichoderma from the Amazon basin of South America*. Mycological Progress, 3: 199–210.
- Horst L.E., Locke J., Krause C.R., McMahon R.W., Madden L.V., Hoitink H.A.J. 2005. *Suppression of Botrytis blight of begonia by Trichoderma hamatum 382 in peat and compost-amended potting mixes*. Plant Disease, 89: 1195-1200.
- 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.
- Hsieh T.F., Huang H.C., Erickson R.S. 2005. *Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, Pantoea agglomerans*. Journal Phytopathology 153:608-614.

- Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S. 2001. *Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from Streptomyces humidus*. Applied and Environmental Microbiology, 67: 3739-3745.
- Hyde K.D., 2005. *Tropical fungi*. In: Dighton J, White JF, Oudemans P (eds), *The Fungal Community; its Organization and Role in the Ecosystem*. Taylor and Francis, Boca Raton, 93-115 pp.
- Jaklitsch W.M., Samuels G.J., Dodd S.L., Lu B-S., Druzhinina I.S. 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia*. Studies in Mycology 56: 135-177.
- Khan J., Ooka J.J., Miller S.A., Madden L.V., Hoitink H.A.J. 2004. *Systemic resistance induced by Trichoderma hamatum 382 in cucumber against Phytophthora crown rot and leaf blight*. Plant Disease, 88: 280-286.
- Kock J.L.F., Strauss T., Pohl C.H., Smith D.P., Botes P.J., Pretorius E.E., Tepeny T., Sebolai O., Botha A., Nigam S. 2001. *Bioprospecting for novel oxylipins in fungi: the presence of 3-hydroxy oxylipins in Pilobolus*. Antonie van Leeuwenhoek, 80: 93-99.
- Kuthubutheen A.J., Nawawi A. 1991. *Key to Dictyochoeta and Codinaea species*. Mycological Research 95 (10): 1224-1229.
- Lam K.S. 2006. *Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes*. Current Opinion in Microbiology, 9: 245-251.
- Li J.Y., Strobel G.A., Sidhu R., Hess W.M., Ford E.J., 1996. *Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, Taxodium distichum*. Microbiology, 142: 2223-2226.
- Linaldeddu B.T., Maddau L., Franceschini A. 2005. *Preliminary in vitro investigation on the interaction among endophytic fungi isolated from Quercus spp.* IOBC/wprs Bulletin 28 (8): 101-102.
- Linaldeddu B.T., Maddau L., Franceschini A. 2007. *Attività antagonistica di isolati endofitici di Trichoderma spp. verso Botryosphaeriaceae associate al deperimento della quercia da sughero*. Micologia Italiana, 36: 22-29.
- Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M., van der Lelie D. 2002. *Endophytic bacteria and their potential applications*. Crit. Rev. Plant Sci. 21: 583-606.
- Lyons P. C., Evans J. J., Bacon C.W., 1990. *Effects of the Fungal Endophyte Acremonium coenophialum on Nitrogen Accumulation and Metabolism in Tall Fescue*. Plant Physiology 92: 726-732.



- Lumyong S., Lumyong P., McKenzie E.H.C., Hyde K. 2002. *Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand*. Canadian Journal of Microbiology, 48(12): 1109-1112.
- Maddau L., Franceschini A., Marras F. 2004. *Endophytic fungi of forest trees as a source of bioactive metabolites*. In: *Endophytism in forest trees* (Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I., coord.), Accademia Italiana Scienze Forestali ed., Firenze: 119-138.
- Maddau L., Cabras A., Franceschini A., Linaldeddu B.T., Crobu S., Roggio T., Pagnozzi D. 2009. *Occurrence and characterization of peptaibols from Trichoderma citrinoviride, an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. Microbiology 155: 3371-3381.
- Malinowski D.P., Belesky D.P., 1999. *Endophyte infection enhances the ability of tall fescue to utilize sparingly available phosphorus*. J. Plant Nutr., 22: 835-853.
- Mejia L.C., Rojas E.I., Maynard Z., Van Bael S., Arnold A.E., Hebbar P., Samuels, G.J., Robbins N., Herre, E.A. 2008. *Endophytic fungi as biocontrol agents of Theobroma cacao pathogens*. Biological Control, 46: 4-14.
- Mitchell A.M., Strobel G.A., Hess W.M., Vargas P.N., Ezra D. 2008. *Muscodor crispans, a novel endophyte from Anans ananassoides in the Bolivian Amazon*. Fungal Diversity, 31: 37-43.
- Mostert L., Crous P.W., Petrini O. 2000. *Endophytic fungi associated with shoots and leaves of Vitis vinifera, with special reference to the Phomopsis viticola complex*. Sydowia, 52(1): 46-58.
- Narisawa K., Ohki K.T., Hashiba T. 2000. *Suppression of clubroot and Verticillium yellows in Chinese cabbage in the field by the root endophytic fungus, Heteroconium chaetospira*. Plant Pathology, 49: 141-146.
- Omacini, M., Chaneton, E.J., Ghera, C.M. and Müller, C.B., 2001. *Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs*. Nature 409: 78-81.
- Owen N.L., Hundley N. 2004. *Endophytes the chemical synthesizers inside plants*. Science Progress 87: 79-99.
- Peters S., Dammeyer B., Schulz B. 1998. *Endophyte-host interactions I. Plant defense reactions to an endophyte and a pathogenic fungus*. Symbiosis, 25: 193-211.
- Petrini O., Sieber T., Toti L., Viret O. 1993. *Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi*. Natural Toxins, 1 (3): 185-196.

- Promptuttha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, McKenzie E, Hyde K, Jeewan R. 2007. *A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence*. *Microbial Ecology* 53: 579-590.
- Ragazzi A., Moricca S., Capretti P., Dellavalle I. 1999. *Endophytic presence of *Discula quercina* on declining *Quercus cerris**. *Journal of Phytopathology*, 147(7-8): 437-440.
- Ragazzi A., Moricca S., Capretti P., Dellavalle I., Turco E. 2003. *Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy*. *Forest Pathology*, 33(1): 31-38.
- Ragazzi A. 2009. *Espressione di malattia nell'endofitismo: da ipotesi a realtà*. *Micologia Italiana*, 38(1): 29-46.
- Rasmussen S., Parsons, A., Newman J.A. 2009. *Metabolomics analysis of the *Lolium perenne*-*Neotyphodium lolii* symbiosis: more than just alkaloids?*. *Phytochemistry Reviews* 8(3): 535-550.
- Raviraja N.S. 2005. *Fungal endophytes in five medicinal plant species from Kudremukh Range, Western Ghats of India*. *Journal of Basic Microbiology*, 45(3): 230-235.
- Reino J.L., Guerrero R.F., Galan R.H., Collado I.G. 2008. *Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma**. *Phytochemistry Reviews*, 7: 89-123.
- Ren Y., Strobel G.A., Graff J.C., Jutila M., Park S.G., Gosh S., Teplow, D., Condron M., Eric Pang E., Hess W.M., Moore, E. 2008. *Colutellin A an immunosuppressive peptide from *Colletotrichum dematium**. *Microbiology* 154: 1973-1979.
- Richardson M.D., Bacon C.W., Hoveland C.S., 1990. *The effect of endophyte removal on gas exchange in tall fescue*. p. 189-193. In S.S. Quisenberry and R.E. Joost (ed.) *Proc. Intl. Symp. on *Acremonium*/Grass Interactions*. Baton Rouge, LA.
- Richardson M. D., Chapman G. W., Hoveland C. S., Bacon C. W. 1992. *Sugar alcohols in endophyte-infected tall fescue under drought*. *Crop Science*, 32(4):1060-1061.
- Rodrigues, K.F., Samuels G. 1999. *Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil*. *Journal of Basic Microbiology*, 39: 131-135.
- Rodriguez R.J., Henson J., Van Volkenburgh E., Hoy M., Wright L., Beckwith F., Kim Y., Redman R.S. 2008. *Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis*. *International Society of Microbial Ecology* 2: 404-416.
- Rodriguez R.J., White J.F., Arnold A.E., Redman R.S. 2009. *Fungal endophytes: diversity and functional roles*. *New Phytologist*, 182(2): 314-330.

- Rubini M.R., Silva-Ribeiro R.T., Pomella A.W.V., Maki C.S., Araujo W.L., dos Santos D.R., Azevedo J.L. 2005. *Diversity of endophytic fungal community of cacao (Theobroma cacao L.) and biological control of Crinipellis pernicioso, causal agent of Witches' Broom Disease*. International Journal Biological Science 1: 24–33.
- Saikkonen K., Ion D., Gyllenberg M. 2002. *The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 269: 1397-1403.
- Schardl C.L. 1996. *Epichloë species: fungal symbionts of grasses*. Annual Review of Phytopathology, 34: 109-130.
- Schena L., Nigro F., Pentimone I., Ligorio A., Ippolito A. 2003. *Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biology and Technology, 30: 209-220.
- Schroers H.J. 2001. *A monograph of Bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its Clonostachys anamorphs*. Studies in Mycology 46. CBS Utrecht, 214 pp.
- Schulz B., Rommert A.K., Dammann U., Aust H.J., Redman R.S., Ranson J.C., Rodriguez R.J. 1999. *The endophyte-host interactions: a balanced antagonism?* Mycological Research, 103(10): 1275-1283.
- Schulz B., Boyle C., Draeger S., Rommert A.K., Krohn K. 2005. *Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites*. Mycological research, 106(9): 996-1004.
- Schulz B., Boyle C. 2005. *The endophytic continuum*. Mycological research. 109 (6): 661-686.
- 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.
- Sieber T.N. 2007. *Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?*. Fungal Biology Review, 21(2-3): 75-89.
- Siegel M.R., Latch G.C.M., Johnson M.C. 1987. *Fungal endophytes of grasses*. Annual Review Phytopathology, 25: 293-315.
- Smith H., Wingfield M.J., Petrini O., 1996. *Botryosphaeria dothidea endophytic in Eucalyptus grandis and Eucalyptus nitens in South Africa*. Forest Ecology and Management, 89 (1-3): 189-195.
- Stadler M., Keller N.P., 2008. *Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research*. Mycological Research, 112: 127-130.

- Stierle A.A., Stierle D.B., Bugni T. 1999. *Sequoiatones A and B: novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte*. Journal of Organic Chemistry, 64: 5479-5484.
- Stierle D.B., Stierle A.A., Bugni T. 2003. *Sequoiamonascins A-D: novel anticancer metabolites isolated from a redwood endophyte*. Journal of Organic Chemistry, 68: 4966-4969.
- Stone, J.K. 1986. *Foliar endophytes of Douglas Fir: cytology and physiology of the host-endophyte relationship*. Ph.D. dissertation- University of Oregon, pp. 124.
- Stone J.K., 1987. *Initiation and development of latent infections by Rhabdocline parkeri on Douglas-fir*. Canadian Journal of Botany, 65(12): 2614-2621.
- Stone J. K., Viret O. Petrini O., Chapela I. 1994. *Histological studies of host penetration and colonization by endophytic fungi*. In: *Hoer Wall Alterations by Persea Fungi* (O. Petrini e G. B. Ouellette, eds): 115-128. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.
- Stone J.K., Bacon C.W., White J.E., 2000. *An overview of endophytic microbes: endophytism defined*. In: *Microbial Endophytes* (Bacon C.W., White J.F., eds.), Marcel Dekker, New York: 1-29.
- Strobel G.A., Daisy B. 2003. *Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products*. Microbiol Mol Biol Rev 67: 491-502.
- Strobel G.A., Knighton B., Kluck K., Ren Y., Livinghouse T., Griffin M., Spakowicz D., Sears J. 2008. *The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus Gliocladium roseum (NRRL 50072)*. Microbiology, 154: 3319-3328.
- Suryanarayanan T.S., Hawksworth D.L. 2005. *Fungi from little explored and extreme habitats*. In: Deshmukh S.K., Rai M.K. (eds), *Biodiversity of Fungi; Their Role in Human Life*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, pp. 33-48.
- Suryanarayanan T.S., Thirunavekkarasu N., Govendarajulu M.B., Sasse F., Jansen R., Murali T. S. 2009. *Fungal endophytes and bioprospecting*. Fungal Biology Reviews (in press).
- Sutton, B.C. 1980. "The Coelomycetes" Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. 696 p.
- Sutton J.C., Li D.W., Peng G., Yu H., Zhang P., Valdebenito-Sanhueza R.M. 1997. *Gliocladium roseum. A versatile adversary of Botrytis cinerea in crops*. Plant Disease, 81: 316-328.
- Tan R.X., Zou W.X. 2001. *Endophytes: a Rich source of functional metabolites*. Nat Prod Rep 18: 448-459

- Tondje P.R., Hebbar K.P., Samuels G., Bowers J.H., Weise S., Nyemb E., Begoude D., Foko J., Fontem D. 2006. *Bioassay of Geniculosporium species for Phytophthora megakarya biological control on cacao pod husk pieces*. African Journal of Biotechnology 5: 648-652.
- Turco E., Narducci R., Fantoni E. 2009. *Ulteriori risultati di uno studio sullo stato sanitario dei popolamenti di Quercus suber L. nelle aree naturali protette dei Monti Pisani*. Micologia Italiana 38(2): 34-39.
- U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Arnold AE. 2008. *Evolutionary relationships of endophytic, endolichenic, and saprotrophic fungi in the Chiricahua Mountains*. Inoculum, 54: 60-61.
- Van Loon L.C., Bakker P. A.H.M., Pieterse C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36:453-83.
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Valéro, J.R. 2007. *Antagonistic fungi, Trichoderma spp.: panoply of biological control*. Biochemical Engineering Journal, 37: 1-20.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. 2008. *Trichoderma-plant-pathogen interactions*. Soil Biology & Biochemistry, 40: 1-10.
- Viret O., Petrini O. 1994. *Penetration and colonization of beech leaves (Fagus sylvatica) by the endophyte Discula umbrinella (teleomorph: Apiognomonina errabunda)*. Mycological Research, 98(4): 423-432.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (eds). San Diego, California: Academic Press. 315–322 pp.
- Wilson D. 2000. *Ecology of woody plant endophytes*. In: Bacon C.W., White J.F. Jr. (eds), Microbial endophytes. Dekker M., Inc., New York: 389-420.
- Wilson D., 1995. *Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition*. Oikos, 72: 274-276.
- Yedidia I., Shores 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 Environmental Microbiology, 69: 7343–7353.

Young C.A., Bryant M.K., Christensen M.J., Tapper B.A., Bryan G.T., Scott B. 2005. *Molecular cloning and genetic analysis of a symbiosis-expressed gene cluster for lolitrem biosynthesis from a mutualistic endophyte of perennial ryegrass*. Mol. Genet. Genomics, 274:13-29.

Zhang H.W., Song Y.C., Tan R.X., 2006. *Biology and chemistry of endophytes*. Natural Product Reports 23: 753-771.